

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

TESIS

Efecto del estrés crónico en la calidad de los espermatozoides epididimarios y reacción acrosomal en ratas macho adultas

Que para obtener el grado de
Maestra en Biología de la Reproducción Animal

PRESENTA

Habit Vansidary Medina Guzmán

Matricula:2213800805. Correo: medinahabit@gmail.com

DIRECTORA: DRA. MARÍA DEL SOCORRO IMELDA RETANA MÁRQUEZ

DIRECTORA: DRA. ADRIANA LIZBETH JUÁREZ ROJAS

ASESORA: DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS

JURADO

PRESIDENTA: DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

SECRETARIA: DRA. EDITH ARENAS RÍOS

VOCAL: DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS

VOCAL: DR. ENRIQUE OTHÓN HERNANDÉZ GONZÁLEZ

IZTAPALPA, CIUDAD DE MEXICO A 18 DEL MES DE ABRIL DEL AÑO 2024

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe, **HABIT VANSIDARY MEDINA GUZMÁN** alumna del posgrado: MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“Efecto del estrés crónico en la calidad de los espermatozoides epididimarios y reacción acrosomal en ratas macho adultas”**.

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de Maestro en Biología de la Reproducción Animal es de mi autoría y original, creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 21 de febrero de 2024.

Atentamente



HABIT VANSIDARY MEDINA GUZMÁN

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 21 de febrero de 2024

Comisión Académica del Posgrado
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

Presente.

La que suscribe, **HABIT VANSIDARY MEDINA GUZMÁN**, alumna con número de matrícula **2213800805** del posgrado **MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación **“Efecto del estrés crónico en la calidad de los espermatozoides epididimarios y reacción acrosomal en ratas macho adultas”** a desarrollar en LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.



HABIT VANSIDARY MEDINA GUZMÁN

COMITE TUTORAL

Codirectora:

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez

Profesora Titular C, T.C.

Laboratorio de Neuropsicoendocrinología

Departamento de Biología de la Reproducción

División Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Codirectora:

Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas

Profesora Asociado D, T.C

Laboratorio de Neuropsicoendocrinología

Departamento de Biología de la Reproducción

División Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesora:

Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos

Profesora Titular A, T.C

Laboratorio de Neuropsicoendocrinología

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Adscripción del Jurado del Examen de Grado

Presidenta

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Departamento de Ciencias de la salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Secretaria

Dra. Edith Arenas Ríos

Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Vocal

Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos

Laboratorio de Neuropsicoendocrinología
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Vocal

Dr. Enrique Othón Hernández González

CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional
Unidad Zacatenco

FIRMA DE LOS MIEMBROS DE JURADO

El jurado designado por la Comisión de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó la Tesis titulada: **“Efecto del estrés crónico en la calidad de los espermatozoides epididimarios y reacción acrosomal en ratas macho adultas”** con fecha 18 de abril de 2024.



Presidenta

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana



Secretaria

Dra. Edith Arenas Ríos



Vocal

Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos



Vocal Dr. Enrique Othón Hernández González

Agradecimientos:

Agradezco:

Al Programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana perteneciente al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por el apoyo económico otorgado el presente trabajo a través de la beca número: 1167756.

“El corazón del entendido adquiere sabiduría; y el oído de los sabios busca la ciencia”

(Proverbios 18:15)

“Primer principio: no dejarse vencer nunca ni por las personas ni por los acontecimientos”.

-Marie Curie-

Dedicatoria

A Dios por ser mi escudo, mi guía y mi refugio, por darme la dicha y la bendición de seguir cumpliendo mis metas y mis sueños.

A mi madre Ada Guzmán por ser uno de los pilares más importantes para mi formación personal y académica, por ser mi más grande ejemplo de esfuerzo, valentía y amor incondicional, por darme todas las herramientas necesarias para ser un mejor ser humano cada día, por motivarme, apoyarme y demostrarme que todo es posible a pesar de las adversidades. Gracias infinitas, te amo mami.

A mis tías y tíos, especialmente a mi tío Abraham, Israel y Esteban ya que han sido siempre de gran apoyo en todos los aspectos. Gracias por estar en todo momento porque gracias a todos sé que la familia es la única que siempre estará ahí, no importando las circunstancias.

A mis primos y primas, pero de manera especial a mi prima Janette. Gracias por ser hermana y amiga por estar ahí siempre para mí, por tu apoyo incondicional, por escucharme, motivarme y ser uno de los más grandes ejemplos de empatía.

De manera muy especial a mi abuelito Vicente Guzmán a pesar de que ya no está, cada uno de mis logros siempre serán dedicados a él. Sé lo orgulloso que estaría de verme culminar un escalón más de mi formación profesional.

Agradecimientos

A la UAM, unidad Iztapalapa, a mi casa abierta al tiempo, porque en ella encontré todas las herramientas necesarias y las puertas del conocimiento para mi formación y por inculcarnos desde el principio que nuestra formación académica era para servir a la sociedad.

A la Dra. María del Socorro Retana Márquez por abrirme las puertas de su laboratorio y apoyarme cuando las circunstancias no eran las más favorables al inicio de la maestría. Gracias por darme la confianza y la oportunidad de trabajar dicho proyecto en su laboratorio, por sus consejos, su profesionalismo, su compromiso, su exigencia y disciplina, pero sobre todo gracias por compartir su conocimiento.

A la Dra. Lizbeth Juárez por su compromiso, su tiempo para aclarar mis dudas, por compartir sus experiencias, su conocimiento y sus consejos. Gracias por darme ánimos y siempre tener las palabras adecuadas.

A la Dra. Fahiel Casillas por ser ese impulso que me motivo a seguir preparándome y sembrar esa semilla del conocimiento para yo poder esclarecer que era lo que realmente me gustaba y cual era mi camino a seguir.

A mis compañeros de maestría Karla, Yoab, Sara, Lupita, Yesica, Yenny y Luis, sin ustedes la maestría no hubiera sido tan llevadera. Cada uno de ustedes me enseñó algo tanto profesional como personal. Tuvimos altas y bajas, pasamos por enojos, tristezas, frustración y sobre todo estrés, pero todos al final comprendimos que era parte del proceso, que no era fácil, pero que esto nos forjaba para ser mejores día con día. Gracias por su apoyo, compañerismo y sobre todo por las risas que nunca faltaron, esas grandes descargas de serotonina. Los admiro.

RESUMEN

El estrés crónico, causa efectos negativos en la reproducción masculina, disminuyendo la síntesis de testosterona, alterando la espermatogénesis y la funcionalidad de las glándulas sexuales. Sin embargo, aún no hay suficientes estudios acerca de las alteraciones que puede causar el estrés crónico en la calidad de los espermatozoides. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del estrés crónico en la calidad de los espermatozoides epididimarios de ratas macho adultas. Se utilizaron ratas macho albinas de la cepa Wistar, de tres meses de edad, se dividieron en dos grupos, control (n = 10) y un grupo experimental (n = 10), al cual se le aplicó estrés crónico por inmersión en agua fría (temperatura de -15°C), por 15 min, durante 50 días consecutivos. Durante este tiempo, se registraron los pesos corporales. Los animales se eutanizaron y se registraron los pesos gonadales, se obtuvo sangre para determinar las concentraciones séricas de LH, de testosterona y de corticosterona. Se obtuvieron los espermatozoides del epidídimo y se realizó el análisis espermático: viabilidad, concentración, movilidad total (progresiva y no progresiva), morfología; se tomaron en cuenta las anormalidades en la cabeza, en el flagelo y la presencia de gota citoplasmática y se valoró la reacción acrosomal espontánea. Los resultados muestran que los machos del grupo de estrés crónico mostraron menor ganancia de peso corporal, así como menor índice gonadosomático; también se observó menor concentración espermática, viabilidad y movilidad, mayor porcentaje de anormalidades y de espermatozoides con acrosoma reaccionado. La concentración sérica de corticosterona fue mayor, mientras que la concentración de LH y testosterona fue menor que en el grupo control. Estos resultados muestran que el estrés crónico provoca alteraciones metabólicas, que se reflejan en una menor ganancia de peso corporal, así como efectos negativos en la calidad espermática, asociados a elevados niveles de corticosterona y bajos niveles de LH y testosterona. Por ello, el estrés puede considerarse como un factor de infertilidad.

ABSTRACT

Chronic stress causes adverse effects on male reproduction, decreasing testosterone synthesis, altering spermatogenesis and the functionality of sex glands. However, there are still not enough studies about the alterations that chronic stress can cause in the quality of spermatozoa. This work aimed was to evaluate the effects of chronic stress on epididymal sperm quality in adult male rats. Male Wistar albino rats, three months old, were divided into two groups, a control group (n = 10) and an experimental group (n = 10), which were exposed to chronic stress by immersion in cold water was applied (temperature -15°C), 15 min for 50 consecutive days. During this time, body weights were recorded. The animals were euthanized and gonadal weights were recorded; blood was obtained to evaluate serum concentrations of LH, testosterone, and corticosterone. Spermatozoa were obtained from cauda epididymis to analyze sperm viability, concentration, total motility (progressive and non-progressive), morphology (abnormalities in head, flagellum, and presence of cytoplasmic droplet), as well as acrosomal reaction. Serum corticosterone concentration was higher, while testosterone and testosterone concentration were lower than the control group. These results show that chronic stress causes metabolic alterations, which are reflected in lower body weight gain, as well as negative effects on sperm quality, associated with high levels of corticosterone and low levels of LH and testosterone. Therefore, stress can be considered a factor of infertility.

ÍNDICE

| | | |
|------|--|----|
| 1 | INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 | CONCEPTO DE ESTRÉS | 1 |
| 1.2 | DEFINICIÓN DE ESTRESOR Y SU CLASIFICACIÓN..... | 3 |
| 1.3 | SISTEMA DE ESTRÉS..... | 4 |
| 1.4 | SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO | 6 |
| 1.5 | Eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT)..... | 7 |
| 1.6 | Esteroidogénesis testicular | 9 |
| 1.7 | Espermatogénesis..... | 11 |
| 1.8 | Epidídimo | 15 |
| 1.9 | Regulación endocrina del epidídimo | 19 |
| 1.10 | Maduración epididimaria de los espermatozoides | 20 |
| 1.11 | Glándulas sexuales masculinas | 24 |
| 1.12 | Los espermatozoides en el oviducto | 26 |
| 1.13 | Capacitación espermática | 27 |
| 1.14 | Hiperactivación de la movilidad de los espermatozoides..... | 28 |
| 1.15 | Reacción acrosomal..... | 30 |
| 1.16 | Vía de señalización de la reacción acrosomal..... | 32 |
| 2 | ANTECEDENTES | 34 |
| 2.1 | Efectos del estrés en la reproducción masculina | 34 |
| 2.2 | Efecto del estrés en la calidad de los espermatozoides | 40 |
| 3 | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 41 |
| 4 | JUSTIFICACIÓN..... | 42 |
| 5 | PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN..... | 42 |
| 6 | HIPÓTESIS | 42 |
| 7 | OBJETIVO GENERAL..... | 42 |
| 7.1 | Objetivos específicos | 42 |
| 8 | Metodología..... | 43 |
| 8.1 | Declaración ética | 43 |
| 8.2 | Animales de laboratorio..... | 43 |
| 9 | DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 43 |
| 9.1 | Inducción de Estrés..... | 44 |
| 9.2 | Registro del peso corporal | 45 |

| | | |
|--------|---|----|
| 9.3 | Peso relativo de las glándulas accesorias..... | 46 |
| 9.4 | Obtención de los espermatozoides de la cauda del epidídimo..... | 46 |
| 9.5 | Análisis espermático | 47 |
| 9.5.1 | Concentración | 47 |
| 9.5.2 | Movilidad..... | 47 |
| 9.5.3 | Morfología..... | 48 |
| 9.5.4 | Viabilidad. Tinción eosina – nigrosina..... | 48 |
| 9.6 | Integridad del acrosoma. Tinción clortetraciclina (CTC) | 49 |
| 9.7 | Obtención de las muestras de sangre para determinación sérica de corticosterona, LH y testosterona por ensayo ELISA | 50 |
| 9.7.1 | Ensayo ELISA para corticosterona..... | 50 |
| 9.7.2 | Ensayo ELISA para testosterona y LH..... | 51 |
| 10 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 53 |
| 11 | RESULTADOS..... | 53 |
| 11.1 | Ganancia diaria de peso corporal..... | 53 |
| 11.2 | Pesos relativos de órganos sexuales..... | 53 |
| 11.3 | Peso relativo de los testículos y del epidídimo después del estrés crónico..... | 54 |
| 11.4 | Peso relativo de la próstata y de las vesículas seminales después del estrés crónico..... | 55 |
| 11.5 | Concentraciones séricas de corticosterona, LH y testosterona..... | 56 |
| 11.6 | Análisis espermático | 58 |
| 11.6.1 | Movilidad y concentración espermática..... | 58 |
| 11.6.2 | Viabilidad | 59 |
| 11.6.3 | Anormalidades | 59 |
| 11.6.4 | Efecto del estrés crónico en el estado acrosomal de los espermatozoides..... | 61 |
| 12 | DISCUSIÓN..... | 62 |
| 12.1 | Peso corporal..... | 62 |
| 12.2 | Pesos glandulares..... | 63 |
| 12.3 | Corticosterona, LH y Testosterona..... | 65 |
| 12.4 | Calidad espermática | 68 |
| 12.5 | Reacción acrosomal..... | 70 |
| 13 | CONCLUSIÓN | 72 |
| 14 | REFERENCIAS | 72 |

1 INTRODUCCIÓN

Los índices de infertilidad en la sociedad moderna han ido en aumento y esto ha afectado alrededor del 15% de las parejas, siendo el factor masculino responsable de casi el 50% de los casos de infertilidad (Wagner et al., 2018). La infertilidad se ha relacionado con factores genéticos, tóxicos, de condición médica y el estilo de vida, entre ellos el estrés. El estrés es la respuesta del organismo a las alteraciones de su entorno con la finalidad de adaptarse y hacer frente a los eventos que alteran la homeostasis (Charmandari et al., 2005).

La respuesta de estrés se da a través del sistema de estrés, en el que participan diversas hormonas que regulan la estabilidad del medio interno. Uno de los ejes que se activan durante el estrés es el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), el cual regula diversos mecanismos homeostáticos. Sin embargo, durante el estrés crónico, los glucocorticoides pueden provocar cambios perjudiciales en diversos órganos, incluido el cerebro, lo que puede ocasionar enfermedades y alteraciones en diversas funciones, entre ellas las reproductivas, alterando el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) (Acevedo et al., 2018).

1.1 CONCEPTO DE ESTRÉS

El estrés es la respuesta fisiológica del organismo a diferentes estímulos capaces de alterar la homeostasis del organismo los cuales son denominados como estresores; algunos de ellos son impredecibles e incontrolables y pueden presentarse durante un período indeterminado, excede la capacidad reguladora del organismo (Koolhaas et al., 2011).

Cualquier tipo de estresor físico o psicológico que altere la homeostasis, genera una respuesta de estrés en el organismo, provocando cambios fisiológicos y conductuales en respuesta al estresor (Mifsud y Reul, 2018). El restablecimiento y mantenimiento de la homeostasis implica la activación y el control coordinado de los sistemas de estrés neuroendocrino y autónomo.

La respuesta de estrés está regulada por estructuras cerebrales como son, el sistema límbico, el hipotálamo y el tronco encefálico (Ulrich-Lai y Herman, 2009). El grado de la respuesta de estrés depende de la duración del estresor, que puede ser agudo (exposición por tiempo limitado, de segundos a unas cuantas horas) o crónico (exposiciones prolongadas, de varias horas a días, semanas, meses o años). El estrés agudo se refiere a un estado adaptativo de corto plazo, que permite que el organismo responda a los cambios ambientales o fisiológicos y regrese a la homeostasis. Por el contrario, el estrés crónico es una condición de mayor duración que, en el mediano o largo plazo, puede generar una respuesta desadaptativa, lo que implica efectos nocivos en varios sistemas del organismo, incluida la reproducción (Noushad et al., 2021).

Hans Selye en 1936, definió el estrés como una respuesta inespecífica del organismo a cualquier amenaza y la describió como el Síndrome General de Adaptación (SGA), definido como una respuesta fisiológica que involucra al sistema Locus coeruleus-sistema adrenomedular (LC-SAM) y al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), importantes reguladores de la homeostasis en los organismos (Tsigos y Chrousos, 2002). El SGA se divide en tres etapas: (1) Etapa de alarma: el organismo responde al sentirse amenazado por determinadas circunstancias presentes en su medio

ambiente. Esta etapa se caracteriza por la descarga simpático-adrenomedular inmediata, que desencadena una serie de respuestas fisiológicas con el objetivo de mantener la supervivencia de los organismos. (2) Etapa de resistencia: cuando el organismo es sometido a estresores por tiempos prolongados (agentes físicos, químicos, biológicos o sociales), puede adaptarse a dichas amenazas paulatinamente o puede ocurrir que el organismo pierda su capacidad de adaptación y así, avanzar a la siguiente etapa. (3) Etapa de agotamiento: también conocida como cese de la respuesta de adaptación, lo que ocasiona agotamiento, enfermedades e incluso puede causar la muerte (Mucio, 2007).

1.2 DEFINICIÓN DE ESTRESOR Y SU CLASIFICACIÓN

Un estresor es un estímulo, condición o situación que altera la homeostasis, capaz de generar cambios fisiológicos y conductuales en respuesta a su exposición (Chu et al., 2021).

Los estresores se pueden clasificar de acuerdo con su grado de intensidad (leve, medio e intenso), su duración: agudo (una sola exposición por tiempo limitado) que puede durar segundos, minutos u horas o crónico (exposición prolongada y continua o intermitente) que puede durar días, semanas, meses o incluso años, de la frecuencia (número de exposiciones al estresor), así como del estado y constitución física del organismo (Retana-Márquez et al., 1996).

Los estresores pueden ser físicos o psicológicos. Los psicológicos son estímulos que afectan las emociones, causan miedo, ansiedad y frustración. Generalmente se definen como estímulos que amenazan el estado actual y se perciben en una condición

anticipatoria, por ejemplo, estímulos ambientales aversivos y situaciones relacionadas con las emociones. Los estresores físicos producen alteraciones del estado fisiológico, que alteran al organismo, por ejemplo, enfermedades, lesiones, condiciones ambientales, cambios bruscos de horario, privación del agua o alimento, entre otros (Joëls y Baram, 2009; Godoy et al., 2018).

1.3 SISTEMA DE ESTRÉS

La respuesta de estrés a los estresores es coordinada por los dos componentes principales del sistema de estrés. Una vez que estos ejes se activan en respuesta a un estresor, generarán una respuesta coordinada con el objetivo de restaurar la homeostasis (Godoy et al., 2018).

El eje LC-SAM responde a estresores que se presentan de manera aguda. Está constituido por estructuras nerviosas que forman parte del sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico. El Locus Coeruleus (LC) es un núcleo que está ubicado en el tallo cerebral, sintetiza y libera norepinefrina (NE) para estimular estructuras centrales y las vías eferentes del LC-SAM, que estimulan la secreción de las catecolaminas epinefrina y norepinefrina, tanto en las terminaciones nerviosas como en la médula adrenal. Los componentes del eje HHA se ubican en el hipotálamo, mediante las neuronas parvocelulares del Núcleo Paraventricular (PVN), encargadas de sintetizar y liberar la hormona liberadora de corticotropina (CRH), así como la hormona arginina vasopresina (AVP); la hipófisis, que libera la hormona adrenocorticotropina (ACTH) y la glándula suprarrenal la cual sintetiza y libera glucocorticoides (GC) (Charmandari et al., 2005).

La activación del eje HHA por exposición a un estímulo estresante crónico activa las neuronas parvocelulares del PVN, las cuales liberan CRH y AVP hacia el sistema porta-hipofisario, a través del cual llegan a los corticotropos de la adenohipófisis y promueven la síntesis de proopiomelanocortina (POMC). La maduración de esta prohormona genera al menos tres péptidos, entre ellos la ACTH (Ulrich-Lai y Herman, 2009). La AVP no estimula la síntesis de ACTH por sí misma, pero sí presenta una débil actividad sobre su liberación, ya que interacciona con la CRH para potenciar la secreción de ACTH (Eacker et al., 2008). La ACTH se libera hacia la vena hipofisiaria y de ahí a la circulación general, a través de la cual es transportada hacia la corteza suprarrenal, donde se une a sus receptores, específicamente en las células de la zona fascicular, donde estimula la síntesis y la liberación de los GC (cortisol en humanos y corticosterona en ratas) (McEwen y Akil, 2020) (figura 1). Estas hormonas ejercen asas de retroalimentación negativa en el hipocampo y en el hipotálamo; de esta manera el eje se autorregula, evitando que los GC sean liberados de manera excesiva.

Los GC son los productos finales del eje HHA; son hormonas esteroides (Hammes y Levin, 2007) y están involucrados en varios procesos fisiológicos que regulan diversas funciones cardiovasculares, metabólicas, inmunológicas y homeostáticas (Lee et al., 2015). Sin embargo, cuando se secretan en grandes cantidades y por tiempos prolongados, son considerados como un indicador de estrés (Romero, 2004).

EL funcionamiento del eje HHA por períodos cortos es esencial para las funciones vitales del organismo pero su activación prolongada puede ser perjudicial para la fisiología (Ketchesin et al., 2017) y puede causar reacciones que generalmente afectan a todos los sistemas del cuerpo, incluidos el sistema cardiovascular, el respiratorio, el

endocrino, el gastrointestinal, el nervioso, el muscular y, de manera importante para este trabajo, el reproductivo (Chu et al., 2021).

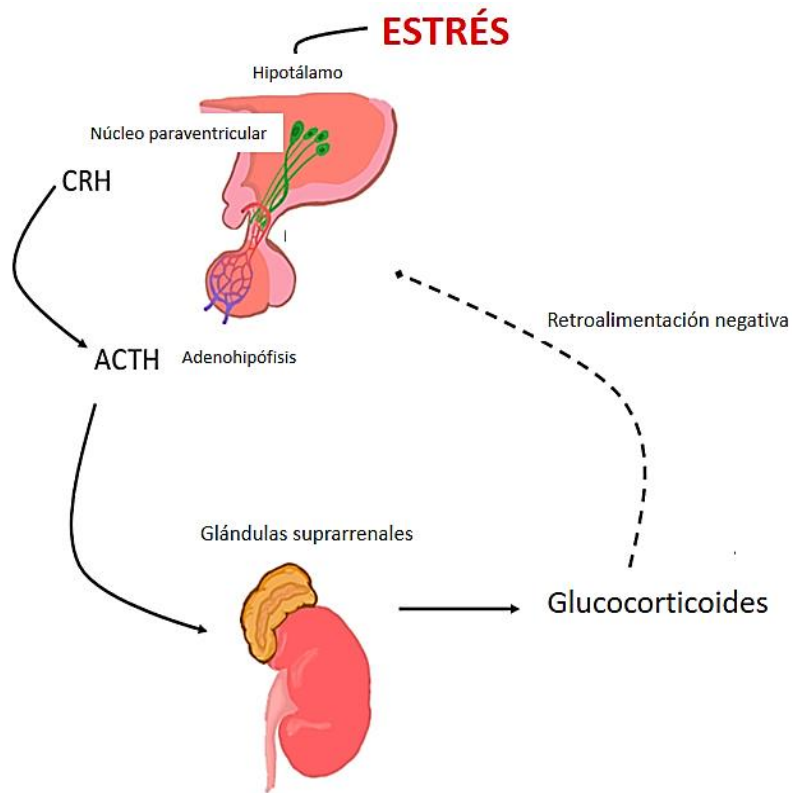


Figura 1. Regulación hormonal del eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) ante el estímulo de un estresor crónico. Líneas continuas: estimulación, líneas discontinuas: retroalimentación negativa (Adaptado de Burford et al., 2017).

1.4 SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO

El sistema reproductor masculino está conformado por dos testículos, dos epidídimos, dos conductos deferentes, las vesículas seminales, la próstata y el pene. Los testículos constan de asas de túbulos seminíferos revestidos de epitelio seminífero que contiene a las células germinales y las células de Sertoli (Barrett et al., 2013). En los testículos se llevan a cabo la producción de espermatozoides (espermatogénesis) y la síntesis de andrógenos (esteroidogénesis) (Sohni et al., 2019). La espermatogénesis se lleva

a cabo en el epitelio seminífero que reviste a los túbulos seminíferos de manera continua, en estrecha asociación con las células de Sertoli, mientras que, en las células de Leydig, que se localizan entre los túbulos seminíferos, se sintetizan los andrógenos, principalmente testosterona, la cual se requiere para el establecimiento y mantenimiento de las funciones reproductivas masculinas (Hu et al., 2008).

1.5 Eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT)

El eje HHT controla la función reproductiva a través de la señalización endocrina, que se origina con la liberación del neuropéptido Kisspeptina en el núcleo arcuato mediante sinapsis con los somas de las neuronas GnRH, localizadas en el área preóptica media del hipotálamo, las cuales expresan receptores para Kisspeptina. Este neuropéptido se une a su receptor Kiss1R, acoplado a proteína Gq en la membrana de las neuronas GnRH, donde induce la síntesis y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Las terminales nerviosas de estas neuronas se ubican en la eminencia media, donde la GnRH es secretada de manera pulsátil hacia el sistema porta-hipofisario, a través del cual la GnRH es transportada hacia los gonadotropos de la adenohipófisis. Este péptido se une a su receptor, acoplado a proteína Gq y desencadena mecanismos moleculares que culminan con la síntesis y liberación de las gonadotropinas, la hormona Luteinizante (LH) y la hormona Foliculoestimulante (FSH), hacia la vena hipofisaria (Stamatiades y Kaiser, 2018), (figura 2). La GnRH se une a su receptor acoplado a proteína Gq, esta proteína activa a la fosfolipasa C (PLC), dicha enzima hidroliza al fosfolípido membranar fosfatidil inositol difosfato (PIP₂), dando como resultado la formación de dos segundos mensajeros, inositol-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DGA). El IP₃ estimula la liberación de calcio desde el retículo

endoplásmico liso, aumentando así el calcio citoplasmático, el cual también favorece la liberación de las gonadotropinas. El DAG, por su parte, activa a la proteína cinasa C (PKC), las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Éstas a su vez fosforilan factores de transcripción, que se unen a regiones promotoras y favorecen la transcripción de los genes que codifican las subunidades alfa y beta de las gonadotropinas (Perrett y McArdle, 2013; Pincas et al., 2014). Las gonadotropinas LH y FSH son liberadas a la circulación periférica y transportadas hasta los testículos, donde regulan la espermatogénesis y la esteroidogénesis (Joseph y Whirledge, 2017).

Las células de Leydig, ubicadas en el intersticio que se forma entre los túbulos seminíferos, tienen receptores membranales para la LH, acoplados a proteína Gs. La FSH se une a su receptor, también acoplado a proteína Gs, ubicado en la membrana de las células de Sertoli. En ambos casos, la proteína Gs activa a la enzima adenilato ciclasa (AC), la cual sintetiza adenina monofosfato cíclico (AMPc) a partir de ATP. El AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila diversas proteínas estructurales, enzimas y factores de transcripción (Casarini y Crépieux, 2019; Przygodzka et al., 2021). En respuesta a la LH, las células de Leydig sintetizan enzimas esteroidogénicas que participan en la biosíntesis de testosterona. En respuesta a la FSH, las células de Sertoli sintetizan la proteína de unión a andrógenos (ABP), factores de crecimiento para el mantenimiento, la proliferación y diferenciación de las espermatogonias hasta espermatozoides (Dimitriadis et al., 2015).

Cuando las concentraciones de testosterona aumentan, ejercen retroalimentación negativa sobre las neuronas KNDy (Kisspeptina, Neuroquinina B y Dinorfina) en el núcleo arcuato del hipotálamo. La dinorfina inhibe la liberación de Kisspeptina y,

consecuentemente, la liberación de la GnRH hacia la adenohipófisis, disminuyendo así la síntesis de LH y FSH regulando así la actividad del eje (Kaprra y Huhtaniemi, 2018).

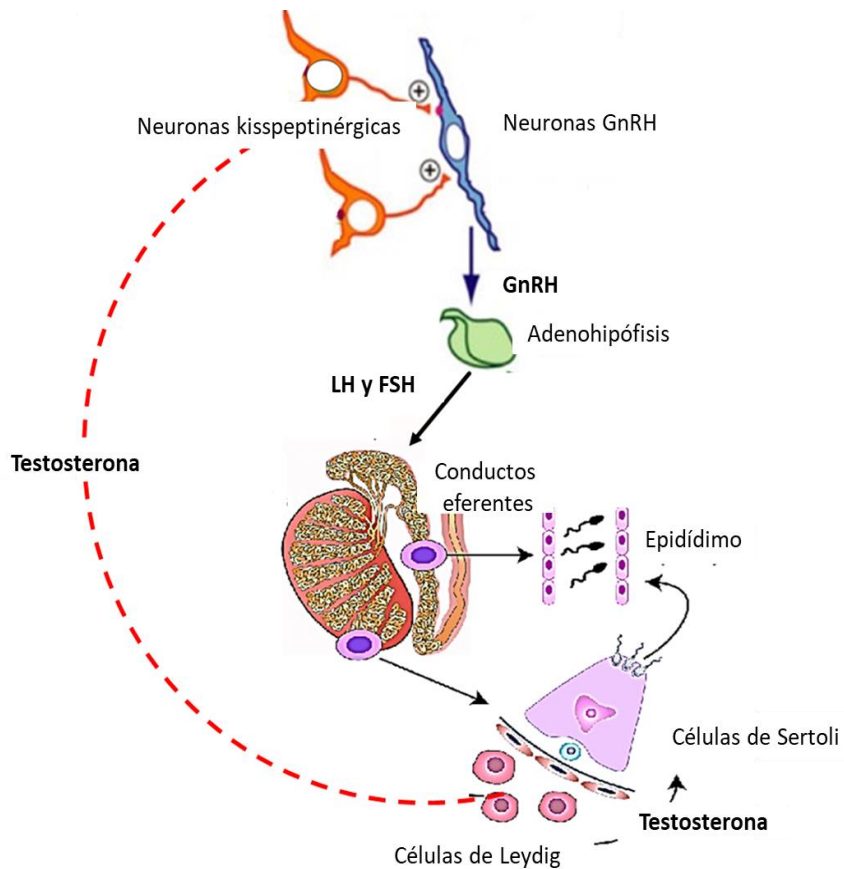


Figura 2. Regulación hormonal del eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT). Las neuronas Kisspeptinas estimulan a las neuronas GnRH. La GnRH liberada del hipotálamo estimula a los gonadotropos de la adenohipófisis para la síntesis y liberación de LH y FSH. FSH actúa en las células de Sertoli y LH en las células de Leydig donde se lleva a cabo la esteroidogénesis para la producción de testosterona. La testosterona ejerce retroalimentación negativa en la secreción de GnRH (Adaptado de Nixon et al., 2019).

1.6 Esteroidogénesis testicular

La esteroidogénesis es el proceso mediante el cual se producen hormonas esteroideas, biológicamente activas, a partir del colesterol. La testosterona es una hormona esteroidea que se produce en las células de Leydig (Wang et al., 2017) e importante para la expresión y modificación postraduccional de proteínas involucradas en la espermatogénesis y la espermiogénesis (Grande et al., 2022). Se ha establecido

que se requiere de la testosterona para la progresión de la meiosis en las células germinales, la liberación de los espermatozoides maduros y la síntesis de proteínas contra el daño oxidativo, entre otros (Smith y Walker, 2014).

Para que se lleve a cabo la esteroidogénesis, el colesterol libre es transportado de la membrana mitocondrial externa a la interna, por la acción de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), la cual es activada por la PKA, activada por el AMPc (Midzak et al., 2011). El transporte de colesterol hacia la mitocondria es seguido por la conversión de colesterol a pregnenolona, catalizada por la enzima citocromo P450_{scc} de escisión de la cadena lateral del colesterol, ubicada en la membrana mitocondrial interna. La pregnenolona que se deriva del colesterol es delta 5 ($\Delta 5$) es decir, que tiene un doble enlace entre los carbonos 5 y 6, la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) mueve este doble enlace desde el anillo B a los carbonos 4 y 5 en el anillo A, formando la delta 4 ($\Delta 4$). La mayoría de las principales hormonas esteroides biológicamente activas siguen la vía $\Delta 4$, a partir de la progesterona (P4), como es el caso de los roedores (Chen et al., 2022). Posteriormente, la P4 es hidroxilada en el carbono 17 para formar la 17 α -hidroxiprogesterona e inmediatamente en androstenediona por la enzima 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa. Por último, la androstenediona es convertida a testosterona por la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) (Wang et al., 2017; Miller y Auchus, 2011; Barbagallo et al., 2020) (figura 3).

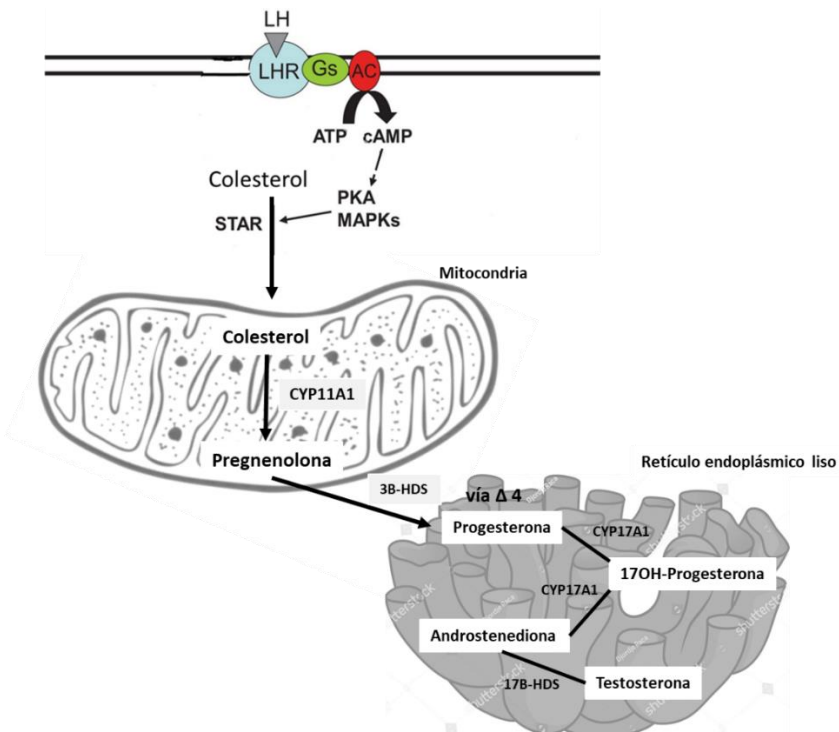


Figura 3. Vía de señalización de la esteroidogénesis testicular. La LH se une a su receptor en la membrana plasmática de las células de Leydig acoplado a proteínas Gs lo que conduce a la activación de la AC. La AC aumenta los niveles de AMPc a partir del ATP. El AMPc activa a la PKA. La PKA media la fosforilación de ciertas proteínas y se encarga de la transcripción de genes que codifican a enzimas que participan en la esteroidogénesis. La vía $\Delta 4$ está presente en los roedores (Adaptado de Wang et al., 2017).

1.7 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso de desarrollo, diferenciación y proliferación durante el cual las espermatogonias ($2n$) de tipo B que se dividen por mitosis entran en un proceso final de replicación del ADN llamada replicación premeiótica del ADN para dar lugar a los espermatoцитos primarios ($2N\ 4C$). Los espermatoцитos primarios llevan a cabo la primera división meiótica que es reduccional, es decir, una separación homologa del cual surgen dos espermatoцитos secundarios ($1N\ 2C$) que inmediatamente entran en la segunda división meiótica caracterizada por ser equitativa, con la separación de cromátidas hermanas, una en cada célula, dando lugar a las espermátidas ($1N\ 1C$) (Schimenty y Singh, 2018). Estas espermátidas finalmente se diferencian en espermatozoides morfológicamente maduros por el proceso de

espermioogénesis. Este proceso tiene lugar en los testículos principalmente dentro de los túbulos seminíferos donde también se encuentran las células de Sertoli (Du et al., 2021). La FSH actúa en las células somáticas de Sertoli, las cuales son esenciales para el mantenimiento, desarrollo e inmunoprotección de los espermatozoides a lo largo de la vida reproductiva. El tejido intersticial entre los túbulos seminíferos contiene vasos sanguíneos y linfáticos, macrófagos y células de Leydig, estas últimas dependen del estímulo de la LH para la producción de factores de crecimiento y la síntesis de testosterona, la cual es importante para el mantenimiento de la barrera hematotesticular, la progresión de la meiosis en las células germinales, la adhesión células de Sertoli-espermátidas, así como la liberación de los espermatozoides morfológicamente maduros (Walker, 2011; Grande et al., 2022). Las células mioideas peritubulares que rodean los túbulos seminíferos brindan soporte estructural, suministran factores de crecimiento y facilitan el movimiento de fluidos y espermatozoides por medio de contracciones peristálticas (Jan et al., 2012). En el caso de la rata, la espermatogénesis se divide en XIV etapas que constituye el ciclo del epitelio seminífero, el cual se define como la serie de cambios que tiene lugar en un área determinada del epitelio seminífero entre dos apariciones de la misma asociación celular, este ciclo tiene una duración de 48 a 52 días y consta de cuatro ciclos y medio (Leblond y Clermont, 1952).

La espermatogénesis se divide en tres fases: la espermatocitogénesis, que consiste en divisiones mitóticas sucesivas de las espermatogonias indiferenciadas diploides para dar lugar a las espermatogonias A diferenciadas (A1, A2, A3, A4). Estas espermatogonias se diferencian en espermatogonias intermedias (In) y nuevamente

se dividen por mitosis para formar las espermatogonias tipo B, estas células se dividen una vez más para diferenciarse en espermatocitos primarios, las células que entran al proceso de meiosis. En la meiosis I, los espermatocitos primarios en preleptoteno entran en la profase I, la cual se divide en las siguientes etapas: leptoteno; los cromosomas comienzan a condensarse, cigoteno; se forma el complejo sinaptonémico entre los cromosomas homólogos, comienza la sinapsis, paquiteno; entrecruzamiento, las cromátidas intercambian su material genético, diploteno; los complejos sinaptonémicos desaparecen pero los homólogos de cada tétrada permanecen unidos por los quiasmas y finalmente, la diacinesis; los cromosomas se condensan por completo, la membrana nuclear y el nucléolo se rompen en preparación para la siguiente fase de la meiosis I (Suede et al., 2023). En la metafase I, los cromosomas homólogos se alinean en el plano ecuatorial de la célula; en la anafase I, los cromosomas homólogos se separan y se mueven hacia los polos opuestos de la célula; en la telofase I, los cromosomas homólogos llegan a los polos de la célula y se condensan, y se forma una envoltura nuclear alrededor de cada conjunto de cromosomas. Posteriormente inicia la citocinesis, dando lugar a dos espermatocitos secundarios (Alberts et al., 2002; Cannarella et al., 2020). Los espermatocitos secundarios inician una segunda división meiótica. En la profase II los cromosomas se condensan nuevamente, los centriolos se duplican y se forman nuevos husos mitóticos, en la metafase II los cromosomas se alinean en la placa ecuatorial, los centriolos se ubican en los polos opuestos de la célula y las fibras del huso mitótico en cada polo de la célula se unen a cada una de las cromátidas, en la anafase II las cromátidas hermanas se separan y son atraídas hacia los polos opuestos debido a la acción del huso mitótico, en la telofase II los cromosomas se condensan y se forma la

membrana nuclear, finalmente en la citocinesis se completa la división celular para producir cuatro espermátidas, cada una con un número haploide de cromosomas (Gilbert, 2000). Posteriormente las espermátidas redondas se diferencian en espermatozoides morfológicamente maduros durante la espermiogénesis, este proceso involucra varios eventos citológicos, incluyendo la condensación y elongación del núcleo, ya que se reduce su tamaño e inicia la compactación de la cromatina por la sustitución de histonas por protaminas, esto provoca el cese de la transcripción en el núcleo (Suede et al., 2023). La formación del acrosoma a partir del aparato de Golgi, una vesícula secretora que cubre el núcleo del espermatozoide y contiene enzimas como: la acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas que son importantes en el proceso de la fertilización del ovocito (Jan et al., 2012). El flagelo surge del par de centriolos, longitudinal y proximal, que migran hacia el polo posterior de la espermátida. La formación del filamento axial surge del centriolo longitudinal. El filamento axial está compuesto por una estructura microtubular conocida como axonema que consta de 9 microtúbulos periféricos que rodean a 2 microtúbulos centrales y está equipado con dos brazos de dineína, y un puente de nexina, todo esto conforma la estructura interna axial del flagelo, que se requiere para la movilidad (Cannarella et al., 2020). Las mitocondrias localizadas en la periferia, se organizan de manera helicoidal alrededor de la base del flagelo para conformar la pieza intermedia de la espermátida en elongación. La pieza principal se extiende y finalmente se encuentra la pieza terminal que es la parte final del flagelo, cubierto por una vaina fibrosa que rodea a las fibras densas externas (Du et al., 2021). Finalmente, los espermatozoides resultantes son liberados a la luz del túbulo seminífero (figura 4).

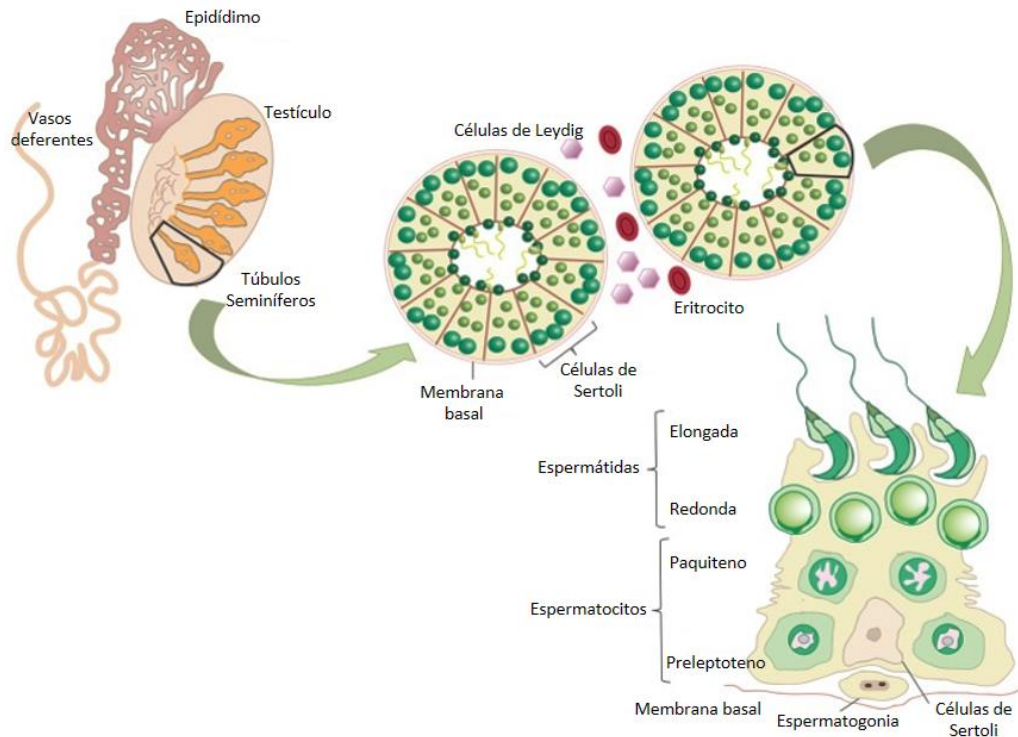


Figura 4. La espermatogénesis es el proceso por el cual se producen espermatozoides morfológicamente maduros, este proceso se lleva a cabo en los túbulos seminíferos. Las espermatogonias se encuentran en la membrana basal y llevan a cabo divisiones mitóticas para producir espermatocitos, estos espermatocitos entran en meiosis para posteriormente formar espermátidas que se diferencian en espermatozoides maduros estructuralmente. Las células de Sertoli y de Leydig proporcionan requerimientos (testosterona, factores de crecimiento, nutrientes, inmunoprotección etc.) que apoyan al proceso de la espermatogénesis (Adaptado de Redgrove y McLaughlin, 2014).

1.8 Epidídimo

El epidídimo es un túbulo largo y contorneado, que conecta a los conductos eferentes de los testículos con los conductos deferentes (James et al., 2020). Su principal función es proporcionar un entorno luminal para que los espermatozoides sean funcionalmente maduros, además de ser un órgano importante en el transporte, protección y almacenamiento de los espermatozoides. Está dividido en tres regiones anatómicas principales, cada una con características y funciones específicas, el caput, el corpus y la cauda (Bedford, 2015). Una de las funciones principales del segmento inicial y el caput es absorber agua que proviene del testículo, la presencia de acuaporinas y

canales iónicos garantiza el movimiento de iones como, el sodio, el cloruro, el potasio, el calcio y el bicarbonato (Da Silva et al., 2006). También se encuentra un gran número de células inmunitarias como, los macrófagos, los monocitos y las células dendríticas, estas células provienen principalmente del sistema inmunológico y migran al epidídimo vía torrente sanguíneo, los vasos sanguíneos en el epidídimo permiten que las células inmunitarias entren a este tejido, así mismo, las células epiteliales del epidídimo han desarrollado mecanismos innatos que luchan contra los patógenos entre ellos se encuentra la expresión de receptores tipo Toll (TLR), que son receptores innatos conservados evolutivamente que detectan estructuras moleculares asociadas a patógenos derivados de virus, bacterias, hongos etc. Los TLR se localizan en las células epiteliales principales de todo el conducto epididimario de la rata (Voisin et al., 2019). Estos componentes se encuentran a lo largo del epidídimo, su incremento en esta región en particular asegura las condiciones óptimas y de protección para los espermatozoides (Da Silva y Barton, 2016). El corpus y la cauda del epidídimo contribuyen a la maduración funcional de los espermatozoides que le van a conferir la adquisición de la movilidad progresiva, cambios en la membrana plasmática y el metabolismo para que adquieran ciertas características necesarias para poder fertilizar al ovocito (Dacheux y Dacheux, 2013).

El epidídimo de rata está compuesto de un epitelio cilíndrico pseudoestratificado de diferentes tipos de células, incluidas las células principales, basales, claras, estrechas, apicales y halo, algunas de estas células se encuentran en todas las regiones del epidídimo, mientras que otras se localizan en regiones específicas (Maynard y Downes, 2019). De manera general las células que conforman el epitelio del epidídimo

tienen una gran actividad metabólica, endocítica y secretora que está regulada principalmente por los andrógenos, estas células tienen la función del establecimiento de un ambiente luminal ácido, de la transferencia de proteínas a los espermatozoides y de proporcionar una barrera inmunoprotectora (Hermo y Robaire, 2002; Robaire y Hinton, 2006). Las células principales son el tipo de célula que se encuentra en todas las regiones del epidídimo y representa entre el 65 y 80 % del epitelio epididimario, tienen una alta actividad endocítica y secretora; al mismo tiempo, son células blanco, ya que cuentan con receptores para andrógenos y son las encargadas de la producción y liberación de los epididimosomas, que contienen proteínas, ARN no codificantes a los cuales se les ha asociado como reguladores de la expresión génica, su participación en la modificación de la cromatina y su implicación en la fertilización, ya que se han reportado ciertas deficiencias en estos procesos dependiendo de la carga útil de ARN no codificante en los espermatozoides (Cheuquemán y Maldonado, 2021). Los componentes que se encuentran dentro de los epididimosomas se transfieren desde el epitelio del epidídimo a los espermatozoides (Cornwall, 2009). También, las células principales se encargan de la liberación de los lípidos que ejercen cambios de remodelación y reposicionamiento en la membrana plasmática de los espermatozoides durante su paso por el epidídimo para otorgarle fluidez a la membrana, los cambios que se han reportado en roedores son, la disminución de los fosfolípidos plasmalógenos principalmente la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, el ácido esteárico también disminuye, mientras que el ácido palmítico aumenta. Los ácidos docosapentaenoico y docosahexaenoico aumentan en la cauda del epidídimo mientras que el contenido de colesterol disminuye aproximadamente un 65%. Estas modificaciones preparan a los espermatozoides para la capacitación y la reacción

acrosomal que tienen lugar en el tracto genital femenino y que son fundamentales para la fertilización (Ouvrier et al., 2009). Las células apicales y estrechas se localizan en el segmento inicial del epitelio del epidídimo y tienen actividad endocítica, estas células contienen una bomba de protones vacuolar (V-ATPasa), que secreta protones, y es necesaria para la acidificación intraluminal en el epidídimo. El pH del líquido intraluminal del epidídimo oscila entre un 6.4 – 6.8, estas concentraciones bajas de pH mantienen a los espermatozoides en un estado inactivo e inmóvil mientras maduran y se almacenan en el epidídimo (Kujala et al., 2007). De igual forma, las células claras tienen actividad endocítica, y se encuentran en el caput, corpus y cauda del epidídimo, siendo una de sus principales funciones fagocitar la gota citoplasmática que se libera de los espermatozoides durante la maduración (Cornwall, 2009; James et al., 2020). Las células basales se encuentran a lo largo de todo el epitelio del epidídimo, adhiriéndose a la membrana basal brindándole estructura, se le ha atribuido una función de protección frente a las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Sullivan y Belleannee, 2017). Por último, las células halo se encuentran en todo el epitelio del epidídimo, brindándoles protección a los espermatozoides, ya que son consideradas las células inmunitarias del epidídimo (Cheung et al., 2005). Dentro de la conformación del epidídimo existen varias proteínas como las claudinas y la ocludina, dependientes de andrógenos, que contribuyen a la formación de uniones estrechas y las uniones comunicantes formadas por las conexinas. Estas estructuras consisten en poros intercelulares alineados permitiendo el transporte de moléculas específicas. Así mismo, las uniones estrechas apicales entre las células epiteliales principales adyacentes son responsables de la formación de la barrera hemato-epididimaria, esta barrera tiene la función de inmunoprotección, regulando la entrada de moléculas a

través de estas células mediante receptores específicos, canales de agua, iones y proteínas transportadoras de solutos (Cyr et al., 2007; Cornwall, 2009; Zhou et al., 2018). Por lo tanto, la barrera hemato-epididimaria crea entornos específicos entre la luz y la circulación y dentro de las células epiteliales del epidídimo para la maduración de los espermatozoides (figura 5).

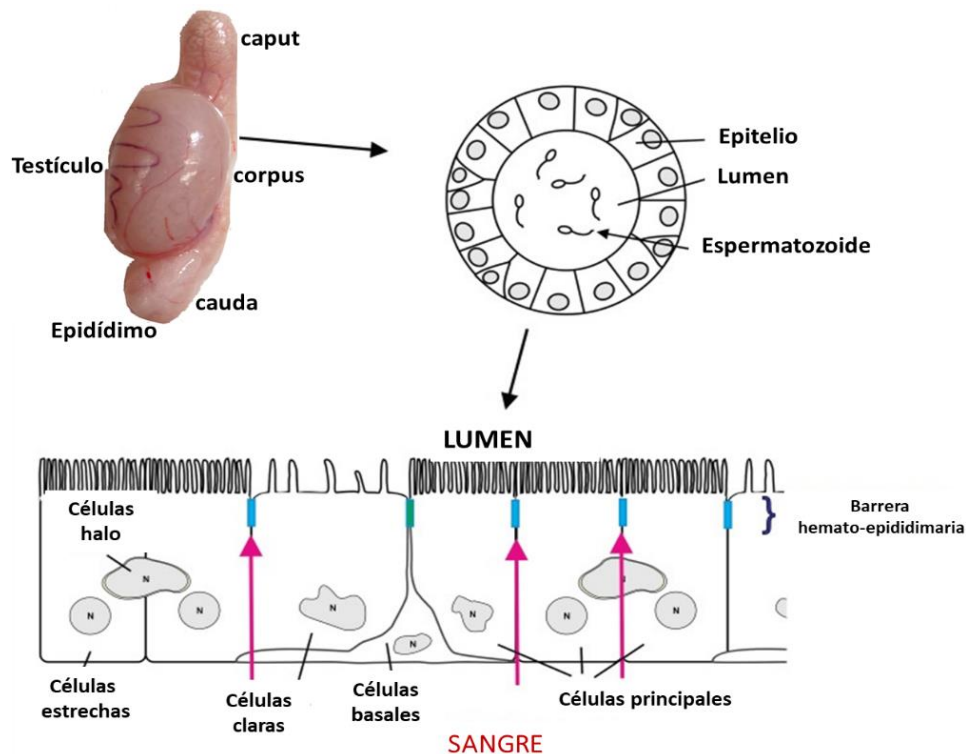


Figura 5. Esquema de la anatomía y estructura interna del epidídimo. La maduración de los espermatozoides ocurre en cada región durante su paso por el epidídimo y la interacción de los espermatozoides con el entorno luminal (Adaptado de Gregory y Cyr, 2014).

1.9 Regulación endocrina del epidídimo

La estructura y función del epidídimo depende principalmente de la T y sus metabolitos, la dihidrotestosterona (DHT) y el estradiol (E₂). La T sintetizada y liberada por las células de Leydig puede ingresar al epidídimo mediante dos vías diferentes. Puede entrar a través de los conductos eferentes uniéndose a la proteína transportadora de andrógenos (ABP) o a través de la circulación sanguínea (Robaire

y Hamzeh, 2011). La T unida a la ABP es absorbida por las células del epidídimo a través de un proceso mediado por receptores o por difusión pasiva, la T libre también puede ingresar a las células. La T dentro de las células se reduce a DHT, el andrógeno biológicamente más activo, por la enzima 5α -reductasa y en E₂ por la enzima P450 aromatasa (Hammond, 2011). La T y la DHT se unen al receptor de andrógenos (AR) que se localiza en las células principales, basales y apicales, principalmente en caput y corpus, mientras que el receptor a estrógenos (ER) se encuentra en el caput (ER α) y el (ER β) a lo largo del epitelio del epidídimo (Hamzeh y Robaire, 2010).

La DHT se une al AR para formar el complejo hormona-receptor que se dimeriza y se transloca al núcleo. El dímero se une al elemento de respuesta a andrógenos (ARE) en el ADN y actúa como un factor de transcripción para la expresión de genes que codifican proteínas que son importantes para el proceso de maduración funcional de los espermatozoides en el epidídimo (Hamzeh y Robaire, 2010).

1.10 Maduración epididimaria de los espermatozoides

Los espermatozoides provenientes del testículo son funcionalmente inmaduros e inmóviles, incapaces de fertilizar al ovocito. Durante su paso por el epidídimo, los espermatozoides experimentan una serie de cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos como parte de su proceso de maduración (Browne et al., 2016; Nixon et al., 2019) (figura 6).

En el epidídimo, la maduración de los espermatozoides depende exclusivamente de las secreciones presentes en el líquido circundante, constituido por proteínas lumbinales, iones y miRNA, los cuales son secretados por las células epiteliales que

recubren el epidídimo y las vesículas extracelulares o los epididimosomas, regulados por hormonas como la T principalmente, su metabolito la DHT y el E₂ (Zhou et al., 2018).

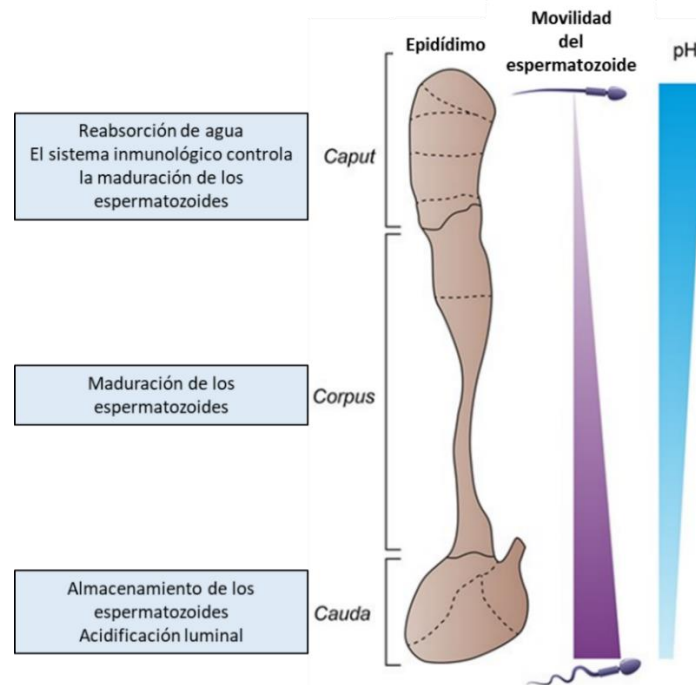


Figura 6. Segmentos del epidídimo y sus principales funciones. El epidídimo se compone de cuatro regiones anatómicas, el segmento inicial y el caput, el corpus y la cauda. Los espermatozoides interactúan con el microambiente durante su tránsito por el epidídimo para adquirir características funcionales (Adaptado de Chen et al., 2021).

La adquisición de la movilidad progresiva, involucra una serie de vías metabólicas y mecanismos reguladores dentro de los que destacan la vía del calcio (Ca^{2+}) y la proteína cinasa A (PKA), dependiente de AMPc, la cual fosforila proteínas en el flagelo del espermatozoide como la dineína, la tubulina, la cinasa de cadena ligera de miosina etc., y favorece la activación del batido flagelar y la generación de la fuerza motora para el desplazamiento del espermatozoide (Darszon et al., 2006; Pereira et al., 2017). Además, ocurren cambios en la membrana plasmática del espermatozoide, incrementando su fluidez mediante la disminución de colesterol y el aumento de los ácidos grasos poliinsaturados, así como la glicosilación de ciertas proteínas que son

importantes para el reconocimiento y la adhesión del espermatozoide con el ovocito (Gautier y Aurich, 2022). La transferencia de proteínas desde las células epiteliales del epidídimo a la membrana del espermatozoide es un proceso clave para su maduración. La proteína 1 de unión a los espermatozoides del epidídimo (ELSPBP1) tiene afinidad por los espermatozoides muertos que se encuentran en la cabeza y cuerpo del epidídimo, siendo esto un posible mecanismo para el control de la calidad de los espermatozoides. La proteína 6, relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP6) en la membrana de los espermatozoides, participa en la regulación de su movilidad (Björkgren y Sipilä, 2019). La proteína tipo 1, relacionada con la patogénesis del glioma (GLIPR1L1), es importante en la interacción entre los espermatozoides y la zona pelúcida del ovocito, las tetraspaninas como la CD9 y la CD81 contribuyen al reconocimiento y la fusión de las membranas espermatozoide-ovocito, así como la proteína IZUMO-1, que es esencial para la fertilización (Baker et al., 2012; Zhou et al., 2019; Chen et al., 2021). Otras proteínas, como la enzima glutatión peroxidasa 5 (GPX5), la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) y la catalasa (CAT) brindan protección a los espermatozoides dadas sus funciones para apagar las ERO (Chen et al., 2021). Así mismo, hay proteínas que desempeñan mecanismos importantes para la activación de la movilidad de los espermatozoides, los procesos de capacitación y reacción acrosomal; estas proteínas están relacionadas con la entrada de calcio, como la proteína secretora rica en cisteína 1 (CRISP1) y β -defensinas, que modifican la actividad de los canales iónicos y promueven la modulación de iones, principalmente calcio, en los espermatozoides (Belleannée et al., 2012; Weigel et al., 2018) (figura 7).

La compactación final de la cromatina en el núcleo de los espermatozoides ocurre en el epidídimo. Inicialmente este proceso se lleva a cabo durante la etapa de espermiogénesis donde se sustituyen las histonas por protaminas, proteínas ricas en arginina y cisteína. (Björndahl y Kvist, 2010). La oxidación de los grupos tiol (-SH) de los residuos de cisteína, forma los puentes disulfuro (-S-S), los cuales están implicados en el empaquetamiento del ADN. En el epidídimo, los grupos sulfhidrilo (-SH) son oxidados por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y se convierten en grupos sulfenilo (-SOH). Los -SOH son oxidados nuevamente por el H_2O_2 y se forman los (-S-S) con otro residuo tiol de otra cisteína unida al ADN, lo que da como resultado la compactación y estabilidad de la cromatina (D'Occhio et al., 2007; Juárez-Rojas et al., 2022).

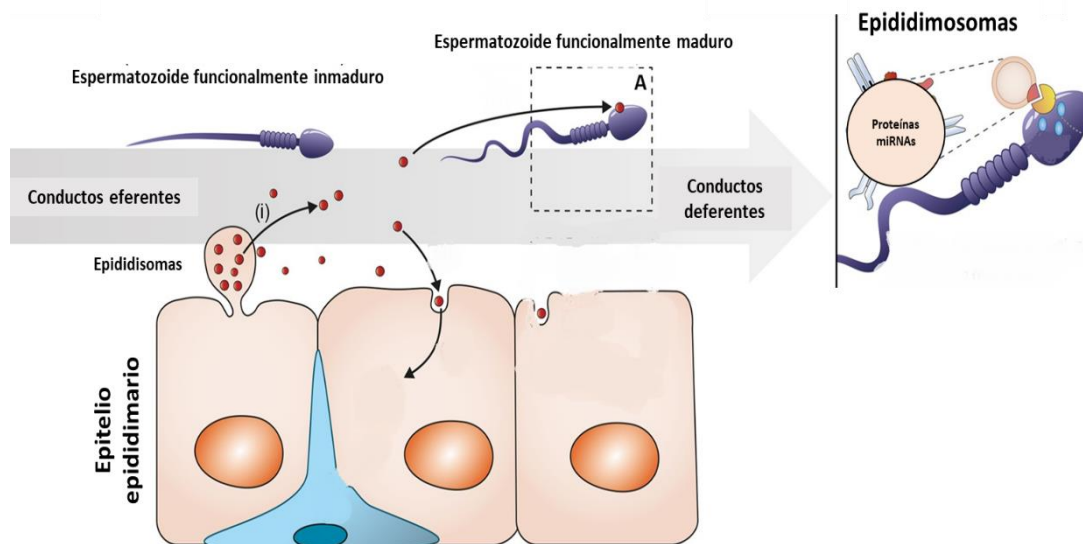


Figura 7. Comunicación intracelular espermatozoide-epidídimo. Las vesículas extracelulares o también llamados epididimosomas son los encargados de la comunicación para aportar al espermatozoide proteínas, miRNAs entre otros. La interacción de estas vesículas extracelulares se da con la región post-acrosomal del espermatozoide en maduración. (Adaptado de Chen et al., 2021).

En el epitelio del túbulo seminífero, durante la espermiogénesis, la mayor parte del citoplasma de las espermátidas es fagocitado por las células de Sertoli y solo un pequeño residuo citoplasmático al que se le conoce como gota citoplasmática o cuerpo

residual, se mantiene anclado al espermatozoide después de su liberación del epitelio seminífero. Durante el paso de los espermatozoides a través del túbulo epididimario se lleva a cabo la migración de la gota citoplasmática desde el cuello hasta el final de la pieza media. Esta migración se ha atribuido a los movimientos peristálticos del túbulo epididimario, a la presión que ejerce el flujo de agua dentro del epidídimo y el empuje físico entre los espermatozoides por su alta concentración (Cooper, 2005). En el caso de las ratas macho, la migración de la gota citoplasmática comienza dentro de los conductos eferentes y se completa en el caput del epidídimo (Cooper y Yeung, 2003).

1.11 Glándulas sexuales masculinas

Las glándulas accesorias del sistema reproductor masculino están formadas por epitelio cilíndrico pseudoestratificado. Estas glándulas producen las secreciones que contribuyen a la composición del semen para darle fluidez, mantenimiento y nutrición a los espermatozoides y son, la próstata y las vesículas seminales (Poiani, 2006). La actividad de las glándulas accesorias está bajo control endocrino de la T, la DHT y el E₂. El líquido seminal producido por estas glándulas contribuye al proceso de capacitación espermática, influye en la competencia espermática y en el proceso de fertilización, controla el pH y es inmunoprotector (Hopkins et al., 2017; Ramm, 2020).

La próstata es una glándula exocrina accesoria que consta de cuatro lóbulos en el caso de los roedores: el lóbulo anterior, el ventral, el dorsal y el lateral. El epitelio que conforma estos lóbulos consta de células epiteliales secretoras, células basales y una menor cantidad de células neuroendocrinas. Estos lóbulos están rodeados por tejido estromal compuesto principalmente por células de músculo liso y fibroblastos

intersticiales. Tanto las células estromales como las epiteliales expresan AR, ya que la próstata depende de los andrógenos para mantener su estructura y su funcionalidad (Peng et al., 2013; Ittmann, 2018). Así mismo, las células epiteliales son las que se encargan de secretar el líquido prostático que contiene iones como, el zinc, magnesio, calcio, fosfato y potasio; su composición hace que sea ligeramente alcalino, de apariencia lechosa o blanca, el cual contribuye a neutralizar la acidez en el tracto vaginal para la protección de los espermatozoides. También contiene lípidos y ciertas proteínas como la fibronectina y la prostatina, que desempeñan la función de coagulación y licuefacción del semen. El líquido prostático conforma la mayor parte de la porción del líquido seminal (Michael, 2018; Ittmann, 2018).

La próstata se encuentra rodeada a cada lado por las vesículas seminales. Cada vesícula seminal consta de un único tubo enrollado con extremo ciego, están conformadas por 3 capas. La primera capa está compuesta de epitelio pseudoestratificado con células caliciformes, denominada mucosa interna, la capa muscular compuesta por células de musculo liso y una capa compuesta de tejido areolar laxo (Noda y Ikawa, 2019).

Las vesículas seminales también secretan el líquido que posteriormente conformará el líquido seminal. Este líquido es alcalino, al igual que el líquido que se produce en la próstata, su composición consta de fructosa, un monosacárido que proporciona energía para los espermatozoides. También enzimas, vitamina C, prostaglandinas y proteínas como la semenogelina, esencial para la formación de una matriz similar a un gel que encierra los espermatozoides eyaculados, impidiendo la capacitación prematura (McKay et al., 2023).

Las vesículas seminales son órganos compuestos por tejido glandular secretor y músculo liso bajo influencia tanto simpática como parasimpática. La fase de emisión de la eyaculación, mediada por fibras simpáticas de los nervios hipogástricos, provoca contracciones de las vesículas seminales junto con la próstata, lo que da como resultado la expulsión de los espermatozoides y el líquido seminal a lo largo del pene (Lee et al., 2011; McKay et al., 2023).

1.12 Los espermatozoides en el oviducto

El proceso de fertilización consta de varios pasos como, la entrada de los espermatozoides al útero y al oviducto, la penetración de la capa que rodea al ovocito la cual está conformada por las células del cúmulo, la interacción del espermatozoide con el ovocito, la penetración de la zona pelúcida, la unión del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito, y finalmente la fusión de ambas células (Inoue et al., 2003).

Los espermatozoides después de la eyaculación no pueden fertilizar al ovocito inmediatamente. Para adquirir la capacidad fertilizadora, necesitan someterse a una serie de modificaciones bioquímicas y fisiológicas dentro del tracto reproductivo femenino, conocidas como capacitación, que consta de dos eventos esenciales para la fertilización: la hiperactivación, una movilidad flagelar asimétrica y vigorosa, y la capacidad de llevar a cabo la reacción acrosomal (Siu et al., 2021).

Solo un porcentaje muy bajo de espermatozoides es capaz de alcanzar la zona ampular o la unión ampular-ístmica del oviducto. Un paso crítico en el transporte de espermatozoides es su migración a través de la unión útero-tubárica (Tokuhiro et al.,

2012). Los espermatozoides que llegan a la zona del istmo se unen a las células epiteliales ciliadas del oviducto, este proceso está mediado por residuos de carbohidratos presentes en estas células y su interacción con proteínas presentes en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide (Suarez, 2002). Dicha interacción célula epitelial - espermatozoides tiene como función la formación de un reservorio de espermatozoides, como método de regulación para permitir que solo una pequeña cantidad de espermatozoides llegue al ovocito y, por lo tanto, reducir la posibilidad de polispermia (Mondéjar et al., 2012). Se ha postulado la hipótesis de que la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal depende de que estén capacitados (Coy et al., 2012).

1.13 Capacitación espermática

La capacitación se ha definido como la serie de eventos fisiológicos que ocurren en el espermatozoide para que sea capaz de fertilizar al ovocito (Smith y Yanagimachi, 1991). Cabe señalar que esta serie de eventos se asocia con la modificación de los lípidos de la membrana plasmática, cascadas de fosforilación, alcalinización del pH intracelular, aumento de la concentración de calcio intracelular e hiperpolarización del potencial de membrana plasmática de los espermatozoides (Ritagliati et al., 2018).

El primer evento que se lleva a cabo para dar inicio al proceso de capacitación es la eliminación del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide, la salida de colesterol favorece la reorganización de los microdominios lipídicos, promoviendo el aumento de su fluidez, la exposición de enzimas y de ligandos unidos a la membrana, los cuales son importantes para el paso de los espermatozoides entre las células del

cúmulo, la unión y adhesión a la zona pelúcida del ovocito y la permeabilidad de la membrana para la entrada de iones como el bicarbonato (HCO_3^-) y calcio (Ca^{2+}) (Ickowicz et al., 2012; Visconti, 2009).

El Ca^{2+} y el HCO_3^- presentes en el oviducto ingresan al citosol del espermatozoide a través de diferentes canales que incluyen el canal de calcio Catsper y el canal transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC), respectivamente (Aldana et al., 2021). También la P4 producida por las células del cúmulo interviene en el transporte de calcio y con ello el aumento de calcio libre intracelular. El HCO_3^- se ha asociado con el aumento del pH intracelular durante la capacitación y la activación de la enzima adenilato ciclasa soluble (ACs), que aumenta los niveles de AMPc y la PKA (Nishigaki et al., 2014). Asimismo, la activación de la PKA induce cambios en el potencial de membrana y aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, ya que modula la respuesta de los canales de calcio. La PKA fosforila varias proteínas en los residuos serina y treonina, activando, directa o indirectamente, varias proteínas cinasas o inhibiendo las proteínas fosfatasas (Oberheide et al., 2017), estas fosforilaciones están relacionadas con la capacidad de unión a la zona pelúcida y la adquisición de la movilidad hiperactivada (Jin y Yang, 2017).

1.14 Hiperactivación de la movilidad de los espermatozoides

La hiperactivación de la movilidad de los espermatozoides es un evento que se lleva a cabo en el oviducto, en la zona del istmo. Esta hiperactivación se describe como la movilidad vigorosa, con latidos flagelares asimétricos de alta amplitud. La hiperactivación ayuda a los espermatozoides a nadar eficazmente a través del moco

oviductal, escapar del reservorio de espermatozoides y atravesar la matriz del cúmulo y la zona pelúcida del ovocito (Hunter, 2012).

Se han establecido diferentes vías por las cuales se da la hiperactivación de la movilidad, uno de los desencadenantes principales es el aumento de Ca^{2+} intracelular, el cual está modulado por la P4, ya que se ha establecido que esta hormona activa los canales Catsper ubicados en la pieza principal del flagelo, favoreciendo la entrada de calcio extracelular presente en el oviducto (Chang y Suarez, 2010). Se ha establecido que la cadena ligera del brazo de la dineína (proteína motora) tiene un sitio de unión para Ca^{2+} y podría regular la actividad motora de la dineína en respuesta a la unión de este ion (Yoshida y Yoshida, 2011). Se ha descrito la participación de las ERO en la activación de la movilidad hiperactivada. El HCO_3^- que entra al citosol del espermatozoide y el anión superóxido (O_2^-), que es producido por la NADH oxidasa 5 (NOX5), que se encuentra en la membrana plasmática del espermatozoide, activan a la ACs, aumentando el AMPc a partir del ATP (Ijiri et al., 2013). Este AMPc activa a la PKA y ésta a su vez fosforila residuos de tirosina en las proteínas ubicadas en la pieza principal y la vaina fibrosa del flagelo del espermatozoide, como las proteínas de anclaje a la cinasa A (AKAPS), la dineína que promueve el desplazamiento de los microtúbulos debido a su actividad ATPasa, y la tubulina que se encuentra en el filamento axial del axonema (Thompson et al., 2013; Pereira et al., 2017). Además, la PKA también activa a la proteína tirosina cinasa (PTK), pero también H_2O_2 producido por la NOX5 activa a la PTK e inhibe a la fosfotirosina fosfatasa (PTP) con la finalidad de tener una fosforilación sostenida, lo que conlleva al aumento acelerado y asimétrico del movimiento flagelar (Coy et al., 2012; Lestari et al., 2018).

1.15 Reacción acrosomal

El acrosoma es una vesícula secretora que se forma a partir del aparato de Golgi durante el proceso de la espermiogénesis. Se localiza en la parte apical de la cabeza del espermatozoide; consta de una membrana acrosómica interna (IAM) que está por encima de la envoltura nuclear y una membrana acrosómica externa (OAM) que está debajo de la membrana plasmática y es fusogénica (Berruti y Paiardi, 2011). Las principales funciones del acrosoma son: 1) fungir como sitio para el almacenamiento y liberación de enzimas necesarias para unirse y penetrar la zona pelúcida y 2) permitir que los espermatozoides se fusionen con la membrana del ovocito (Darszon et al., 2011). El acrosoma está conformado por una estructura conocida como matriz acrosómica, la cual está compuesta por diferentes proteínas como las proteasas, las glucosidasas y proteínas de unión. Dentro de las proteínas que se encuentran en esta matriz destacan la pro-acrosina, la cual se convierte en acrosina debido al aumento del pH dentro del acrosoma; esta enzima desempeña funciones proteolíticas dentro de los mismos componentes que conforman la matriz acrosómica. La hialuronidasa está implicada en la hidrólisis del ácido hialurónico, que se encuentra en la matriz extracelular de los ovocitos con la finalidad de que los espermatozoides lleguen a la zona pelúcida, la sp56 o ZP3R es una proteína de reconocimiento y unión a la proteína ZP3 ubicada en la zona pelúcida del ovocito, la ZPBP1, proteína de unión con la ZP1 del ovocito, la n-acetilglucosaminidasa, que facilita la penetración de los espermatozoides a través de la zona pelúcida, entre otras (Buffone et al., 2008; Foster y Gerton, 2016; Khawar et al., 2019).

La reacción acrosomal es un proceso de exocitosis inducido por el contacto del espermatozoide con el ovocito. Antes de la interacción con el ovocito los espermatozoides pasan por procesos bioquímicos en el tracto reproductivo femenino, que se denomina capacitación, para posteriormente llevar a cabo la reacción acrosomal el cual es un evento previo para la fertilización, permitiendo que los espermatozoides puedan atravesar la zona pelúcida, unirse a la membrana plasmática del ovocito y fusionarse con él (Ikawa et al., 2010; Finkelstein et al., 2020).

En el oviducto, específicamente en la zona ampular, se lleva a cabo la fertilización; previo a este proceso, se lleva a cabo la reacción acrosomal la cual responde a señales quimiotácticas, como la P4, que se produce por las células del cumulo del ovocito y se encuentra también en el líquido folicular que se incorpora al oviducto durante la ovulación (Yoshida y Yoshida, 2011), la glicoproteína ZP3 de la zona pelúcida y el Ca^{2+} contenido dentro del oviducto (Sun et al., 2011). Los mecanismos por los que la P4 y la ZP3 inducen la reacción acrosomal involucran la presencia de receptores ubicados en la membrana plasmática de los espermatozoides (Coy et al., 2012). Una vez que las moléculas de señalización en la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide se encuentran con la zona pelúcida, se produce la transducción de señales y se acelera la fusión de la OAM con la membrana plasmática. Los componentes acrosómicos recién expuestos ayudan a la penetración de los espermatozoides a través de la ZP. En el microambiente en la periferia de la matriz acrosómica expuesta, el pH intraacrosomal ácido aumenta para acercarse a las condiciones neutras del medio circundante, lo que lleva a la activación de las proteasas acrosómicas (Nakanishi et al., 2001). Finalmente, la exposición al medio externo de

los componentes acrosómicos se dispersan gradualmente como resultado de sus propiedades de solubilidad inherentes (Kim et al., 2001; Kim y Gerton, 2003).

Los espermatozoides que experimentan la reacción acrosomal espontánea pueden anular el proceso de fertilización. Además, se requiere un acrosoma intacto para la quimiotaxis de los espermatozoides con el ovocito, lo que indica que los espermatozoides que realizan una reacción acrosomal espontánea antes de llegar a los alrededores del ovocito, no responderían a las señales quimiotácticas del ovocito (Guidobaldi et al., 2017; Grinshtain et al., 2022).

1.16 Vía de señalización de la reacción acrosomal

La ZP3 y la P4 estimulan la entrada de calcio extracelular al espermatozoide por medio de la activación de canales de Ca^{2+} , ubicados en la membrana plasmática del espermatozoide, esta afluencia causa aumento intracelular de Ca^{2+} , que comienza en el segmento ecuatorial y luego se extiende por toda la cabeza del espermatozoide, así como la movilización de Ca^{2+} dentro del acrosoma (Pietrobon et al., 2003; Abi et al., 2016).

La modulación de los canales de calcio está regulada por el potencial de membrana, ya que la hiperpolarización de la membrana plasmática que se produce durante la capacitación (< -60 mV), permite el funcionamiento de canales de calcio activados por voltaje bajo (tipo T), que se abren por la acción de la ZP3, induciendo la despolarización de la membrana plasmática. Por otro lado, la P4 también puede promover la despolarización por la activación de canales operados por voltaje, como el canal Catsper y el canal transportador de sodio-iones de hidrógeno (Na^+/H^+)

permitiendo la entrada de Na^+ y la salida de iones de hidrógeno H^+ (Patrat et al., 2000; Stival et al., 2016). También la fosforilación de proteínas está implicada en la modulación de los canales de Ca^{2+} ; se ha propuesto que la P4 estimula a la proteína cinasa C (PKC) mediante una activación dependiente de diacilglicerol (DAG) (Patrat et al., 2000; Aldana et al., 2021). La salida del Ca^{2+} contenido dentro del acrosoma está regulado por el inositol-3-fosfato (IP3) que se sintetiza en respuesta a la P4 después de la hidrólisis del fosfatidilinositol-bifosfato (PIP2) por la fosfolipasa C delta 4 ($\text{PLC}_{\delta 4}$) ubicada en la membrana plasmática de los espermatozoides. Cuando el IP3 se une a su receptor (IP3R), ubicado en la OAM, activa la apertura del canal de Ca^{2+} , siendo liberado al citosol (Patrat et al., 2000; Sosa et al., 2016; Aldana et al., 2021). Otra vía involucrada en la movilización interna de Ca^{2+} es por la apertura de otro canal de calcio en la OAM activado por nucleótidos o un canal abierto tras la fosforilación por la proteína cinasa A (PKA). Al unirse la ZP3 a su receptor acoplado a proteína Gs, estimula la activación de la AC, aumentando los niveles de AMPc en los espermatozoides (Kobori et al., 2000; Finkelstein et al., 2020). El aumento de AMPc activa a la proteína de intercambio activada directamente por AMPc (EPAC) que actúa como mensajero para posteriormente activar a la proteína Rab3 y esta a su vez activar a las proteínas de fijación NSF soluble (SNARE). Así mismo, el aumento de calcio libre en el citosol activa también a las proteínas SNARE y la sinaptotagmina (SYT) asociadas a proteínas relacionadas con el transporte celular, como es la calmodulina, permitiendo la fusión entre membranas y finalmente la reacción acrosomal (Miller et al., 2016; Prajapati et al., 2022). (Aldana et al., 2021) (figura 8).

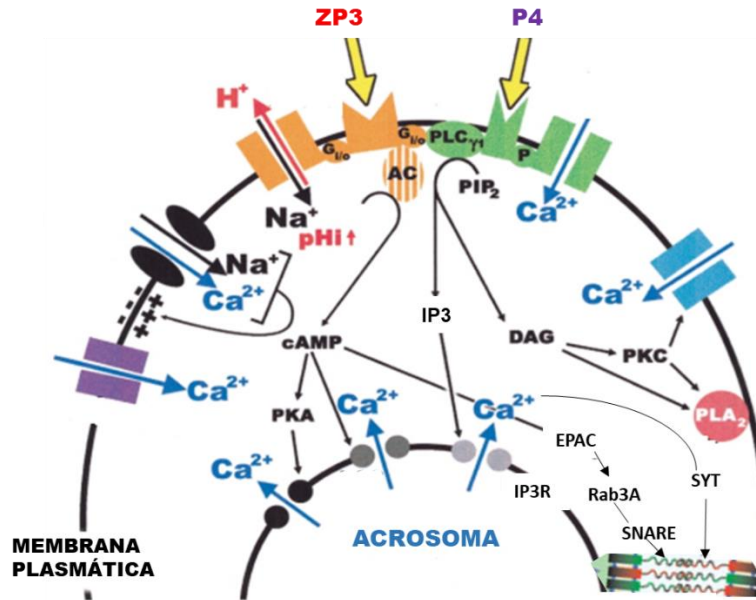


Figura 8. Vía de señalización de la reacción acrosomal. La progesterona (P4) y la ZP3 activan vías de señalización al hacer contacto con la membrana plasmática del espermatozoide, probablemente debido a la presencia de receptores. La P4 activa a la fosfolipasa C (PLC) y produce inositol-trifosfato (IP3) a partir de inositol-4,5-bisfosfato (PIP 2). El IP3 se une con su receptor, localizado en la membrana acrosomal y favorece la secreción de Ca^{2+} desde el acrosoma. La ZP3 se une a su receptor G_i activa a la AC y aumenta los niveles de AMPc, el AMPc activa a la PKA. El AMPc y la PKA activan canales de calcio en la membrana acrosomal para la secreción de calcio, también activan proteínas importantes para la fusión de membranas. El aumento sostenido de calcio para que se lleve a cabo la reacción acrosomal. (Adaptado de Aldana et al., 2021 y Patrat et al., 2000).

2 ANTECEDENTES

2.1 Efectos del estrés en la reproducción masculina

El estrés puede causar una disminución de la conducta sexual, inhibir la función reproductiva y, en consecuencia, la fertilidad (Geraghty et al., 2015). Se ha demostrado que la exposición crónica a diferentes estresores causa efectos negativos en la reproducción masculina, por lo que el estrés crónico se ha propuesto como un factor disruptivo, ya que disminuye la síntesis de T, la espermatogénesis y la conducta sexual (Retana-Márquez et al., 2015).

En diversos estudios se ha observado que la activación del eje HHA causa alteraciones en todos los niveles del eje HHT. Estas alteraciones están relacionadas con la presencia de receptores para los GC en cada nivel del eje HHT, afectando de manera

negativa la síntesis de hormonas y otros mecanismos de regulación en los testículos y, por lo tanto, la fertilidad masculina (Hampl y Stárka, 2020). Cuando el eje HHA se activa, se sintetizan y secretan las hormonas CRH, ACTH, β -endorfinas y GC. Los altos niveles de estas hormonas afectan la función del eje HHT (Joseph y Whirledge, 2017), actuando de manera inhibitoria sobre las neuronas GnRH, los gonadotropos hipofisarios y los testículos. La presencia de receptores para glucocorticoides y receptores para CRH en las neuronas Kisspeptinérgicas podría suprimir la función reproductiva en condiciones de estrés y afectar la liberación de la GnRH en el hipotálamo, lo que resultaría en una disminución en la síntesis y la liberación de LH en la hipófisis (Ozawa, 2021; Whirledge y Cidlowski, 2017).

Se han descrito también otras vías de señalización a nivel hipotalámico como las neuronas Kisspeptina, las cuales pueden ser reguladas por hormonas liberadas durante el estrés, principalmente los GC y afectar la síntesis y liberación de la GnRH (Acevedo et al., 2018; Hampl y Stárka, 2020). Los neuropéptidos como la kisspeptina estimulan directamente la síntesis y liberación de la GnRH, así como la hormona inhibidora de las gonadotropinas (GnIH) en aves, o el péptido 3 relacionado con la RFamida (RFRP-3) en mamíferos, que actúa tanto en el hipotálamo como en la hipófisis para suprimir la síntesis y liberación de la GnRH, las gonadotropinas y, con ello, la inhibición de la actividad del eje reproductivo HHT (Iwasa et al., 2018) (figura 9).

Las neuronas RFRP3 se localizan en el núcleo dorsomedial del hipotálamo, el cual tiene un papel esencial en las respuestas neuroendocrinas y conductuales durante el estrés. Estas neuronas envían prolongaciones axónicas hacia varios núcleos del

cerebro, como el núcleo anteroventral periventricular (AVPV), el área preóptica (POA), el área del infundíbulo y el núcleo arcuato, donde también se encuentran neuronas kisspeptinérgicas, la ubicación de estas neuronas depende de la especie (Acevedo et al., 2018). El receptor para RFRP3, es un receptor acoplado a proteína G_i (GPR147) que se localiza en regiones del hipotálamo, en la hipófisis y en las gónadas. Se ha descrito que la unión del RFRP3 con su receptor inhibe la secreción de LH inducida por GnRH mediante la inhibición de la señalización de la AC, de AMPc y la fosforilación de ERK, que es mediada por la inhibición de la vía de la PKA (Bentley et al., 2006; Ubuka et al., 2012).

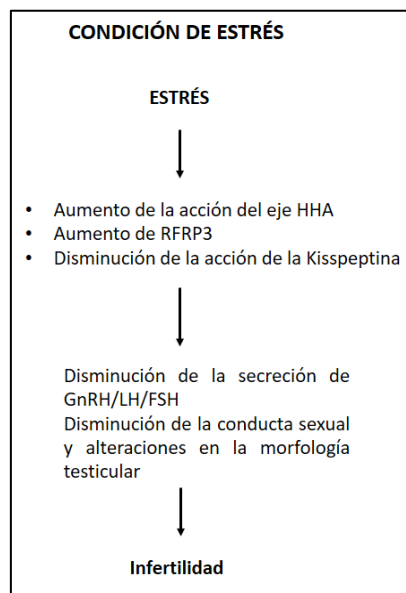


Figura 9. Condición de estrés. La actividad de la Kisspeptina disminuye ante el aumento de la actividad del neuropéptido RFRP-3, debido a una condición de estrés. Estos cambios contribuyen a inhibir la actividad del eje HHG. La regulación del RFRP-3 por el aumento en las concentraciones de los glucocorticoides disminuye la conducta sexual, causa alteraciones en la morfología y, en consecuencia, puede causar infertilidad. (Adaptado de Iwasa, 2018).

Ante una situación de estrés, se activa el eje HHA y, con ello, la síntesis y liberación de los GC desde la corteza suprarrenal. Las neuronas RFRP3 ubicadas en el núcleo dorsomedial del hipotálamo expresan receptores para GC. El aumento del neuropéptido RFRP3 a causa del estrés, actúa en las neuronas KNDy del núcleo

arcuato uniéndose a su receptor en dichas neuronas. Estudios previos en roedores han mostrado que el RFRP3 puede disminuir la expresión y la actividad de la Kisspeptina y con ello afectar la secreción de GnRH y, por consiguiente, causar la disminución de LH y FSH (Acevedo et al., 2018; Iwasa et al., 2018). Además, las neuronas RFRP3 hacen sinapsis con las neuronas KNDy del núcleo arcuato, siendo esta otra vía de inhibición por parte del RFRP3 (Hu et al., 2019).

Estudios realizados en roedores han demostrado que, durante el estrés, los GC estimulan la liberación del neuropéptido RFRP3 desde el núcleo dorsomedial, ya que dichas neuronas presentan receptores para GC (Gojska y Belsham, 2014). El RFRP3 actúa inhibiendo al eje HHT, suprime la liberación de LH y el comportamiento sexual (Iwasa et al., 2017). Los resultados de un estudio realizado en ratas macho adultas que fueron expuestas a estrés crónico por inmovilización (14 días, 3 h /día) mostraron un aumento en los niveles del ARNm que codifica para RFRP en el núcleo dorsomedial 24 h después del final de la inmovilización. Además, se observaron receptores para CRH y corticosterona en las neuronas RFRP3, lo que indica que los GC suprarrenales pueden tener una acción indirecta a través de estas neuronas (Kirby et al., 2009). El aumento en la actividad de las neuronas RFRP3 en el núcleo dorsomedial del hipotálamo se mostró en un estudio realizado en ratas macho que fueron estresadas por descargas eléctricas en las patas (0 o 0.8 mA, 50 Hz, 1 s de duración) en intervalos de 30 s durante 30 min, una sola exposición (Kaewwongse et al., 2011). Estos datos son consistentes con la idea de que las neuronas RFRP desempeñan un papel en las respuestas neuroendocrinas y conductuales a los estímulos estresantes en ratas.

En los testículos, particularmente en las células de Leydig, los GC inhiben la esteroidogénesis inducida por estrés, al afectar la expresión de los genes que codifican las enzimas esteroidogénicas, así como su función (Whirledge y Cidlowski, 2013; Hampl y Stárka, 2020). Así mismo, disminuye el número de receptores para LH en la membrana de las células de Leydig (Parthasarathy y Balasubramanian, 2008). Estudios realizados en ratas expuestas a estrés crónico y cultivo de células testiculares con tratamiento de corticosterona causa disminución del receptor para LH (Whirledge y Cidlowski, 2017).

Cabe señalar que cada una de estas alteraciones a nivel del eje HHT en machos de diferentes especies por influencia del estrés crónico repercute de manera directa en los testículos, particularmente en las células de Leydig, causando disminución en la síntesis y liberación de T, lo que altera espermatogénesis y la calidad de los espermatozoides, alterando la fertilidad masculina (Retana-Márquez et al., 2015; Ilacqua et al., 2018).

El estrés crónico por inmersión en agua fría en ratas macho, aplicado por 20 ó 50 días consecutivos, causa disminución de la conducta sexual, además de signos de degeneración en los túbulos seminíferos, tales como vacuolización del epitelio seminífero, núcleos picnóticos en las células germinales, descamación de células germinales hacia la luz del tubo seminífero (Juárez-Rojas et al., 2017), así como disminución del área del epitelio seminífero en las etapas I a VIII. Estas alteraciones se relacionan con la disminución de la testosterona y el incremento de la corticosterona, ocasionando una baja fertilidad, ya que el número de crías disminuye con el mayor lapso de días de estrés (Retana-Márquez et al., 2014).

Los altos niveles de GC promueven procesos apoptóticos disminuyendo el número de células de Leydig, siendo éstas las responsables de sintetizar y secretar testosterona (Hardy et al., 2005). Estudios realizados en cultivos de células de Leydig de ratas mediante la administración de corticosterona, mostraron un aumento de la proteína Fas y su receptor Fas, lo que activa la caspasa 8, característica de la activación de la vía apoptótica extrínseca (Whirledge y Cidlowski, 2013). En otro estudio realizado en ratas que fueron expuestas a estrés crónico se aportaron pruebas claras de que la apoptosis fue inducida por los receptores para GC (Chen et al., 2012). Así mismo, en ratas expuestas a estrés crónico por inmovilización se observó un aumento en la activación de la caspasa-9 y de la caspasa-3 y en el número de células de Leydig apoptóticas, en este mismo estudio el bloqueo de los receptores para GC intratesticulares disminuyó la acción pro-apoptótica, sin afectar los efectos anti-apoptóticos (Andric et al., 2012; Hampl y Stárka, 2020). También se ha demostrado que el estrés crónico por inmersión en agua fría, aplicado a ratas macho, induce apoptosis en las células germinales testiculares, tanto por la vía intrínseca como la extrínseca, mientras que en ratas macho expuestas a estrés agudo, el porcentaje de células germinales y túbulos apoptóticos aumenta durante la primera hora después de la exposición al estrés, activando las caspasas 3 y 8, importantes efectores de la apoptosis (Juárez-Rojas et al., 2015).

Los efectos del estrés crónico se han relacionado con la presencia de receptores para GC en las células de Leydig, de Sertoli y en las células germinales (Harza et al., 2014) y se ha observado que los altos niveles de GC durante el estrés inducen apoptosis en todos los tipos celulares del testículo (Maeda et al., 2015).

2.2 Efecto del estrés en la calidad de los espermatozoides

En los hombres el estrés laboral, los eventos de la vida e incluso la tensión social o los eventos estresantes que se presenten en la vida de manera simultánea, pueden tener un impacto negativo en la calidad de los espermatozoides (Anderson et al., 2010). Hombres que han participado en tratamientos de infertilidad o que han sido expuestos a fuertes eventos estresantes, como las guerras o los desastres ambientales (Gollenberg et al., 2010; Abu-Musa et al., 2007), muestran baja concentración espermática, apoptosis de células de Leydig y de células germinales (Ilacqua et al., 2018), movilidad espermática reducida, así como anomalías en la morfología de los espermatozoides (Janevic et al., 2014).

Estudios realizados en ratas, como modelo experimental, que fueron expuestas a estrés por inmovilización durante 5 horas al día por 15 días consecutivos y restricción aguda a partir de 30 minutos demostraron que el estrés crónico puede causar disminución significativa en la movilidad, en el número de espermatozoides, en la capacidad de fertilización y en el daño a las células germinales (Ren et al., 2010; Dhanabalan et al., 2011). En otro estudio se observó que el estrés por nado forzado en ratas macho adultas, durante 3 min diarios, por 50 días consecutivos, induce disminución en la concentración espermática, así como en la movilidad total y progresiva de espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo (Saki et al., 2009). El estrés crónico por inmersión en agua fría causa disminución de la viabilidad, la concentración y la movilidad total de los espermatozoides a los 20, 40 y 50 días después de la exposición al estresor (Juárez-Rojas et al., 2015). Así mismo, causa efectos negativos importantes en la morfología del espermatozoide ya que altera el

proceso de maduración de los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo y es posible que las alteraciones observadas en la movilidad, morfología y recuento de espermatozoides puedan estar correlacionadas con niveles elevados de ERO en los testículos (García-Díaz et al., 2015).

Se ha reportado que el estrés crónico por derrota en ratas macho causa atrofia testicular y epididimaria, así como disminución del número y la movilidad espermática (Wang et al., 2017). El estrés crónico en ratas causa alteraciones en la morfología, disminución del peso y del volumen en los túbulos seminíferos, así como disminución de la viabilidad (46 %) y de la movilidad (19 %) (Ribeiro et al., 2018). Los efectos causados por el estrés sobre el testículo y los parámetros espermáticos en las ratas se mantienen aún después de cuatro meses de la interrupción de la exposición al estresor (Nirupama et al., 2013).

El análisis espermático en ratas macho estresados crónicamente, muestra disminución significativa en la concentración y viabilidad espermática, así como reducción en la movilidad progresiva en los espermatozoides epididimarios. Todos estos cambios se han asociado con el aumento de la corticosterona, que es un indicador importante de estrés (Li et al., 2020; Juárez-Rojas et al., 2015; García-Díaz et al., 2015).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la sociedad moderna el estrés ha ido en aumento, generando alteraciones en la función reproductiva. Estas alteraciones se han observado en todos los niveles del eje HHT y sus efectos están relacionados con las hormonas del eje HHA. Sin embargo,

aún no hay suficientes estudios sobre los efectos del estrés crónico en la calidad y funcionalidad espermática.

4 JUSTIFICACIÓN

Si bien diversos estudios sobre el estrés han demostrado sus efectos adversos en los testículos y en los espermatozoides, aún no están completamente definidas las posibles alteraciones que pueda causar en los espermatozoides. Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió el efecto que tiene el estrés físico-psicológico en los espermatozoides; los resultados obtenidos proporcionan información que ayude a identificar una de las posibles causas de la infertilidad masculina, relacionada con la calidad de los espermatozoides.

5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿De qué manera afecta el estrés crónico la calidad de los espermatozoides epididimarios y la reacción acrosomal de ratas macho adultas?

6 HIPÓTESIS

El estrés crónico inducirá disminución de la respuesta del eje testicular en relación con la activación del eje adrenal, lo cual causará disminución en la calidad de los espermatozoides epididimarios, así como alteraciones en la reacción acrosomal.

7 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del estrés crónico en los espermatozoides de ratas macho adultas.

7.1 Objetivos específicos

- ✚ Evaluar el efecto del estrés crónico en la calidad de los espermatozoides de ratas macho adultas.
- ✚ Determinar la relación entre las respuestas del eje adrenal y del eje testicular durante el estrés crónico.

8 Metodología

8.1 Declaración ética

Los procedimientos experimentales utilizados en este proyecto están apegados a la reglamentación de animales domésticos y de laboratorio considerada en los Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, 2010, así como a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

8.2 Animales de laboratorio

Se utilizaron 20 ratas macho albinas de la cepa Wistar, de 3 meses de edad, con peso corporal de 300 a 350 g. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico (50 x 30 x 20 cm) durante 1 semana bajo condiciones habituales de bioterio en un cuarto con temperatura controlada de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 60%, y con un ciclo de luz-oscuridad invertido de 12 horas luz/12 horas oscuridad, la luz se apaga a las 9:00 horas, con agua y alimento *ad libitum*.

9 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los machos adultos se asignaron aleatoriamente a dos grupos, uno experimental (n = 10) y un grupo control (n = 10). Los animales se mantuvieron en estas condiciones durante una semana antes de iniciar las sesiones de estrés. Los machos control solamente se manipularon para el registro diario de los pesos corporales. Los machos del grupo de estrés se sometieron a estrés por inmersión en agua fría por 50 días consecutivos. Un día después de finalizar la exposición al estresor, los animales fueron eutanizados por decapitación. Se colectó la sangre del tronco para la evaluación de las hormonas LH, T y corticosterona. Se extrajeron las glándulas próstata, vesículas seminales y testículos para registrar sus pesos. Los epidídimos se extrajeron, se pesaron y se obtuvieron los espermatozoides de la cauda para la evaluación de la calidad espermática y la reacción acrosomal.

9.1 Inducción de Estrés

Antes de realizar las sesiones de estrés, se registraron los pesos corporales todos los días. Las sesiones de estrés se realizaron al inicio de la fase oscura del ciclo luz-oscuridad (9:00). Las cajas de las ratas estresadas donde se les aplicó el estresor se mantuvieron alejadas en otra parte de la sala del bioterio, para evitar alteraciones en las ratas del grupo control.

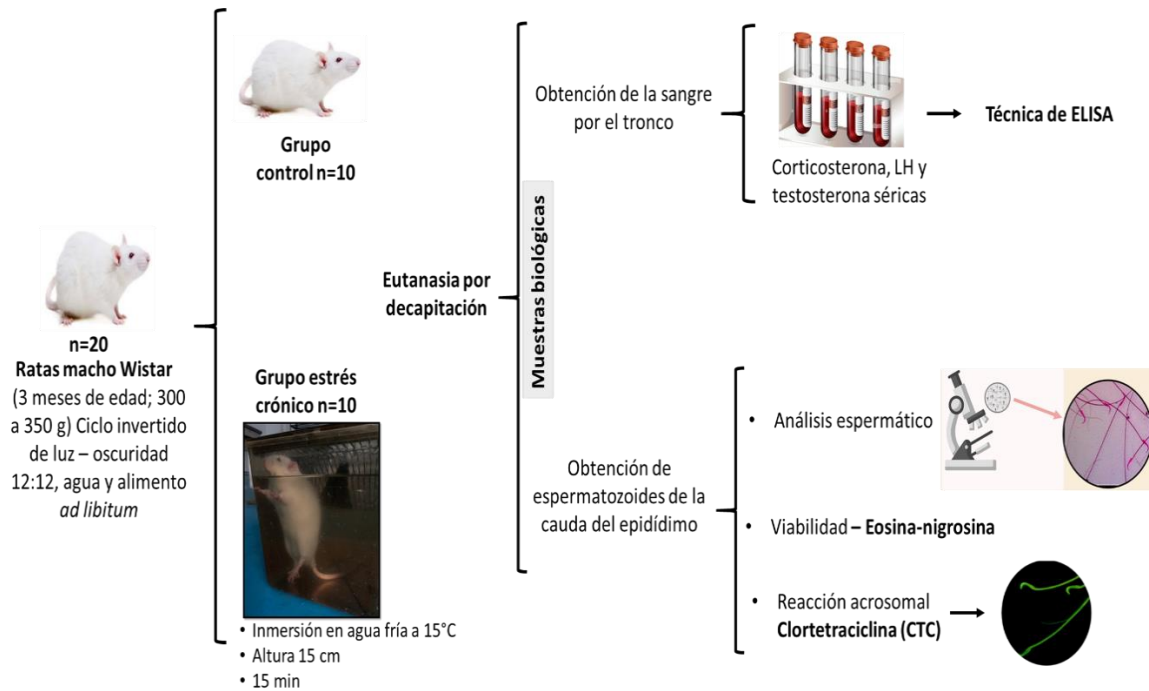


Figura 10. Representación esquemática del diseño experimental del estrés crónico en ratas macho.

El estrés por inmersión en agua fría consistió en colocar a las ratas individualmente en una tina con agua a 15°C, a una profundidad de 15 cm, en donde los animales permanecían en posición vertical, de pie sobre sus patas traseras, manteniendo la cabeza por encima del nivel del agua, durante 15 minutos. Al terminar las sesiones de estrés, los animales se secaron con un paño y se regresaron a sus cajas (Retana-Márquez et al., 1996). Este procedimiento se realizó durante 50 días consecutivos. Los animales del grupo control se mantuvieron en sus cajas sin alteraciones, salvo el registro de los pesos corporales, hasta el día de la prueba.

9.2 Registro del peso corporal

Los machos del grupo control y de estrés crónico se pesaron diariamente y se llevó un registro durante los 50 días consecutivos, desde el inicio del experimento hasta el final

del mismo para determinar posibles cambios en la ganancia de peso corporal entre los dos grupos.

Al final del tratamiento de estrés, a los animales se les realizó eutanasia por decapitación. El mismo procedimiento se llevó a cabo con los animales del grupo control.

Posteriormente se les realizó una incisión en la línea media del abdomen y los testículos y el epidídimo se retiraron del escroto. Se separó la cauda del epidídimo para obtener los espermatozoides y evaluar su calidad.

9.3 Peso relativo de las glándulas accesorias

Se pesaron testículos, epidídimo, próstata y vesículas seminales del grupo estrés y del grupo control. El peso relativo de los órganos se calculó de la siguiente manera: peso de órgano/peso corporal x 100.

9.4 Obtención de los espermatozoides de la cauda del epidídimo

Se obtuvieron los epidídimos y se colocaron en un vaso de precipitado de 10 ml, que contenía 1 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) que contiene (NaCl, 51 137mM, KCl, 2.68 mM, Na₂HPO₄, 8.03 mM, K₂HPO₄, 1.47 mM, pH 7.4) a 37°C. Se realizó un corte en la cauda del epidídimo, con unas tijeras de disección de punta fina e inmediatamente se liberaron los espermatozoides almacenados en la cauda. Los espermatozoides se distribuyeron homogéneamente en el medio DPBS para su inmediato análisis.

9.5 Análisis espermático

9.5.1 Concentración

La concentración espermática se determinó con una cámara de recuento celular (Neubauer-improved, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany). En un tubo de microcentrífuga se depositaron 500 μ l de agua destilada más 25 μ l de la muestra (dilución 1:21). Se colocaron 10 μ l de la muestra diluida en cada uno de los dos extremos de la cámara de Neubauer y se observaron con el objetivo de 20x. El análisis se realizó en la cuadrícula central, conocida como E, considerando los espermatozoides de ocho sub-cuadros específicos. Se contaron los espermatozoides cuyas cabezas se encontraron dentro de estos sub-cuadros pequeños. La concentración se determinó con la siguiente fórmula: número de espermatozoides contados X el número de sub-cuadros (8) X el factor de dilución (21) X 10, 000 y se dividió entre 2. El número de espermatozoides se expresó en millones por mililitro (modificado de Lucio et al., 2009).

9.5.2 Movilidad

Para determinar la movilidad total espermática (movimiento individual de los espermatozoides, clasificada en dos categorías: movilidad progresiva y no progresiva), se colocaron 10 μ l de la muestra espermática epididimaria sobre un portaobjetos, previamente etiquetado y atemperado a 37 °C y se cubrieron con un cubreobjetos 50 x 24 mm previamente atemperado a 37 °C, la laminilla se colocó en un microscopio de campo claro y se observó a 40x. Se contaron 200 espermatozoides con un contador manual. Se registraron los espermatozoides que presentaron movilidad progresiva y no progresiva. El resto de los espermatozoides se contabilizaron como inmóviles. La

movilidad de los espermatozoides se expresó como el porcentaje de espermatozoides móviles del total de espermatozoides contados.

9.5.3 Morfología

Se contaron 200 espermatozoides al azar en diferentes campos. La muestra se observó con el objetivo de 40x. Se tomaron en cuenta las anomalías en la cabeza, el flagelo y la presencia de la gota citoplasmática. La morfología se expresó en porcentaje (figura 11).



Figura 11. Morfología de espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina de ratas macho adultas. Observados con microscopio de luz con el objetivo 40x.

9.5.4 Viabilidad. Tinción eosina – nigrosina

La viabilidad se determinó utilizando un colorante con 1% de eosina, 5 % de nigrosina y 2.9% de citrato de sodio, disueltos en 100 ml de agua destilada (Lucio et al., 2009).

Se colocaron 10 µl de la suspensión de espermatozoides sobre un portaobjetos, se agregaron 10 µl del colorante y se cubrieron con un cubreobjetos. Las laminillas fueron analizadas con el microscopio de luz (Olympus Light Microscope CX 41) con el objetivo de 40x. Se contaron 200 espermatozoides, en diferentes campos. Los

espermatozoides no teñidos se consideraron vivos y los teñidos, muertos. Los resultados obtenidos fueron expresados como el porcentaje de espermatozoides vivos (figura 12).

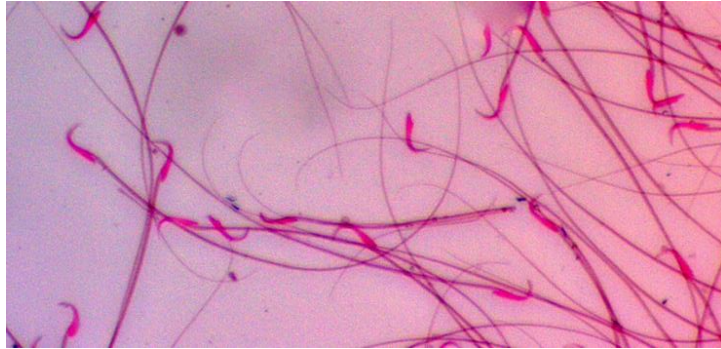


Figura 12. Espermatozoides de ratas macho teñidos con eosina-nigrosina. Observados con microscopio de luz con el objetivo 40x.

9.6 Integridad del acrosoma. Tinción clortetraciclina (CTC)

Para la evaluación de la integridad del acrosoma se utilizó una solución madre de clortetraciclina (CTC), que contenía CTC-HCl (750 μ M), NaCl (130 mM), L-cisteína (5 mM), Tris-base (20 mM; pH 7.8), la cual se preparó antes de la detección, y se almacenó a 4 °C hasta su uso (Collin et al., 2000). En un portaobjetos se colocaron 5 μ L de CTC + 5 μ L de la muestra espermática + 5 μ L de glutaraldehído al 12%. Se dejó reposar la mezcla por 5 min y después se cubrió con un cubreobjetos. Posteriormente, las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiostar) a 40x. Los espermatozoides con acrosoma intacto presentaron una coloración verde brillante en la región de la cabeza. Los espermatozoides reaccionados no se tiñeron. Los resultados obtenidos fueron expresados como el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado (figura 13).

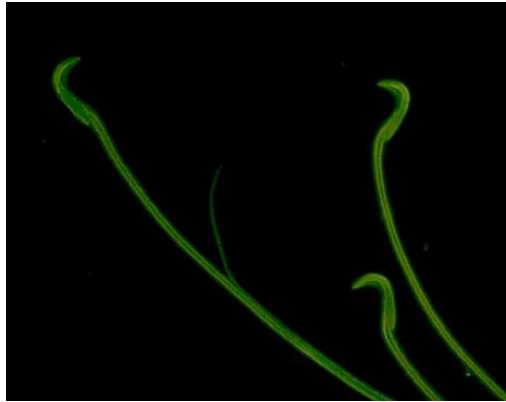


Figura 13. Espermatozoides de ratas macho teñidos con clortetraciclina (CTC). Observados con microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiostar) a 40x.

9.7 Obtención de las muestras de sangre para determinación sérica de corticosterona, LH y testosterona por ensayo ELISA

Se obtuvo la sangre del tronco (3-4 ml) posterior a los 50 días de exposición a estrés crónico por inmersión en agua fría. La sangre obtenida se depositó en tubos de ensayo e inmediatamente se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, para separar el suero, éste se colocó en tubos de ensayo y se congeló a -20°C para su posterior evaluación.

9.7.1 Ensayo ELISA para corticosterona

Para la realización del ensayo se utilizó el kit ARBOR ASSAYS DetectX Corticosterone.

Se preparó la placa ELISA, a la cual se le añadieron $50\ \mu\text{L}$ de la muestra sérica de corticosterona a los pocillos de la columna 3 a la 12 de la letra A hasta la H, posteriormente se tomaron $75\ \mu\text{L}$ del buffer Assay diluido con el stock de corticosterona y se agregaron en cada uno de los pocillos de la columna 1 y 2 de la letra A, a los cuales se les clasificó como NBS (unión no específica), a los pocillos de la columna 1 y 2 de la letra B se les añadió $50\ \mu\text{L}$ del buffer Assay y se les clasificó como B0 (unión máxima), por último a los pocillos de la columna 1 y 2 de la letra C hasta la H se les

añadieron los estándares según el kit. Tanto el NBS y el B0 se contemplaron como los controles para determinar el nivel de absorbancia. Posteriormente se les adicionaron 25 µL del conjugado enzimático de corticosterona en todos los pocillos de la placa y 25 µL del anticuerpo de corticosterona en todos los pozos a excepción de los pocillos NBS.

La placa se dejó por una hora en un agitador de placas Barnstead/Thermolyne Vari-Mix™, al término se lavó cada pocillo 3 veces con solución de lavado diluida (300 µL por pocillo) en una lavadora de placas Thermo Scientific™ Wellwash™, se realizó un golpe seco de los pocillos contra papel absorbente para eliminar las gotas residuales y se les agregaron a cada pocillo, 100 µL de sustrato de Tetrametilbencidina (TMB) y se dejó incubar la placa durante 30 min a temperatura ambiente en el agitador de placas. Finalmente, se le agregaron 50 µL de la solución Stop en todos los pocillos de la placa para la lectura en un espectrofotómetro lector de microplacas de ELISA Bio-Rad xMark™.

Se determinó la lectura de la densidad óptica (OD) a 450 nm y los resultados se obtuvieron por medio del Software Mpm, para determinar la absorbancia media para cada conjunto de los estándares, los controles (NBS y B0) y las muestras séricas de corticosterona. A mayor absorbancia menor concentración de corticosterona a menor absorbancia mayor concentración de corticosterona. La cuantificación de la concentración hormonal fue en ng/ml. El rango dinámico del ensayo se encontró entre 216 – 446 ng/ml.

9.7.2 Ensayo ELISA para testosterona y LH

Para la realización del ensayo se utilizó un kit DRG ELISA EIA-1559. Se preparó la placa para ELISA, en la cual se colocó el control en los pocillos de la columna 1 y 2 de la letra A (25 μ L), los estándares se colocaron en los pocillos de la columna 1 y 2 de la letra B hasta la H (25 μ L) y finalmente se colocó la muestra de testosterona sérica (25 μ L) en los pocillos de la columna 3 a la 12 de la letra A hasta la H, posteriormente se agregaron 200 μ L del conjugado de enzima de testosterona a cada pocillo. Las muestras se mezclaron con un agitador de placas Barnstead/Thermo Scientific Vari-Mix™ durante 10 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min. Después de la incubación se lavó cada pocillo 3 veces con solución de lavado diluida (400 μ L por pocillo) en una lavadora de placas Thermo Scientific™ Wellwash™, se realizó un golpe seco de los pocillos contra papel absorbente para eliminar las gotas residuales y se le agregaron a cada pocillo 200 μ L de la solución sustrato, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 100 μ L de solución Stop a cada pocillo, para la lectura en un espectrofotómetro lector de microplacas de ELISA Bio-Rad xMark™ dentro de los diez min después de la adición de la solución Stop.

Se determinó la lectura de la densidad óptica (OD) a 450 ± 10 nm y los resultados se obtuvieron por medio del Software Mpm, para determinar la absorbancia media para cada conjunto de los estándares, los controles y las muestras séricas de testosterona, a mayor absorbancia mayor concentración de testosterona a menor absorbancia menor concentración de testosterona. La cuantificación de la concentración hormonal fue en ng/ml. El rango dinámico del ensayo se encontró entre 0.083 – 16 ng/ml. El mismo procedimiento se utilizó para la hormona LH, pero cada una se llevó a cabo de manera individual.

10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa PSPP 2.0.031 y Microsoft Excel para el análisis estadístico y las gráficas. Los datos se analizaron por medio de pruebas de normalidad y homocedasticidad. Los datos se reportan como media \pm E.E.M. Los resultados de las concentraciones séricas de las hormonas, la reacción acrosomal y los pesos gonadales se analizaron mediante la prueba estadística paramétrica de t-Student, para evaluar las diferencias con respecto al control. Los valores de calidad espermática se analizaron mediante la prueba estadística no paramétrica X^2 y los pesos corporales mediante regresión lineal. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando $p \leq 0.05$.

11 RESULTADOS

11.1 Ganancia diaria de peso corporal

El peso corporal de los machos de ambos grupos se registró diariamente durante los 50 días del experimento. Los machos estresados durante 50 días consecutivos mostraron una menor ganancia de peso corporal (1.121 g/día), ya que, a partir del día 12 hasta el último día del experimento se redujo significativamente con respecto a la ganancia del peso corporal del grupo control (1.477 g/día) ($p < 0.05$; Figura 14). Por lo tanto, el estrés crónico durante 50 días consecutivos causa disminución en la ganancia de peso corporal.

11.2 Pesos relativos de órganos sexuales

El peso relativo de los órganos sexuales del grupo de estrés mostró valores significativamente menores en los testículos, los epidídimos, la próstata y las vesículas seminales en comparación con el grupo control después de 50 días de estrés crónico (figura 15).

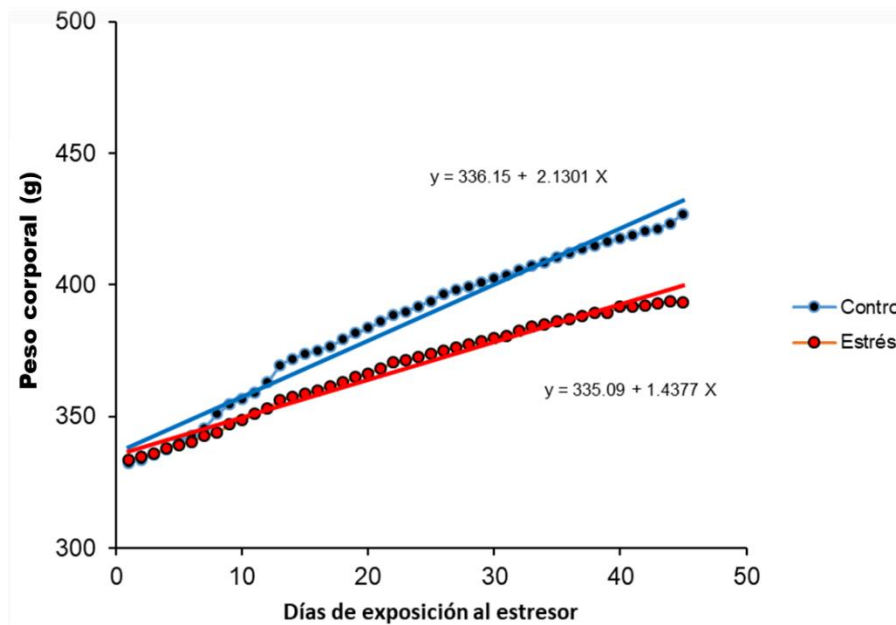


Figura 14. Registro del peso corporal de los machos del grupo control (línea azul) y del grupo de machos expuestos a estrés por inmersión en agua fría (línea roja) durante 50 días consecutivos. Se muestran las líneas de regresión del peso corporal diario para el grupo control y el grupo estrés. La pendiente del peso del grupo estrés fue significativamente menor en comparación con la pendiente del grupo control. Regresión lineal. * $p < 0.05$.



Figura 15. Fotografía representativa de la morfología de los órganos sexuales de ratas macho adultas.

11.3 Peso relativo de los testículos y del epidídimo después del estrés crónico

El peso testicular relativo de los machos estresados después de 50 días de estrés crónico fue 0.39 ± 0.024 , significativamente menor en comparación con el peso testicular de los machos del grupo control 0.45 ± 0.009 ($p < 0.05$). De igual manera, el peso relativo del epidídimo fue significativamente menor en el grupo de machos estresados (0.12 ± 0.010), en comparación con el grupo control (0.15 ± 0.004) ($p < 0.05$; Figura 16).

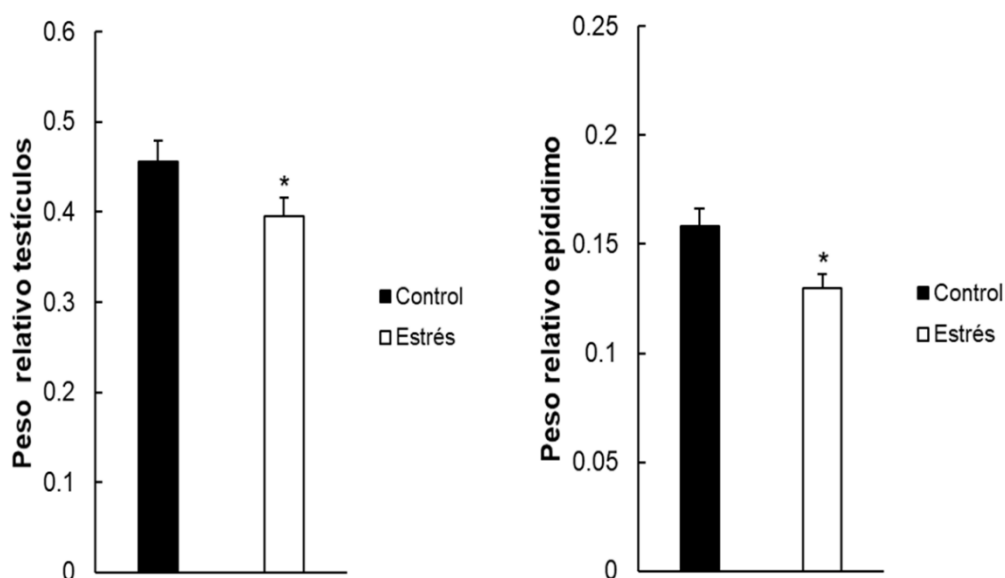


Figura 16. Peso relativo de testículos y epidídimo. El peso relativo de los testículos y de los epidídimos de machos estresados durante 50 días consecutivos fue significativamente menor en comparación con los machos del grupo control. Los datos se muestran como $\bar{X} \pm E.E.M.$ Los datos se analizaron con la prueba t-Student. * $p < 0.05$.

11.4 Peso relativo de la próstata y de las vesículas seminales después del estrés crónico

En machos estresados el peso relativo de la próstata posterior a los 50 días de estrés crónico fue de 0.13 ± 0.004 , significativamente menor que en el grupo control, 0.17 ± 0.005 ($p < 0.05$). Así mismo, el peso relativo de las vesículas seminales del grupo de

estrés crónico fue 0.21 ± 0.008 , significativamente menor que el del grupo control, 0.24 ± 0.008 ($p < 0.05$; Figura 17).

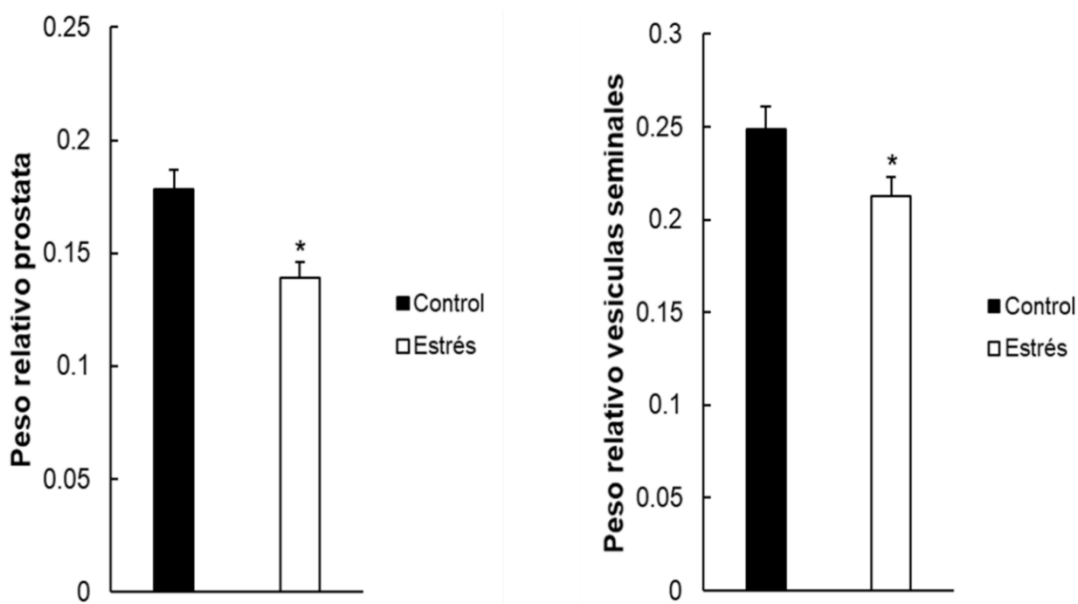


Figura 17. Peso relativo de próstata y vesículas seminales. El peso relativo de la próstata y de las vesículas seminales de los machos estresados durante 50 días consecutivos fue significativamente menor en comparación con los machos del grupo control. Los datos se muestran como $\bar{X} \pm E.E.M.$ Los datos se analizaron con la prueba t-Student. * $p < 0.05$.

11.5 Concentraciones séricas de corticosterona, LH y testosterona

En los machos estresados crónicamente durante 50 días consecutivos, se observó un aumento en la concentración sérica de corticosterona (476.11 ± 12.74 ng/mL) al final de la exposición al estresor. Esta concentración fue significativamente mayor en comparación con el grupo control (186.16 ± 6.33 ng/mL) ($p < 0.05$, Figura 18).

Con respecto a la concentración sérica de LH, ésta fue significativamente menor en el grupo de machos estresados crónicamente (2.16 ± 1.53 ng/mL), en comparación con el grupo control (4.14 ± 0.62 ng/mL). Así mismo, la concentración sérica de T en el grupo de machos estresados fue significativamente menor (1.37 ± 0.27 ng/mL) en

comparación con lo observado en el grupo control, cuyos valores fueron de 3.89 ± 0.48 ng/mL ($p < 0.05$; Figura 19).

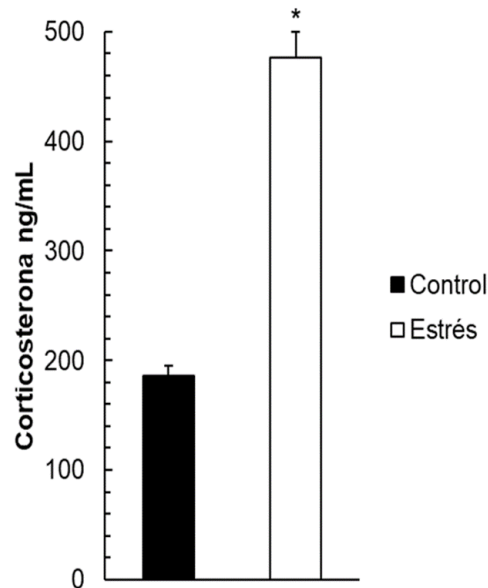


Figura 18. Concentración de corticosterona sérica de machos del grupo control y el grupo de estrés crónico. Los datos se muestran en ng/mL. En los machos expuestos a estrés crónico la concentración de corticosterona aumentó significativamente en comparación con el grupo control. Los datos se muestran como $\bar{X} \pm E.E.M.$ Los datos se analizaron con la prueba t-Student. * $p < 0.05$.

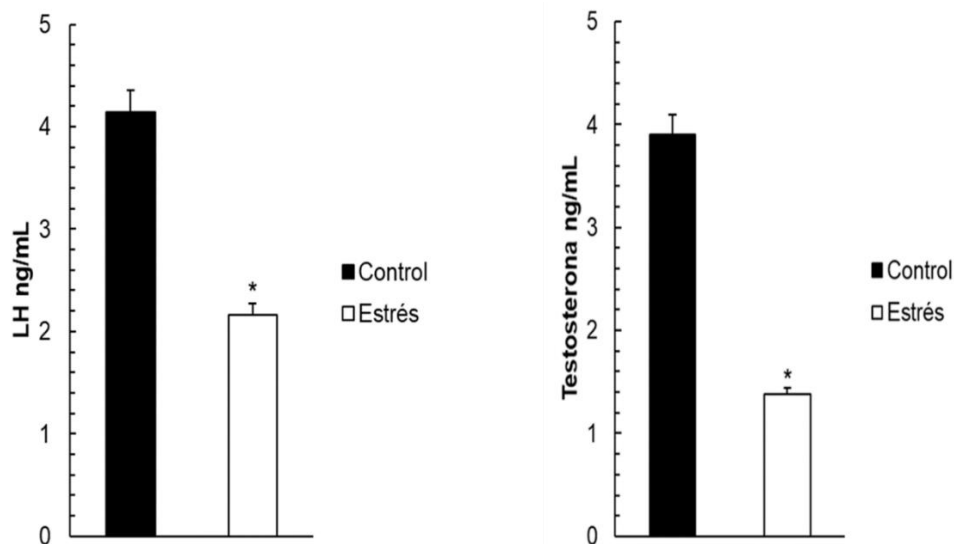


Figura 19. Concentración de LH (A) y testosterona (B) sérica de machos del grupo control y el grupo de estrés crónico. Los datos se muestran en ng/mL. En los machos expuestos a estrés crónico la concentración de LH disminuyó significativamente en comparación con el grupo control. La concentración de testosterona fue significativamente más baja en el grupo de estrés crónico que en el grupo control. Los datos se muestran como $\bar{X} \pm E.E.M.$ Los datos se analizaron con la prueba t-Student. * $p < 0.05$.

11.6 Análisis espermático

Los datos obtenidos en cada uno de los parámetros del análisis espermático fueron de espermatozoides colectados de la cauda del epidídimo tanto para el grupo control, como para el grupo estrés (figura 20).

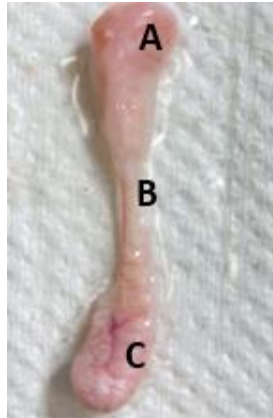


Figura 20. Morfología del epidídimo de ratas macho. **A)** cabeza o caput, **B)** cuerpo o corpus y **C)** cola o cauda.

11.6.1 Movilidad y concentración espermática

En los machos estresados crónicamente, el porcentaje de movilidad progresiva total de los espermatozoides fue del 49%. Este porcentaje fue significativamente menor que en los machos control, en los cuales el porcentaje fue del 96% ($p < 0.05$). En cuanto a la concentración espermática, ésta fue de 100×10^6 millones de espermatozoides por mL (49.8 ± 1.76) en los machos estresados de manera crónica. Estos valores fueron significativamente menores que en los machos control, cuyos valores se encontraron 170×10^6 millones de espermatozoides por mL (84.2 ± 3.55) ($p < 0.05$; Figura 21).

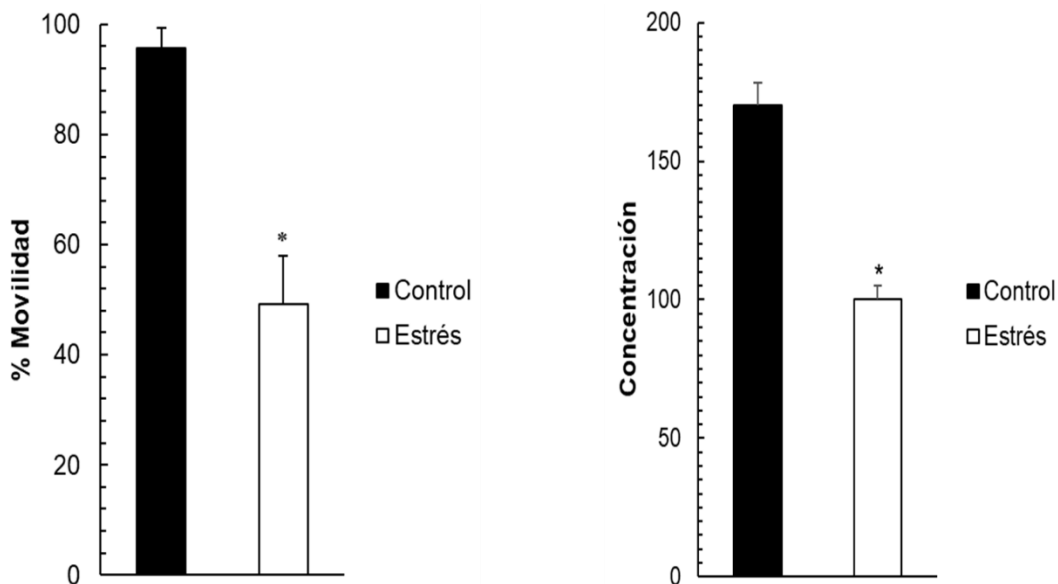


Figura 21. Movilidad y concentración espermática. El porcentaje de movilidad y la concentración espermática de machos estresados fueron significativamente más bajos en comparación con el grupo control. Los datos se muestran como $\bar{X} \pm E.E.M.$. El porcentaje de movilidad se analizó con la prueba χ^2 y la concentración espermática con la prueba t-Student. * $p < 0.05$.

11.6.2 Viabilidad

En los machos expuestos a estrés crónico se observó un porcentaje del 53% de espermatozoides vivos; este porcentaje fue significativamente menor que el observado en el grupo control, que fue del 97% ($p < 0.05$; Figura 22).

11.6.3 Anormalidades

En cuanto al porcentaje de anomalías observadas, éste fue significativamente mayor (10.37%) en el grupo de machos estresados crónicamente en comparación con el grupo control, 1.7% ($p < 0.05$). Las anomalías observadas en el grupo de estrés fueron en su mayoría cabezas desprendidas del flagelo y flagelos cortos (7.24%); también se observaron cabezas hinchadas, cabezas dobladas (3.13%); mientras que en el grupo control se observó una morfología típica: cabezas con estructura normal en forma de gancho y flagelo largo (Figura 23).

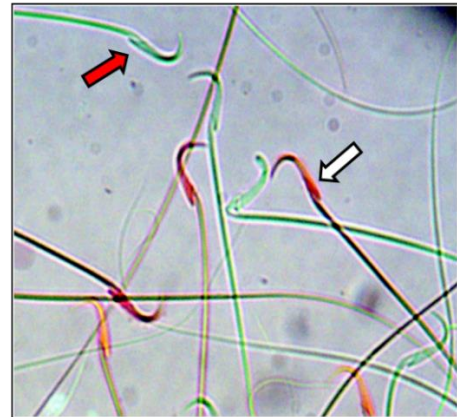
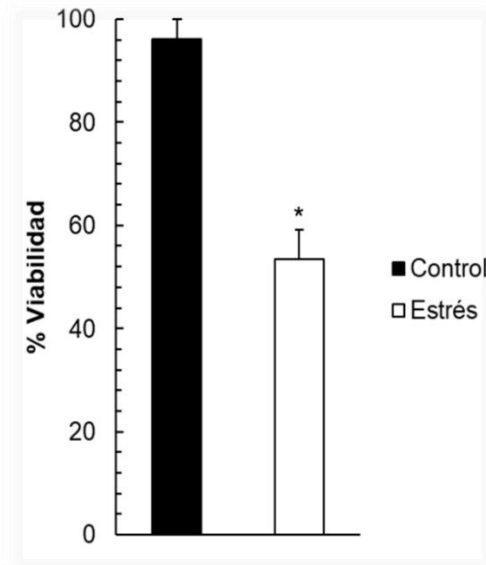


Figura 22. Efecto del estrés crónico en el porcentaje de viabilidad de los espermatozoides. Se observó un mayor porcentaje de espermatozoides muertos (flecha blanca), teñidos con eosina-nigrosina en machos estresados. Este porcentaje fue significativamente mayor en comparación con el grupo control, que mostró mayor porcentaje de espermatozoides vivos (flecha roja). Los datos se muestran como $\bar{X} \pm E.E.M.$ El porcentaje de viabilidad se realizó con la prueba χ^2 . * $p < 0.05$.

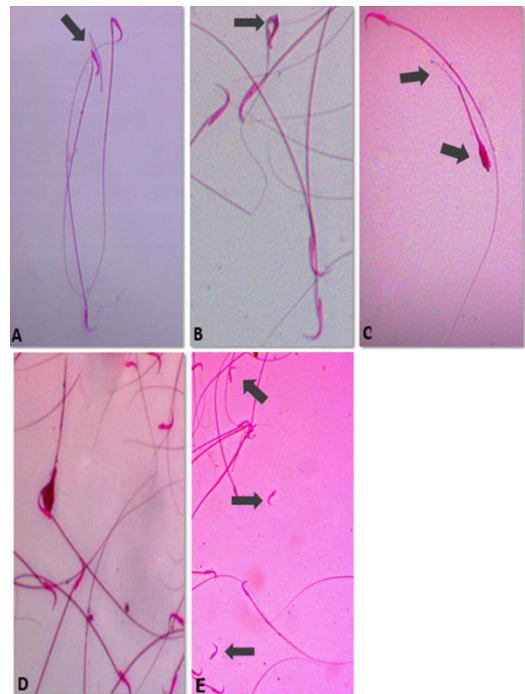
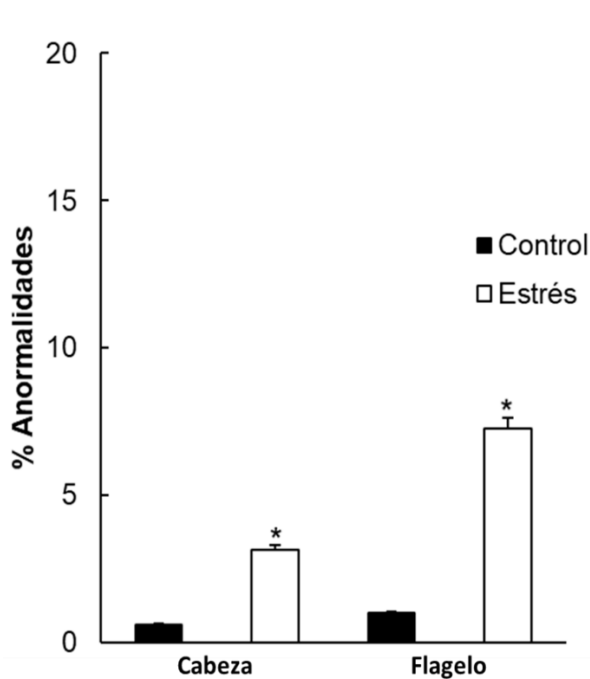


Figura 23. Porcentaje de anomalías en machos estresados crónicamente. Se observó un aumento en el porcentaje de anomalías de los espermatozoides para el grupo estrés en flagelo y cabeza (B y D) en comparación con el grupo control (A y C). El porcentaje de anomalías en el flagelo fue mayor que el porcentaje de anomalías en la cabeza en el grupo estrés. Los datos se muestran como $\bar{X} \pm E.E.M.$ El porcentaje de anomalías se realizó con la prueba χ^2 . * $p < 0.05$. Anomalías observadas en los espermatozoides de machos estresados crónicamente durante 50 días consecutivos. A y B: cabezas dobladas; C y D: cabeza hinchada y flagelo corto; E: cabezas sueltas.

11.6.4 Efecto del estrés crónico en el estado acrosomal de los espermatozoides

El porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado en los machos estresados crónicamente fue de 19%. Este porcentaje fue significativamente mayor en comparación a lo observado en el grupo control, cuyo porcentaje de acrosoma reaccionado fue del 2% ($p < 0.05$) a (Figura 24). Los espermatozoides del grupo de machos estresados crónicamente durante 50 días consecutivos mostraron una disminución en la coloración verde fluorescente en la parte del acrosoma, mientras que los espermatozoides en el grupo control se observó una coloración verde fluorescente intensa en el acrosoma (Figura 24).

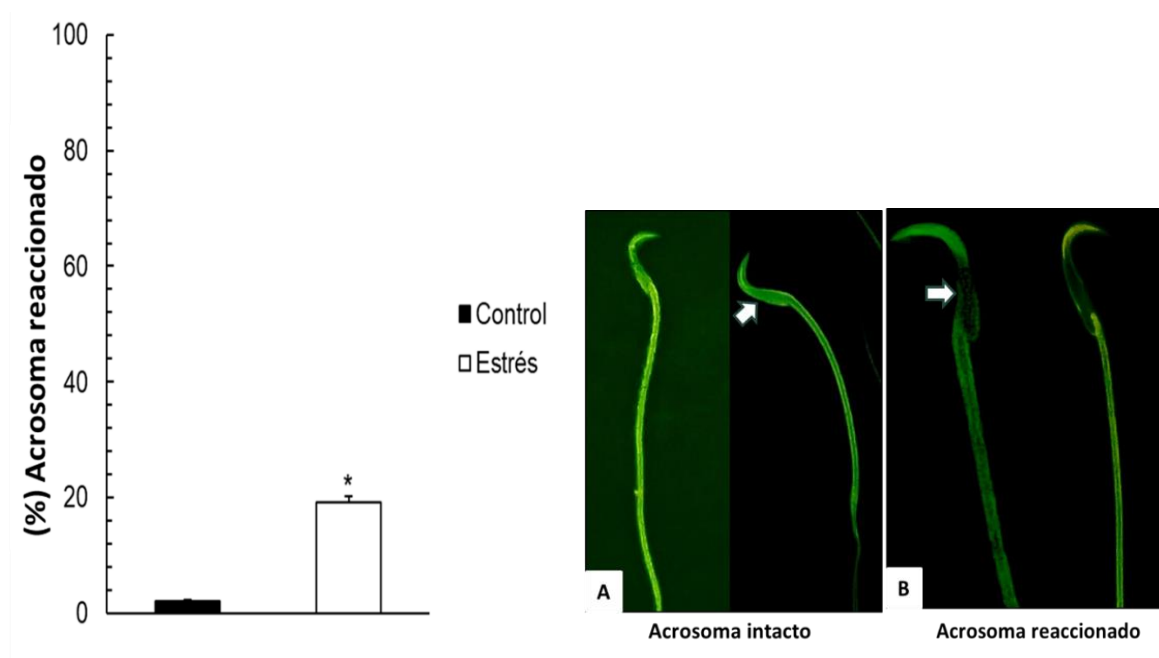


Figura 24. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado en el grupo estrés crónico y en el grupo control. El porcentaje de acrosoma reaccionado de machos estresados crónicamente fue significativamente mayor en comparación con el grupo control. Los datos se muestran como $\bar{X} \pm E.E.$ Los datos fueron analizados con la prueba t-Student. * $p < 0.05$. Reacción acrosomal en espermatozoides analizados por medio de la tinción fluorescente clortetraciclina (CTC). **A)** espermatozoides del grupo control con acrosoma intacto; **B)** espermatozoides de machos estresados crónicamente con acrosoma reaccionado.

12 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación respaldan la hipótesis inicial de que el estrés crónico está asociado con alteraciones en la calidad de los espermatozoides, ya que aporta evidencia de que el estresor utilizado de manera crónica activa al eje adrenal, generando una alta concentración de corticosterona sérica en los machos estresados. Asimismo, la ganancia de peso corporal fue menor, de la misma manera que los pesos gonadales y la calidad de los espermatozoides en comparación con los machos control. Además, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado fue mayor en los machos estresados.

12.1 Peso corporal

En los machos estresados se observó una disminución en la ganancia de peso corporal a partir del día 12 hasta el día 50 de estrés. Estos resultados sobre la ganancia de peso corporal son coincidentes con estudios previos en los que se han utilizado estresores como, nado forzado, inmovilización e inmersión en agua fría y han mostrado que el estrés causa menor ganancia de peso corporal (Diane et al., 2008; Calvez et al., 2011), ya sea que los animales sean estresados por 20 días (Retana-Márquez et al., 2003) o por 50 días consecutivos (García-Díaz et al., 2015; Juárez-Rojas et al., 2015). La menor ganancia de peso corporal podría explicarse por alteraciones en algunos neuropéptidos. Como se sabe, en condiciones de estrés crónico se incrementa la liberación de la CRH. Sin embargo, la CRH no solo actúa como uno de los principales reguladores de la activación del eje HHA, sino que a nivel hipotálamo

actúa como un neuropéptido anorexigénico, es decir, disminuye la ingesta de alimento al inhibir al neuropéptido Y (NPY), el cual se encarga de la regulación del apetito (Kivimäki et al., 2006; Reichmann y Holzer, 2015). Así mismo, los GC tienen un efecto inhibitorio directo en la expresión del ARNm del NPY y el péptido relacionado con Agouti (AgRP) en el hipotálamo (Liu et al., 2011). De manera indirecta, los GC causan aumento de glucosa, de ácidos grasos etc., debido a su función catabólica, que trae consigo el aumento de leptina e insulina (Liu et al., 2011). Estas hormonas pueden disminuir la ingesta de alimento al inhibir a las neuronas orexigénicas (NPY/AgRP) y activar a las neuronas anorexigénicas como la proopiomelanocortina (POMC) en el núcleo arcuato del hipotálamo (Zakrzewska et al., 1997; Asensio et al., 2004; Sominsky y Spencer, 2014). Asimismo, se ha demostrado que el estrés crónico por inmovilización induce hipofagia, incrementando la frecuencia de disparo y por ende la actividad de las neuronas anorexigénicas POMC del núcleo arcuato del hipotálamo (Qu et al., 2020), lo que refuerza la hipótesis de que el estrés crónico induce la disminución de la ingesta de alimentos, siendo ésta una consecuencia metabólica importante del estrés crónico.

12.2 Pesos glandulares

El peso relativo de los testículos, los epidídimos, la próstata y las vesículas seminales fue menor en los machos estresados crónicamente, lo que muestra que estos órganos son vulnerables al estrés crónico (Retana-Márquez et al., 2014; Ribeiro et al., 2018). La disminución del peso puede deberse a la disminución de LH y T, ya que las glándulas sexuales masculinas dependen de la T para mantener la estructura y funcionalidad de los epitelios de estas glándulas, que están encargados de sintetizar

nutrientes y otros factores necesarios para los espermatozoides (McAllan, 1998). El estrés crónico por inmersión en agua fría causa bajo peso glandular, debido a la disminución del área epitelial de la próstata y de las vesículas seminales; esto está relacionado con las bajas concentraciones de testosterona sérica (Retana-Márquez et al., 2014). La disminución del peso testicular en los machos estresados de manera crónica puede atribuirse a los bajos niveles de T causados por el estrés; la inhibición del eje testicular se debe a los componentes del eje HHA, a nivel central, inhibiendo la liberación de GnRH por la CRH, mediante conexiones sinápticas directas de las neuronas CRH del PVN con las neuronas GnRH en el mPOA y, por consiguiente, la disminución de la secreción de LH en la hipófisis, causando la disminución de la síntesis de T en las células de Leydig (Breen y Mellon, 2014). Los GC liberados durante el estrés inhiben la liberación de LH en la hipófisis anterior (Almeida et al., 1998), así como la esteroidogénesis en las células de Leydig, a través de inhibir la transcripción de los genes que codifican las enzimas esteroidogénicas (Orr et al., 1994), como son la 20-22 liasa, la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la 17α -hidroxilasa/17-2 liasa (Payne y Youngblood, 1995; Orr y Mann, 1990). Con relación al menor peso testicular, se ha demostrado que el estrés por inmersión en agua fría causa también la vacuolización del epitelio seminífero, picnosis en las células germinales, principalmente en los espermatocitos primarios en paquiteno, así como en las espermátidas redondas, pérdida de células germinales hacia el lumen tubular seminífero, lo que causa menor área epitelial, principalmente en las etapas I a VIII del ciclo del epitelio seminífero (Retana-Márquez et al., 2014). Adicionalmente, se ha demostrado que el estrés por inmersión en agua fría causa incremento en el porcentaje de muerte por apoptosis en las células germinales, principalmente espermatocitos

primarios y espermátidas redondas. Los mecanismos moleculares involucran el aumento de las proteínas proapoptóticas Bax, caspasa-3 y caspasa-8 activas, así como disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-2, lo que indica que activan tanto la vía intrínseca como la extrínseca de la apoptosis en el testículo (Juárez-Rojas et al., 2015). Estos mecanismos apoptóticos pueden estar relacionados con el incremento en la producción de ERO y la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes de la SOD, la GPx y la CAT en el testículo (García-Díaz et al., 2015).

De manera directa, los GC disminuyen el receptor para LH en las células de Leydig testiculares, además de inducir apoptosis en dichas células, causando así la disminución en la síntesis de T (Hardy et al., 2005). Los mecanismos moleculares de la inducción de apoptosis en las células de Leydig por la corticosterona, involucran a FasL/Fas y Caspasa-3, así como la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$), causando la salida del citocromo C y de otras proteínas mitocondriales, provocando la activación de las caspasas (Green y Redd, 1998). Todos estos procesos estarían implicados en la apoptosis de las células de Leydig (Gao et al., 2003; Chen et al., 2012) causando la disminución de la T.

12.3 Corticosterona, LH y Testosterona

Como se mencionó anteriormente, el aumento de la corticosterona durante la respuesta de estrés crónico es un indicador de que el estrés por inmersión en agua fría activa al eje adrenal de manera diferencial, como se ha reportado en estudios previos (Retana-Márquez et al., 2003). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el estrés por inmersión en agua fría activa al eje HHA, genera el aumento en la concentración de corticosterona sérica.

La exposición crónica a un estresor aumenta la expresión del RFRP3 tanto a nivel ARNm como de proteína (Kirby et al., 2009), esto a través de sus receptores para GC. El RFRP3 inhibe la síntesis de la GnRH de manera directa a través de sinapsis con las neuronas GnRH en el POA y también inhibe a las neuronas KNDY del núcleo arcuato (Acevedo-Rodríguez et al., 2018; Anjum et al., 2021), inhibiendo así la liberación de LH desde la hipófisis anterior (Hirano et al., 2014). En este trabajo se observó disminución de la concentración sérica de LH, lo que coincide con lo observado por otros autores (Briski y Sylvester, 1991; Luo et al., 2016; Joseph y Whirledge, 2017). El RFRP3 también tiene un efecto inhibitorio en los gonadotropos, disminuyendo la liberación de la LH. Los gonadotropos tienen receptores para el RFRP3. Este neuropéptido inhibe la vía de señalización de AC-AMPC-PTK, inhibiendo la generación de calcio libre intracelular provocado por la GnRH, lo que disminuye la liberación de la LH (Hu et al., 2019; Son et al., 2012). Otro estudio realizado en ratones macho expuestos a estrés agudo por restricción (dispositivos de restricción para roedores Broome) durante 45, 90 y 180 minutos (una sola exposición), reportó disminución de la concentración de LH, así como disminución en la secreción pulsátil de esta hormona. Estos cambios fueron significativos desde los 18 y 24 minutos de restricción, asociados con el aumento de los niveles de corticosterona; los cuales aumentaron al minuto 15 y alcanzaron su punto máximo a los 30 minutos de exposición al estresor, lo que indica un efecto inhibitorio muy rápido sobre la secreción de GnRH/LH. También, se observó que el estrés por restricción causó aumento de los niveles de ARNm que codifica para el RFRP3 a los 45 minutos, lo que respalda la hipótesis de que el estrés agudo también puede reducir la pulsatilidad de la LH, en parte aumentando la secreción y el efecto inhibitorio del RFRP3 en las neuronas GnRH (Yang et al., 2018).

Como se mencionó, los glucocorticoides inhiben la esteroidogénesis de manera directa en las células de Leydig, mediante la inhibición de la transcripción de genes que codifican a las enzimas que participan en la biosíntesis de la testosterona (Hampl y Stárka, 2020), como es la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}), que se encuentra en la mitocondria y cataliza la conversión de colesterol (C27) a pregnenolona (C21); a la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), que cataliza la síntesis de P4 a partir de la pregnenolona; y a la 17 α -hidroxilasa/C 17- C 20 liasa, que cataliza la conversión de hidroxiprogesterona a andrógenos (Badrinarayanan et al., 2006; Hales y Payne, 1989; Hardy et al., 2005). Los glucocorticoides también inhiben la transcripción de StAR, inducida por AMPc en las células de Leydig (Xiao et al., 2010). Los glucocorticoides también pueden disminuir la concentración de T mediante mecanismos no genómicos, al unirse a través de receptores de membrana o mediante la disminución de la formación de AMPc citoplasmático que participa como segundo mensajero en la regulación de la esteroidogénesis en las células de Leydig. La exposición de células de Leydig de ratón a glucocorticoides durante 15 minutos puede inhibir la formación de AMPc y disminuir rápidamente la síntesis de la T a los 30 minutos (Dong et al., 2004). La manera en que los glucocorticoides inhiben la función de las células Leydig está determinado por el aumento en la concentración de los glucocorticoides en condiciones de estrés. La enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 (11 β -HSD1), es una de las enzimas que se localizan en las células de Leydig mediante la cual regulan la concentración intracelular de los niveles de glucocorticoides de activos a inactivos (Hu et al., 2008; Wang et al., 2019). En condiciones de estrés, la capacidad metabólica de 11 β -HSD1 en las células de Leydig puede verse superada por niveles elevados de

glucocorticoides, lo que lleva a la supresión de la biosíntesis de testosterona (Whirledge y Cidlowski, 2010).

12.4 Calidad espermática

Los resultados de este estudio mostraron disminución de la concentración, la viabilidad y la movilidad espermática, así como mayor porcentaje de espermatozoides con anomalías y con acrosoma reaccionado en los machos estresados crónicamente, lo que muestra que la exposición a estrés crónico altera la calidad espermática. Estos efectos pueden deberse a la disminución de la T. Se ha reportado que el descenso en la concentración de T altera el proceso de la espermatogénesis, disminuyendo la proliferación de las células germinales y afectando el proceso de maduración de éstas, lo que culmina en un número reducido de espermatozoides (HAMPL y Stárka, 2020). La menor concentración de espermatozoides epididimarios puede deberse al incremento de la apoptosis en los espermatocitos primarios y las espermatidas redondas, además de la exfoliación y pérdida de células germinales del epitelio seminífero, todo esto generado por la disminución de T y el incremento de corticosterona liberada durante el estrés, como se mostró en un estudio anterior (Júarez-Rojas et al., 2015). Esto implica que un menor número de espermatozoides sean transportados desde el testículo hacia el epidídimo.

En el epitelio epididimario específicamente en las células principales hay presencia de receptores para T, de la cual depende la funcionalidad de este órgano. También existen receptores para GC, los cuales se incrementan cuando los niveles de corticosterona aumentan y éstos a su vez pueden inducir la disminución de la expresión de receptores para andrógenos (Robaire y Hamzeh, 2011). Al disminuir la T

a causa del estrés, el peso de esta glándula disminuye, probablemente por esta disminución, su funcionalidad se vea afectada, como lo indican los resultados de este trabajo.

El microambiente epididimario es muy importante para los espermatozoides, debido a que las células epiteliales contribuyen a la absorción y secreción de sustancias que, en conjunto, favorecen a los espermatozoides ciertas características estructurales para su funcionalidad y viabilidad necesarias para su maduración, como es el aporte de nutrientes, la incorporación de proteínas y cambios en la movilidad que le permiten adquirir la capacidad de fertilizar al ovocito. Probablemente la disminución de la T altera la función de estas células epididimarias, pues se ha reportado que el área epitelial epididimaria disminuye (Hamzeh y Robaire, 2010). La disminución de T causa apoptosis en las células principales del epidídimo, disminuyendo con ello la incorporación de las proteínas que se requieren en la membrana del espermatozoide (Robaire y Hamzeh, 2011), lo que podría desencadenar alteraciones morfológicas, así como pérdida de la viabilidad de los espermatozoides, al carecer de un ambiente óptimo. Además, en condiciones de estrés por inmovilización, los niveles de iones Na, K y HCO_3^- disminuyen en el líquido epididimario, lo que podría explicar la disminución de la movilidad, ya que son importantes para la activación de ciertas vías de señalización como la AC-AKAPS necesarias para la activación de la movilidad espermática (Arun et al., 2021). Así mismo, se ha descrito que la disminución de T puede afectar también a la movilidad a través de la regulación negativa de algunas proteínas específicas, como la proteína de anclaje AKAP3 y AKAP4 ubicadas en la vaina fibrosa de la pieza principal del flagelo (Grande et al., 2022). Otro factor que

podría afectar la movilidad espermática observada en este estudio es el aumento de ERO (O_2^- y H_2O_2), aunado con la disminución de la actividad (Dhanabalan et al., 2011; Moazamian et al., 2015) y el contenido de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx, lo que genera peroxidación lipídica en la membrana plasmática de los espermatozoides (Flores-González, 2023), así como alteraciones en las mitocondrias, lo que podría estar relacionado con las anomalías en la cabeza y el flagelo, además de iniciar procesos apoptóticos debido al desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, lo cual también podría causar muerte celular por apoptosis.

12.5 Reacción acrosomal

Con respecto a la reacción acrosomal, se observó un 19% de espermatozoides con acrosoma reaccionado en los machos expuestos a estrés crónico por inmersión en agua fría. Este porcentaje es mayor al reportado en otros estudios en los que se utilizó inmovilización como estresor, donde obtuvieron un 17% de espermatozoides con acrosoma reaccionado (Arun et al., 2016). Estas diferencias podrían explicarse por la intensidad de los diferentes estresores utilizados, se ha demostrado que el estrés por inmersión en agua fría es más intenso, debido a que causa un incremento mayor de corticosterona, en comparación con la inmovilización (Retana-Márquez et al., 2003). En estudios *in vitro* se expusieron espermatozoides a hidrocortisona (cortisol) y se observó que este glucocorticoide causa aumento en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado, en comparación con la adición de hidrocortisona + P4, que es uno de los mediadores de la reacción acrosomal (Sánchez et al., 2023). Por lo tanto, es posible que el aumento en el porcentaje de reacción acrosomal observado en los

espermatozoides de los machos estresados esté relacionado con el incremento de la corticosterona.

Aunque no existen muchos estudios relacionados con la reacción acrosomal en espermatozoides epididimarios causada por efecto del estrés crónico, se ha propuesto que los GC podrían modular las concentraciones de calcio dentro del acrosoma, promoviendo la activación de ciertas proteínas como la AC y favorecer la fosforilación de tirosina en ciertas proteínas implicadas en la vía de señalización de la reacción acrosomal. Por otra parte, los GC pueden actuar en la membrana plasmática de los espermatozoides y estimular la apertura de los canales de calcio, principalmente Catsper, el cual se ha reportado que está mediado por la P4 (Arun et al., 2016; Arun et al., 2021; Sánchez et al., 2023). Aunque todavía no queda claro de qué manera podría ocurrir esto, es probable que el incremento en la producción de corticosterona por efecto del estrés crónico altere la composición del ambiente luminal epididimario causando la reacción acrosomal espontánea, resultando en una exposición prematura del contenido acrosómico, afectando negativamente la capacidad del espermatozoide para atravesar la zona pelúcida y fertilizar al ovocito.

Las alteraciones observadas en los espermatozoides a causa del estrés crónico muestran que la elevación de corticosterona puede provocar una alteración en el microambiente epididimario y como consecuencia afectar la fertilidad masculina. Estas afectaciones en los parámetros espermáticos pudieran relacionarse con el deterioro de los gametos masculinos, la incapacidad de unirse y fusionarse con el ovocito y probablemente a un crecimiento y desarrollo embrionario deficiente. Por lo tanto, el

estrés crónico puede ser considerado como una de las posibles causas de la infertilidad masculina dada por la calidad de los espermatozoides.

13 CONCLUSIÓN

El estrés crónico por inmersión en agua fría genera alteraciones metabólicas, causando bajo peso corporal, probablemente debido a una menor ingesta de alimento. También causa alteraciones reproductivas, disminuye la secreción LH, por lo que la estimulación hacia el testículo para la síntesis de T por las células de Leydig se ve disminuida. Como consecuencia, el peso de las glándulas accesorias y de los testículos disminuyen. Esto trae como consecuencia menor calidad espermática (movilidad, viabilidad y concentración) y aumento en la reacción acrosomal. Estas alteraciones están asociadas a las elevadas concentraciones de corticosterona, liberada por la activación del eje HHA, en respuesta al estresor. Este GC podría estar actuando a todos los niveles del eje HHT, siendo responsable de los bajos niveles de LH y T, así como en el epidídimo, causando mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado. En conjunto, estos resultados aportan evidencia de que el estrés crónico es un factor de infertilidad masculina.

14 REFERENCIAS

- Abi Nahed R, Martinez G, Escoffier J, Yassine S, Karaouzène T, Hograindleur JP, Turk J, Kokotos G, Ray PF, Bottari S, Lambeau G, Hennebicq S, Arnoult C. (2016). Progesterone-induced Acrosome Exocytosis Requires Sequential Involvement of Calcium-independent Phospholipase A2 β (iPLA2 β) and Group X Secreted Phospholipase A2 (sPLA2). *J Biol Chem*; 291(6):3076-89.
- 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.

- Acevedo-Rodriguez, A., Kauffman A. S., Cherrington B. D., Borges C. S., Roepke T. A., Laconi M. (2018). Emerging insights into hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation and interaction with stress signalling. *J Neuroendocrinol.*e12590.
- Anderson, K., Nisenblat, V., & Norman. R. (2010). Lifestyle factors in people seeking infertility treatment - A review. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*, 50(1), 8–20.
- Andric, S. A., Kojic Z., Bjelic M. M., Mihajlovic A. I., Baburski A. Z., Sokanovic S. J., Janjic M. M., Stojkov N. J., Stojilkovic S. S., Kostic T. S. (2012). The opposite roles of glucocorticoid and α 1-adrenergic receptors in stress-triggered apoptosis of rat Leydig cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Jan 1; 304(1): E51-9
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; Sperm.
- Aldana A, Carneiro J, Martínez-Mekler G, Darszon A. (2021). Discrete Dynamic Model of the Mammalian Sperm Acrosome Reaction: The Influence of Acrosomal pH and Physiological Heterogeneity. *Front Physiol.* 19; 12:682790.
- Almeida, S.A., Petenusci, S.O., Anselmo-Franci, J.A., Rosa-e-Silva, A.A., Lamano- Carvalho, T.L. (1998). Decreased spermatogenesis and androgenic testicular functions in adult submitted to immobilization-induced stress from puberty. *J. Med. Biol. Res.* 31, 1443–1448.
- Anjum, S., Khattak, M. N. K., Tsutsui, K., & Krishna, A. (2021). RF-amide related peptide-3 (RFRP-3): a novel neuroendocrine regulator of energy homeostasis, metabolism, and reproduction. *Molecular biology reports*, 48(2), 1837–1852.
- Arun S, Burawat J, Sukhorum W, Sampanang A, Maneenin C, Iamsaard S. (2016) Chronic restraint stress induces sperm acrosome reaction and changes in testicular tyrosine phosphorylated proteins in rats. *Int J Reprod Biomed*; 14(7):443-52.
- Arun, S., Chaiyamon, A., Lapyuneyong, N., Bunsueb, S., Wu, A. T., & Iamsaard, S. (2021). Chronic stress affects tyrosine phosphorylated protein expression and secretion of male rat epididymis. *Andrologia*, 53(3), e13981.
- Asensio, C., Muzzin, P., & Rohner-Jeanrenaud, F. (2004). Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 28 Suppl 4, S45–S52.
- Badrinarayanan, R., Rengarajan, S., Nithya, P., & Balasubramanian, K. (2006). Corticosterone impairs the mRNA expression and activity of 3 β - and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in adult rat Leydig cells. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 84(5), 745–754.
- Baker, M. A., Hetherington, L., Weinberg, A., Naumovski, N., Velkov, T., Pelzing, M., Dolman, S., Condina, M. R., & Aitken, R. J. (2012). Analysis of phosphopeptide changes as spermatozoa acquire functional competence in the epididymis demonstrates changes in the post-translational modification of Izumo1. *Journal of proteome research*, 11(11), 5252–5264.

- Barbagallo, F., Condorelli, R. A., Mongioi, L. M., Cannarella, R., Aversa, A., Calogero, A. E., & La Vignera, S. (2020). Effects of Bisphenols on Testicular Steroidogenesis. *Frontiers in endocrinology*, 11, 373.
- Barrett, K. E., Barman S. M., Boitano S., Brooks H. L. (2013). Fisiología del aparato reproductor masculino. *Ganong. Fisiología médica, 24e*. McGraw Hill.
- Bedford, J. M. (2015). Human spermatozoa and temperature: the elephant in the room. *Biology of reproduction*, 93(4), 97.
- Bentley, G. E., Kriegsfeld, L. J., Osugi, T., Ukena, K., O'Brien, S., Perfito, N., Moore, I. T., Tsutsui, K., & Wingfield, J. C. (2006). Interactions of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds and mammals. *Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology*, 305(9), 807–814.
- Belleannée, C., Thimon, V., & Sullivan, R. (2012). Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell and tissue research*, 349(3), 717–731.
- Berruti G. & Paiardi C. (2011). Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis*. (2):95-98.
- Björkgren, I., & Sipilä, P. (2019). The impact of epididymal proteins on sperm function. *Reproduction (Cambridge, England)*, 158(5), R155–R167.
- Björndahl, L., & Kvist, U. (2010). Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Molecular human reproduction*, 16(1), 23–29.
- Breen, K. M., & Mellon, P. L. (2014). Influence of stress-induced intermediates on gonadotropin gene expression in gonadotrope cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 385(1-2), 71–77.
- Briski, K. P., & Sylvester, P. W. (1991). Acute inhibition of pituitary LH release in the male rat by the glucocorticoid agonist decadron phosphate. *Neuroendocrinology*, 54(4), 313–320.
- Browne, J. A., Yang, R., Leir, S. H., Eggener, S. E., & Harris, A. (2016). Expression profiles of human epididymis epithelial cells reveal the functional diversity of caput, corpus and cauda regions. *Molecular human reproduction*, 22(2), 69–82.
- Buffone, M. G., Foster, J. A., & Gerton, G. L. (2008). The role of the acrosomal matrix in fertilization. *The International journal of developmental biology*, 52(5-6), 511–522.
- Burford NG, Webster NA, Cruz-Topete D. (2017). Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Modulation of Glucocorticoids in the Cardiovascular System. *Int J Mol Sci*. 6;18(10):2150
- Calvez, J., Fromentin, G., Nadkarni, N., Darcel, N., Even, P., Tomé, D., Ballet, N., & Chaumontet, C. (2011). Inhibition of food intake induced by acute stress in rats is due to satiation effects. *Physiology & behavior*, 104(5), 675–683.
- Cannarella R, Condorelli RA, Mongioi LM, La Vignera S, Calogero AE. (2020). Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. *Int J Mol Sci*. Mar 3; 21(5):1728.
- Casarini, L., & Crépieux, P. (2019). Molecular Mechanisms of Action of FSH. *Frontiers in endocrinology*, 10, 305.

- Chang H, Suarez SS. (2010). Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biol Reprod*; 83(4):507-13.
- Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual review of physiology*, 67, 259–284.
- Chen, H., Alves, M. B. R., & Belleannée, C. (2021). Contribution of epididymal epithelial cell functions to sperm epigenetic changes and the health of progeny. *Human reproduction update*, 28(1), 51–66.
- Chen, Y., Duan, F., Liu, L., Chen, G., He, Z., Huang, H., & Wang, H. (2022). Sex differences and heritability of adrenal steroidogenesis in offspring rats induced by prenatal nicotine exposure. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 221, 106102.
- Cheung, K. H., Leung, G. P., Leung, M. C., Shum, W. W., Zhou, W. L., & Wong, P. Y. (2005). Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. *The Journal of general physiology*, 125(5), 443–454.
- Cheuquemán, C., & Maldonado, R. (2021). Non-coding RNAs and chromatin: key epigenetic factors from spermatogenesis to transgenerational inheritance. *Biological research*, 54(1), 41.
- Chu, B., Marwaha, K., Sanvictores, T., & Ayers, D. (2021). *Physiology, Stress Reaction*. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Cooper TG & Yeung C-H (2003) Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Techn* 61, 28–38.
- Cooper T. G. (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(1), 9–11.
- Cornwall G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update*, 15(2), 213–227.
- Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M. (2012) Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*; 144(6):649-60.
- Cyr, D. G., Gregory, M., Dubé, E., Dufresne, J., Chan, P. T., & Hermo, L. (2007). Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian journal of andrology*, 9(4), 463–475.
- Da Silva, N., Piétrement, C., Brown, D., & Breton, S. (2006). Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. *Biochimica et biophysica acta*, 1758(8), 1025–1033.
- Da Silva, N., & Barton, C. R. (2016). Macrophages and dendritic cells in the post-testicular environment. *Cell and tissue research*, 363(1), 97–104.
- Dacheux, J. L., & Dacheux, F. (2013). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction (Cambridge, England)*, 147(2), R27–R42.
- Darszon, A., López-Martínez, P., Acevedo, J. J., Hernández-Cruz, A., & Treviño, C. L. (2006). T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell calcium*, 40(2), 241–252.

- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological reviews*, 91(4), 1305–1355.
- Dhanabalan, S., Jubendradass, R., Latha, P., & Mathur, P. P. (2011). Effect of restraint stress on 2,3,7,8 tetrachloro dibenzo-p-dioxin induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Human & experimental toxicology*, 30(7), 567–578.
- Diane, A., Victoriano, M., Fromentin, G., Tome, D., & Larue-Achagiotis, C. (2008). Acute stress modifies food choice in Wistar male and female rats. *Appetite*, 50(2-3), 397–407.
- Dimitriadis, F., Tsiampali, C., Chaliasos, N., Tsounapi, P., Takenaka, A., & Sofikitis, N. (2015). The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones (Athens, Greece)*, 14(4), 479–503.
- D'Occhio, M. J., Hengstberger, K. J., & Johnston, S. D. (2007). Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Animal reproduction science*, 101(1-2), 1–17.
- Dong, Q., Salva, A., Sottas, C. M., Niu, E., Holmes, M., & Hardy, M. P. (2004). Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. *Journal of andrology*, 25(6), 973–981.
- Du L, Chen W, Cheng Z, Wu S, He J, Han L, He Z., & Qin W. (2021). Novel Gene Regulation in Normal and Abnormal Spermatogenesis. *Cells*. Mar 17; 10(3):666.
- Eacker, S. M., Agrawal, N., Qian, K., Dichek, H. L., Gong, E. Y., Lee, K., & Braun, R. E. (2008). Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(3), 623–635.
- Finkelstein, M., Etkovitz, N., & Breitbart, H. (2020). Ca²⁺ signaling in mammalian spermatozoa. *Molecular and cellular endocrinology*, 516, 110953.
- Flores-González. (2023). Efecto del estrés crónico en el estado oxidante del epidídimo y sus consecuencias en la calidad de los espermatozoides epididimarios. Maestría en biología de la reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Foster, J. A., & Gerton, G. L. (2016). The Acrosomal Matrix. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 220, 15–33.
- García-Díaz, E. C., Gómez-Quiroz, L. E., Arenas-Ríos, E., Aragón-Martínez, A., Ibarra-Arias, J. A., & Retana-Márquez, M. del Socorro I. (2015). Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat. *Systems biology in reproductive medicine*, 61(3), 150–160.
- Gao, H. B., Tong, M. H., Hu, Y. Q., You, H. Y., Guo, Q. S., Ge, R. S., & Hardy, M. P. (2003). Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Molecular and cellular endocrinology*, 199(1-2), 153–163.
- Gautier, C., & Aurich, C. (2022). "Fine feathers make fine birds" - The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction. *Animal reproduction science*, 246, 106884.
- Geraghty AC, Muroy SE, Zhao S, Bentley GE, Kriegsfeld LJ., & Kaufner D. (2015). Knockdown of hypothalamic RFRP3 prevents chronic stress-induced infertility and embryo resorption. *Elife*.12; 4: e04316

- Gilbert SF. (2000). *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Spermatogenesis.
- Gollenberg, A. L., Liu, F., Brazil, C., Drobnis, E. Z., Guzik, D., Overstreet, J. W., Redmon, J. B., Sparks, A., Wang, C., & Swan, S. H. (2010). Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertility and sterility*, 93(4), 1104–1111.
- Godoy L. D., Rossignoli M. T., Delfino-Pereira P, Garcia-Cairasco N, de Lima Umeoka EH. (2018). A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Front Behav Neurosci*. Jul 3; 12:127.
- Grande G, Barrachina F, Soler-Ventura A, Jodar M, Mancini F, Marana R, Chiloiro S, Pontecorvi A, Oliva R, Milardi D. (2022). The Role of Testosterone in Spermatogenesis: Lessons From Proteome Profiling of Human Spermatozoa in Testosterone Deficiency. *Front Endocrinol (Lausanne)*.; 13:852661.
- Gregory M, & Cyr DG. (2014). The blood-epididymis barrier and inflammation. *Spermatogenesis*. Dec 31; 4(2): e979619.
- Grinshtain, E., Shpungin, S., Baum, M., Nir, U., & Breitbart, H. (2022). The Fer tyrosine kinase protects sperm from spontaneous acrosome reaction. *Developmental biology*, 487, 24–33.
- Guidobaldi, H. A., Hirohashi, N., Cubilla, M., Buffone, M. G., & Giojalas, L. C. (2017). An intact acrosome is required for the chemotactic response to progesterone in mouse spermatozoa. *Molecular reproduction and development*, 84(4), 310–315.
- Hales, D. B., & Payne, A. H. (1989). Glucocorticoid-mediated repression of P450scc mRNA and de novo synthesis in cultured Leydig cells. *Endocrinology*, 124(5), 2099–2104.
- Hammes, S. R., Levin, E. R. (2007). Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocrine reviews*, 28(7), 726–741.
- Hammond G. L. (2011). Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biology of reproduction*, 85(3), 431–441.
- HAMPL R. & Stárka L. (2020). Glucocorticoids affect male testicular steroidogenesis. *Physiol Res*. Sep 30; 69(Suppl 2): S205-S210.
- Hamzeh, M., & Robaire, B. (2010). Identification of early response genes and pathway activated by androgens in the initial segment and caput regions of the regressed rat epididymis. *Endocrinology*, 151(9), 4504–4514.
- Hardy, M. P., Gao, H. B., Dong, Q., Ge, R., Wang, Q., Chai, W. R., Feng, X., & Sottas, C. (2005). Stress hormone and male reproductive function. *Cell and tissue research*, 322(1), 147–153.
- Hermo L, Robaire B. (2002). Epididymal cell types and their functions. In: Robaire B, Hinton BT, editors. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Boston, MA: Springer.
- Hirano T, Kobayashi Y, Omotehara T, Tatsumi A, Hashimoto R, Umemura Y, Nagahara D, Mantani Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Hoshi N. (2014). Unpredictable chronic stress-induced reproductive suppression associated with the decrease of kisspeptin immunoreactivity in male mice. *J Vet Med Sci*.76 (9):1201-8.

- Hopkins, B. R., Sepil, I., & Wigby, S. (2017). Seminal fluid. *Current biology: CB*, 27(11), R404–R405.
- Hu, G. X., Lian, Q. Q., Lin, H., Latif, S. A., Morris, D. J., Hardy, M. P., & Ge, R. S. (2008). Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. *Steroids*, 73(9-10), 1018–1024.
- Hu, K. L., Chang, H. M., Li, R., Yu, Y., & Qiao, J. (2019). Regulation of LH secretion by RFRP-3 - From the hypothalamus to the pituitary. *Frontiers in neuroendocrinology*, 52, 12–21.
- Hunter R. H. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 87(1), 244–255.
- Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. (2012) Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl*; 14(6):816-21.
- Ijiri, T. W., Vadnais, M. L., Huang, A. P., Lin, A. M., Levin, L. R., Buck, J., & Gerton, G. L. (2013). Thiol changes during epididymal maturation: A link to flagellar angulation in mouse spermatozoa? *Andrology*, 2(1), 65–75.
- Ikawa M., Inoue N., Benham A. M., Okabe M. (2010). Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J. Clin. Invest.* 120, 984–994.
- Inoue N, Ikawa M, Nakanishi T, Matsumoto M, Nomura M, Seya T, Okabe M. (2003) Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol Cell Biol.* Apr;23(7):2614-22.
- Ittmann M. (2018). *Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate*. Cold Spring Harb Perspect Med. 1; 8(5): a030346.
- Iwasa T, Matsuzaki T, Yano K, Irahara M. (2017). Gonadotropin-Inhibitory Hormone Plays Roles in Stress-Induced Reproductive Dysfunction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 5; 8:62.
- Iwasa, T., Matsuzaki, T., Yano, K., Mayila, Y., & Irahara, M. (2018). The roles of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in stress-induced reproductive disorders. *Endocrine journal*, 65(2), 133–140.
- James ER, Carrell DT, Aston KI, Jenkins TG, Yeste M, Salas-Huetos A. (2020). The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *Int J Mol Sci.* Jul 29; 21(15):5377.
- Jan, S. Z., Hamer, G., Repping, S., de Rooij, D. G., van Pelt, A. M., & Vormer, T. L. (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1822(12), 1838–1850.
- Janevic, T., Kahn, L. G., Landsbergis, P., Cirillo, P. M., Cohn, B. A., Liu, X., & Factor-Litvak, P. (2014). Effects of work and life stress on semen quality. *Fertility and sterility*, 102(2), 530–538.
- Jin SK, Yang WX. (2017). Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget*.10; 8(2):3600-3627.
- Joëls, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(6), 459–466.

- Joseph D. N., & Whirlledge S. (2017). Stress and the HPA Axis: Balancing Homeostasis and Fertility. *Int J Mol Sci*. Oct 24;18(10):2224.
- John S. & Priti S. (2018). Spermatoocytes, Editor(s): Michael K. Skinner, *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, Academic Press, 2018, Pages 36-41, ISBN 9780128151457.
- Juárez-Rojas, A. L., García-Lorenzana, M., Aragón-Martínez, A., Gómez-Quiroz, L. E., & Retana-Márquez, M. (2015). Intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in rat testis by cold water immersion-induced acute and chronic stress. *Systems biology in reproductive medicine*, 61(4), 211–221.
- Juárez-Rojas, L., Casillas, F., López, A., Betancourt, M., Ommati, M. M., & Retana-Márquez, S. (2022). Physiological role of reactive oxygen species in testis and epididymal spermatozoa. *Andrologia*, 54(4), e14367.
- Kaewwongse, M., Takayanagi, Y., & Onaka, T. (2011). Effects of RFamide-related peptide (RFRP)-1 and RFRP-3 on oxytocin release and anxiety-related behaviour in rats. *Journal of neuroendocrinology*, 23(1), 20–27.
- Kaprara, A., & Huhtaniemi, I. T. (2018). The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism: clinical and experimental*, 86, 3–17.
- Ketchesin KD, Stinnett GS, Seasholtz AF. (2017). Corticotropin-releasing hormone-binding protein and stress: from invertebrates to humans. *Stress*. Sep; 20(5):449-464.
- Khawar, M. B., Gao, H., & Li, W. (2019). Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 195.
- Kim, K. S., Foster, J. A., & Gerton, G. L. (2001). Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biology of reproduction*, 64(1), 148–156.
- Kim, K. S., & Gerton, G. L. (2003). Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Developmental biology*, 264(1), 141–152.
- Kirby, E. D., Geraghty, A. C., Ubuka, T., Bentley, G. E., & Kaufer, D. (2009). Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(27), 11324–11329.
- Kivimäki, M., Head, J., Ferrie, J. E., Shipley, M. J., Brunner, E., Vahtera, J., & Marmot, M. G. (2006). Work stress, weight gain and weight loss: evidence for bidirectional effects of job strain on body mass index in the Whitehall II study. *International journal of obesity* (2005), 30(6), 982–987.
- Kobori, H., Miyazaki, S., & Kuwabara, Y. (2000). Characterization of intracellular Ca (2+) increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biology of reproduction*, 63(1), 113–120.
- 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.

- Kujala, M., Hihnala, S., Tienari, J., Kaunisto, K., Hästbacka, J., Holmberg, C., Kere, J., & Höglund, P. (2007). Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. *Reproduction (Cambridge, England)*, 133(4), 775–784.
- Ilaqua, A., Izzo, G., Emerenziani, G. P., Baldari, C., & Aversa, A. (2018). Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 16(1), 115.
- Leblond, C. P., & Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55(4), 548-573.
- Lee, C. H., Akin-Olugbade, O., & Kirschenbaum, A. (2011). Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 40(3), 565–ix.
- Lee DY, Kim E, Choi MH. (2015). Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Rep.* 48(4):209-16.
- Lestari S. W, Larasati M. D, Mansur I. G, Soelaeman M. F, Rahmat F. A, Azzahra F, Al-Rasyid F. A. (2018). Sperm Dynein AAA1 and AAA2 Expression in Human Sperm: A Regulation in Sperm Preparation. *Biomed Pharmacol J*; 11(1).
- Li, T., Yao, J., Zhang, Q., Li, Q., Li, J., Wang, X., Li, W., Chen, A., & Yan, J. (2020). Chronic stress impairs male spermatogenesis function and Nectin-3 protein expression in the testis. *Physiological research*, 69(2), 297–306.
- Liu XY, Shi JH, DU WH, Fan YP, Hu XL, Zhang CC, Xu HB, Miao YJ, Zhou HY, Xiang P, Chen FL. (2011). Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. *Exp Ther Med*; 2(5):977-984.
- Lucio, R.A., Tlachi, J.L., López, A. A., Zempoalteca, R., Velázquez-Moctezuma, J. (2009). Análisis se los parámetros del eyaculado en la rata Wistar de laboratorio: descripción de la técnica. *Vet. Méx.* 40(4): 405-415.
- Luo E, Stephens SB, Chaing S, Munaganuru N, Kauffman AS, Breen KM. (2016) Corticosterone Blocks Ovarian Cyclicity and the LH Surge via Decreased Kisspeptin Neuron Activation in Female Mice. *Endocrinology*. Mar;157(3):1187-99. PMID: PMC4769373.
- Maeda, N., Tahata, S., Yagi, T., Tanaka, E., Masu, K., Sato, M., Haeno, S., Onaga, T., & Yokota, H. (2015). Assessment of testicular corticosterone biosynthesis in adult male rats. *PloS one*, 10(2), e0117795.
- Martin, L. J., & Tremblay, J. J. (2008). Glucocorticoids antagonize cAMP-induced Star transcription in Leydig cells through the orphan nuclear receptor NR4A1. *Journal of molecular endocrinology*, 41(3), 165–175.
- Maynard, R., & Downes, N. (2019). Male Reproductive System. *Elsevier EBooks*, 207–217.
- McEwen BS, Akil H. (2020) Revisiting the Stress Concept: Implications for Affective Disorders. *J Neurosci.* 2; 40(1):12-21.
- McKay, A. C., Odeluga, N., Jiang, J., & Sharma, S. (2023). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Seminal Vesicle. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

- Michael K. (2018). Skinner Encyclopedia of Reproduction. ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780128151457/encyclopedia-of-reproduction>.
- Midzak, A., Akula, N., Lecanu, L., & Papadopoulos, V. (2011). Novel androstenediol interacts with the mitochondrial translocator protein and controls steroidogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 286(11), 9875–9887.
- Mifsud, K. R., & Reul, J. M. H. M. (2018). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated control of genomic responses to stress in the brain. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 21(5), 389–402.
- Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., Hill, R. Z., Bautista, D. M., Kirichok, Y., & Lishko, P. V. (2016). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6285), 555–559.
- Miller WL, & Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. (2011). *Endocr Re.*; 32(1):81-151.
- Moazamian, R., Polhemus, A., Connaughton, H., Fraser, B., Whiting, S., Gharagozloo, P., & Aitken, R. J. (2015). Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Molecular human reproduction*, 21(6), 502–515.
- Mondéjar, I., Acuña, O. S., Izquierdo-Rico, M. J., Coy, P., & Avilés, M. (2012). The oviduct: functional genomic and proteomic approach. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 47 Suppl 3, 22–29.
- Mucio-Ramírez JS. (2007). La neuroquímica del estrés y el papel de los péptidos opioides. *Revista de Educación Bioquímica.*;26(4):121-128.
- Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Toshimori, K., & Okabe, M. (2001). Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation. *Developmental biology*, 237(1), 222–231.
- Nirupama, M., Devaki, M., Nirupama, R., Yajurvedi, H. N. (2013). Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *Journal of physiology and biochemistry*, 69(1), 59–68.
- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A. L., Romero, F., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and biophysical research communications*, 450(3), 1149–1158.
- Nixon, B., De Iuliis, G. N., Dun, M. D., Zhou, W., Trigg, N. A., & Eamens, A. L. (2019). Profiling of epididymal small non-protein-coding RNAs. *Andrology*, 7(5), 669–680.
- Noda T, Ikawa M. (2019). Physiological function of seminal vesicle secretions on male fecundity. *Reprod Med Biol.*; 18(3):241-246.
- Noushad S., Ahmed S., Ansari B., Mustafa U. H., Saleem Y., Hazrat H. (2021). Physiological biomarkers of chronic stress: A systematic review. *Int J Health Sci (Qassim)*. Sep-Oct;15(5):46-59. PMID: 34548863; PMCID: PMC8434839.

- Oberheide, K., Puchkov, D., & Jentsch, T. J. (2017). Loss of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE8 causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *The Journal of biological chemistry*, 292(26), 10845–10854.
- Ouvrier A, Cadet R, Vernet P, Laillet B, Chardigny JM, Lobaccaro JM, Drevet JR, Saez F. (2009). LXR and ABCA1 control cholesterol homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner. *J Lipid Res*; 50(9):1766-75.
- Ozawa H. (2021). Kisspeptin neurons as an integration center of reproductive regulation: Observation of reproductive function based on a new concept of reproductive regulatory nervous system. *Reprod Med Biol*. 7; 21(1): e12419.
- Patrat, C., Serres, C., & Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the cell*, 92(3-4), 255–266.
- Parthasarathy, C., & Balasubramanian, K. (2008). Differential effect of corticosterone deficiency on the expression of LH, prolactin and insulin receptors on rat Leydig cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 285(1-2), 34–42.
- Peng YC, Levine CM, Zahid S, Wilson EL, Joyner AL. (2013). Sonic hedgehog signals to multiple prostate stromal stem cells that replenish distinct stromal subtypes during regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 110(51):20611-6.
- Pereira R, Sá R, Barros A, Sousa M. (2017). Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl*; 19(1):5-14.
- Perrett RM, McArdle CA. (2013) Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone signaling: integrating cyclic nucleotides into the network. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 20; 4:180.
- Petrobon, E. O., Monclus, M. deL., Alberdi, A. J., & Fornés, M. W. (2003). Progesterone receptor availability in mouse spermatozoa during epididymal transit and capacitation: ligand blot detection of progesterone-binding protein. *Journal of andrology*, 24(4), 612–620.
- Pincas H, Choi SG, Wang Q, Jia J, Turgeon JL, Sealfon SC (2014). Outside the box signaling: secreted factors modulate GnRH receptor-mediated gonadotropin regulation. *Mol Cell Endocrinol*. 25; 385(1-2):56-61.
- Poiani, A. (2006). Complexity of seminal fluid: a review. *Behav Ecol Sociobiol* 60, 289–310.
- Prajapati, P., Kane, S., McBrinn, R. C., Dean, M. S., Martins da Silva, S. J., & Brown, S. G. (2022). Elevated and Sustained Intracellular Calcium Signalling Is Necessary for Efficacious Induction of the Human Sperm Acrosome Reaction. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11253.
- Przygodzka E, Plewes MR, Davis JS. (2021) Luteinizing Hormone Regulation of Inter-Organellar Communication and Fate of the Corpus Luteum. *Int J Mol Sci*. 15; 22(18):9972.
- Ramm S. A. (2020). Seminal fluid and accessory male investment in sperm competition. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 375(1813), 20200068.

- Redgrove KA, McLaughlin EA. (2014). The Role of the Immune Response in Chlamydia trachomatis Infection of the Male Genital Tract: A Double-Edged Sword. *Front Immunol.* Oct 27; 5:534.
- Reichmann F, Holzer P. (2016). Neuropeptide Y: A stressful review. *Neuropeptides.* Feb; 55:99-109. PMID: PMC4830398.
- Ren, L., Li, X., Weng, Q., Trisomboon, H., Yamamoto, T., Pan, L., Watanabe, G., & Taya, K. (2010). Effects of acute restraint stress on sperm motility and secretion of pituitary, adrenocortical and gonadal hormones in adult male rats. *The Journal of veterinary medical science*, 72(11), 1501–1506.
- Retana-Márquez, S, Domínguez-Salazar, E., Velázquez-Moctezuma, J. (1996). Effect of acute and chronic stress on masculine sexual behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology.* 21(1), 39-50.
- Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Martínez-García, R., & Velázquez-Moctezuma, J. (2003). Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones and behavior*, 44(4), 327–337.
- Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Domínguez-Salazar, E., Martínez-García, R., & Velázquez-Moctezuma, J. (2003). Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 28(2), 207–227.
- 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.
- Retana-Márquez, S., Juárez-Rojas, L., Casillas, F. (2015). Interaction of Adrenal and Gonadal Axes during Stress in Males. *Journal of Zoological Sciences.* 3. 13-22.
- 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 J Androl.* Jul-Aug; 20(4):385-390.
- Ritagliati, C., Baro Graf, C., Stival, C., & Krapf, D. (2018). Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mechanisms of development*, 154, 33–43.
- Robaire B., Hinton B.T., Orgebin-Crist M. (2006) CHAPTER 22—The Epididymis. In: Neill K., editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3rd ed. Academic Press; Cambridge, NY, USA.
- Robaire, B., Seenundun, S., Hamzeh, M., & Lamour, S. A. (2007). Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. *Asian journal of andrology*, 9(4), 545–553.
- Robaire, B., & Hamzeh, M. (2011). Androgen action in the epididymis. *Journal of andrology*, 32(6), 592–599.
- Romero L. M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends in ecology & evolution*, 19(5), 249–255.

- Saki, G., Rahim, F., & Alizadeh, K. (2009). Effect of forced swimming stress on count, motility and fertilization capacity of the sperm in adult rats. *Journal of human reproductive sciences*, 2(2), 72–75.
- Sánchez González, S. R., Mata Martínez, E., Torres Juárez, J. A., Arias, R. J., De Blas, G. A., & Sánchez Tusie, A. A. (2023). Cortisol modulates Ca²⁺ signaling and acrosome reaction in human sperm. *Andrology*, 11(1), 134–142.
- Schultz, R., Isola, J., Parvinen, M., Honkaniemi, J., Wikström, A. C., Gustafsson, J. A., & Peltto-Huikko, M. (1993). Localization of the glucocorticoid receptor in testis and accessory sexual organs of male rat. *Molecular and cellular endocrinology*, 95(1-2), 115–120.
- Selye H. (1936). A syndrome produced by diverse noxious agents. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 10(2), 230–231.
- Siu KK, Serrão VHB, Ziyat A, Lee JE. (2021). The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion. *J Cell Biol.* 4; 220(10): e202102146.
- Smith, T. T., & Yanagimachi, R. (1991). Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *Journal of reproduction and fertility*, 91(2), 567–573.
- Smith LB, Walker WH. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol.* Jun;30:2-13.
- Sohni, A., Tan, K., Song, H. W., Burow, D., de Rooij, D. G., Laurent, L., Hsieh, T. C., Rabah, R., Hammoud, S. S., Vicini, E., & Wilkinson, M. F. (2019). The Neonatal and Adult Human Testis Defined at the Single-Cell Level. *Cell reports*, 26(6), 1501–1517.e4.
- Son, Y. L., Ubuka, T., Millar, R. P., Kanasaki, H., & Tsutsui, K. (2012). Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits GnRH-induced gonadotropin subunit gene transcriptions by inhibiting AC/cAMP/PKA-dependent ERK pathway in LβT2 cells. *Endocrinology*, 153(5), 2332–2343.
- Sominsky L, & Spencer SJ. (2014). Eating behavior and stress: a pathway to obesity. *Front Psychol*; 5:434.
- Sosa, C. M., Zanetti, M. N., Pocognoni, C. A., & Mayorga, L. S. (2016). Acrosomal Swelling Is Triggered by cAMP Downstream of the Opening of Store-Operated Calcium Channels During Acrosomal Exocytosis in Human Sperm. *Biology of reproduction*, 94(3), 57.
- Stamatiades, G. A., & Kaiser, U. B. (2018). Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Molecular and cellular endocrinology*, 463, 131–141.
- Stival, C., Puga Molina, L. delC., Paudel, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E., & Krapf, D. (2016). Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 220, 93–106.
- Suarez S. S. (2002). Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 37(3), 140–143.
- Suede SH, Malik A, & Sapra A. Histology, Spermatogenesis. (2023). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Jan.

- Sullivan R & Belleannee C. (2017) Role of the epididymis in sperm maturation. In: *The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, 2nd Edn (eds CJ De Jonge & CLR Barratt), pp. 73–85. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Sun, T. T., Chung, C. M., & Chan, H. C. (2011). Acrosome reaction in the cumulus oophorus revisited: involvement of a novel sperm-released factor NYD-SP8. *Protein & cell*, 2(2), 92–98.
- Thompson, A., Agarwal, A., & du Plessis, S. S. (2013). Physiological role of reactive oxygen species in sperm function: A review. In S. Parekattil, & A. Agarwal (Ed.), *Antioxidants in male infertility: A guide for clinicians and researchers* (pp. 69–89). Springer.
- Tokuhiro, K., Ikawa, M., Benham, A. M., & Okabe, M. (2012). Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male fertility [corrected]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), 3850–3855
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research*, 53(4), 865–871.
- Ubuka T, Son YL, Tobari Y, Tsutsui K. (2012). Gonadotropin-inhibitory hormone action in the brain and pituitary. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 28; 3:148.
- Ulrich-Lai Y. M., Herman J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*. Jun; 10(6):397-409.
- Visconti P. E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(3), 667–668.
- Wagner, H., Cheng, JW y Ko, EY (2018). Papel de las especies reactivas de oxígeno en la infertilidad masculina: una revisión actualizada de la literatura. *Árabe J. Urol*. 16 (1), 35–43.
- Walker WH. (2011). Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis*. Apr; 1(2):116-120.
- Wang, Y., Li, H., Zhu, Q., Li, X., Lin, Z., & Ge, R. S. (2019). The cross talk of adrenal and Leydig cell steroids in Leydig cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 192, 105386
- Wang Y, Chen F, Ye L, Zirkin B, Chen H. (2017) Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. *Reproduction*;154(4): R111-R122.
- Weigel Muñoz, M., Battistone, M. A., Carvajal, G., Maldera, J. A., Curci, L., Torres, P., Lombardo, D., Pignataro, O. P., Da Ros, V. G., & Cuasnicú, P. S. (2018). Influence of the genetic background on the reproductive phenotype of mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Biology of reproduction*, 99(2), 373–383.
- Whirledge S, Cidlowski JA. (2010). Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinol*. Jun; 35(2):109-25.
- Whirledge S, Cidlowski JA. (2013). A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. Dec; 154(12):4450-68.

- Whirledge S, Cidlowski JA. (2017) Glucocorticoids and Reproduction: Traffic Control on the Road to Reproduction. *Trends Endocrinol Metab.* Jun; 28(6):399-415.
- Xiao, Y. C., Huang, Y. D., Hardy, D. O., Li, X. K., & Ge, R. S. (2010). Glucocorticoid suppresses steroidogenesis in rat progenitor Leydig cells. *Journal of andrology*, 31(4), 365–371.
- Yang JA, Hughes JK, Parra RA, Volk KM, Kauffman AS. (2018). Stress rapidly suppresses in vivo LH pulses and increases activation of RFRP-3 neurons in male mice. *J Endocrinol*; 239(3):339-350.
- Yazawa, H., Sasagawa, I., & Nakada, T. (2000). Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(9), 1917–1920
- Yoshida, M., & Yoshida, K. (2011). Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca²⁺. *Molecular human reproduction*, 17(8), 457–465.
- Zakrzewska, K. E., Cusin, I., Sainsbury, A., Rohner-Jeanrenaud, F., & Jeanrenaud, B. (1997). Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance. *Diabetes*, 46(4), 717–719.
- Zhou, W., De Iuliis, G. N., Dun, M. D., & Nixon, B. (2018). Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. *Frontiers in endocrinology*, 9, 59.
- Zhou, D., Suzuki, T., Asami, M., & Perry, A. C. F. (2019). Caput Epididymidal Mouse Sperm Support Full Development. *Developmental cell*, 50(1), 5–6.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00123

Matrícula: 2213800805

Efecto del estrés crónico en la calidad de los espermatozoides epididimarios y reacción acrosomal en ratas macho adultas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 18 del mes de abril del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS
DR. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ
DRA. EDITH ARENAS RIOS

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DE: HABIT VANSIDARY MEDINA GUZMÁN

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



HABIT VANSIDARY MEDINA GUZMÁN
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUÍS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL

DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS

VOCAL

DR. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ

SECRETARIA

DRA. EDITH ARENAS RIOS