



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA SOBRE LA CONDUCTA SEXUAL
MASCULINA, LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y LAS HORMONAS METABÓLICAS EN
LA RATA WISTAR LONGEVA**

TESIS QUE PARA OBTENER

EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

M. en BRA. PABLO LÓPEZ DE JESÚS

CODIRECTORES DE TESIS

**DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
DR. JUAN CARLOS FLORES ALONSO**

ASESORA

DRA. EDITH ARENAS RÍOS

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2023

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva del Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Marcela Arteaga Silva, y en el Laboratorio de Biología de la Reproducción, del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (IMSS) bajo la dirección del Dr. Juan Carlos flores Alonso.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de Doctorado, con el número de registro CVU/Becario: 718777, que comprendió del periodo de 01 de enero de 2018 al 31 de diciembre de 2021. El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y, además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

M. en BRA. Pablo López De Jesús.

Ciudad de México enero 2023.

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN:

Fecha de aprobación de la tesis 31 de enero 2023

JURADO:

Presidente

Dra. Marcela Arteaga Silva

Secretario

Dr. Juan Carlos Flores Alonso

Vocal

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Vocal

Dra. Isabel Arrieta Cruz

Vocal

Dra. Mirna Ruíz Ramos

ACTA DE EXAMEN



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00136

Matrícula: 2181800557

Efecto de la restricción calórica sobre la conducta sexual masculina, la calidad espermática y las hormonas metabólicas en la rata *Wistar longeva*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 31 del mes de enero del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
DR. JORGE ISMAEL CASTAÑEDA SANCHEZ
DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ
DRA. MIRNA RUIZ RAMOS
DR. JUAN CARLOS FLORES ALONSO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: PABLO LOPEZ DE JESUS

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

Aprobar

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



[Signature]

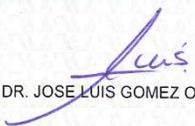
PABLO LOPEZ DE JESUS
ALUMNO

REVISÓ



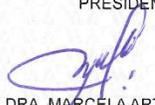
MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



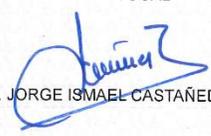
DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

VOCAL



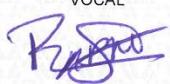
DR. JORGE ISMAEL CASTAÑEDA SANCHEZ

VOCAL



DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ

VOCAL



DRA. MIRNA RUIZ RAMOS

SECRETARIO



DR. JUAN CARLOS FLORES ALONSO

DEDICATORIA

A Dios y a la vida.

Quiero dedicar este trabajo a mis padres: Pablo López Rosas y Zenaida De Jesús Hernández, quienes siempre me han guiado por el camino correcto en busca del éxito y la felicidad con valores, carisma, empatía y humildad; porque a pesar de los momentos difíciles de la vida siempre han respondido con una sonrisa, porque son el mejor ejemplo de perseverancia, amor y sabiduría.

A mis hermanos que siempre han estado para apoyarme en los momentos difíciles de la vida, sin su apoyo no podría haber llegado hasta aquí, me enseñaron todo lo que sé de unión, apoyo, perseverancia, paciencia, porque cada uno me ha brindado una experiencia y aprendizaje que no cambiaría por nada, porque contar con ellos es una gran bendición de la vida, no cambiaría por nada la infancia y vida que he tenido con ellos, los amo como a nadie.

A mis niños: Soni que gracias a ti he vivido la experiencia de ser padre, que sin duda ha sido lo mejor que pudo pasarme, y que tú me has podido regalar, te amo inmensamente.

A Alex, Jesús Ernesto, mi pequeña Isabella, Ander, mi Nahamani, el pequeño oso hormiguero, David, Mía y Camila, todos forman parte del futuro que me gustaría construir para ustedes, uno lleno de magia y aprendizajes.

A mis amigas: Ángeles Manzano y Soledad Barradas quienes me han enseñado a luchar contra las adversidades, con su amistad y consejos pude llegar hasta acá, con su apoyo he podido terminar una etapa más, una en donde ustedes están latentes con cariño con aprendizajes y muchos sueños por cumplir, deseo nunca se vayan de mi vida. A Crisanto, Sherlyn, Mario; Sin el apoyo de todos ustedes no podría haber culminado esta etapa de la vida profesional, porque hubo muchos altibajos que me ayudaron a superar, siempre he podido contar con ustedes para echarme la mano y salir a flote ante cualquier situación. Sin duda ustedes son la familia que pude escoger.

¡Muchas Gracias a todos!

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta etapa de mi vida profesional trajo consigo múltiples emociones, problemas, decepciones y caídas que al final hacían que resurgiera con más fuerza, gracias al apoyo de mis amigos y familia, les agradezco infinitamente.

A mis codirectores del trabajo:

Dr. Juan Carlos flores Alonso, que siempre estuvo al pendiente, con paciencia, tanto para escucharme, para enseñarme y para guiarme, gracias a él aprendí lo que no quiero transmitir a las futuras generaciones y a mirar siempre para adelante, a creer en mi trabajo y en mi esfuerzo, por apoyarme con las ideas locas que surgían en mi cabeza y por hacerlas realidad, porque además de formarme, ahora tengo un colega y amigo.

A la Dra. Marcela Arteaga Silva. Por todo el apoyo brindado, por todo el esfuerzo que ambos realizamos, por la disposición al trabajo, por aguantarme desde la maestría, sin su apoyo no podría haber terminado esta etapa de mi vida, le estaré eternamente agradecido.

Dra. Edith Arenas Ríos. Por brindarme esperanza y confianza cuando lo necesitaba, por el apoyo constante, por ser el adulto responsable ante las adversidades.

A la Dra. Isabel Arrieta: Por formar parte del proyecto, por las aportaciones tanto al trabajo como a mi vida profesional, por creer en mí, por brindarme esperanza y por valorar mi trabajo, siempre le guardaré admiración y respeto, por la gran persona y profesional que es.

A la Dra. Mirna Ruíz: Por el apoyo, por los comentarios que sin duda me mostraron una versión del trabajo que no había visto, por su gran aportación y por su apoyo.

Al Dr. Jorge Castañeda. Por formar parte importante en la realización del trabajo, por el apoyo ante las adversidades, por tener disposición al trabajo, por representar lo bueno de la UAM que tanto me hacía falta.

A la Dra. Rosalina Reyes luna: Por forjarme e inducirme al camino de la ciencia que es fascinante y que será por siempre mi mamá académica.

A la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, que siempre creyó en mí, me apoyo cuando lo necesité, por alentarme a ser mejor siempre.

A todo el equipo del laboratorio que fue parte fundamental del trabajo: Germán, Ulises, Pedro, Karina, Nohemí, Daniel, gracias por ayudarme a crecer profesionalmente, por los aprendizajes, por todas las aventuras.

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El que suscribe el M. en BRA. Pablo López De Jesús, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y autor de la tesis titulada: “Efecto de la restricción calórica sobre la conducta sexual masculina, la calidad espermática y las hormonas metabólicas en la rata Wistar longeva”.

Declaro que:

1. La tesis que presento ante el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, para lo obtención del grado de Doctor 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 no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y/o 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 esta, 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 31 de enero del 2023



M. en BRA. Pablo López De Jesús

CARTA DE SESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 31 de enero del año 2023, quien suscribe el M. en BRA. Pablo López De Jesús, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es autor intelectual de la tesis titulada “Efecto de la restricción calórica sobre la conducta sexual masculina, la calidad espermática y las hormonas metabólicas en la rata Wistar longeva”, bajo la dirección del Comité Tutorial conformado por la Dra. Marcela Arteaga Silva, Dr. Juan Carlos Flores Alonso y la Dra. Edith Arenas Ríos, cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso del autor o del Comité Tutorial del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico pldj_89@hotmail.com; si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente de este.

ATENTAMENTE



M. en BRA. Pablo López De Jesús

“Nunca es demasiado tarde para convertirnos en lo que hubiéramos podido ser”

George Eliot

Índice General

Título	Página
Resumen	V
Abstract	VI
1.0 Introducción.....	1
2.0 Marco teórico.....	3
2.1 Teorías del envejecimiento.....	6
2.2 Vías de señalización involucradas en el envejecimiento.....	11
2.3 Metabolismo energético.....	17
2.4 Regulación del metabolismo.....	18
2.5 Restricción calórica (RC).....	23
2.6 Parámetros reproductivos en el envejecimiento.....	25
2.7 Anexina V como marcador apoptótico en testículo.....	27
2.8 Restricción calórica y parámetros reproductivos.....	29
3.0 Justificación.....	30
4.0 Pregunta de investigación.....	31
5.0 Hipótesis.....	31
6.0 Objetivos.....	31
6.1 General.....	31
6.2 Específicos.....	31
7.0 Materiales y métodos.....	32
7.1 Sujetos experimentales.....	32
7.2 Evaluación de la conducta sexual masculina	32
7.3 Obtención de espermatozoides epididimarios	33
7.4 Evaluación de los parámetros microscópicos de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo.....	33
7.5 Análisis de vitalidad.....	33
7.6 Análisis de la concentración espermática.....	34
7.7 Fragmentación del ADN por electroforesis de célula única (Prueba cometa)	34

7.8 Cuantificación de apoptosis por anexina V.....	35
7.9 Determinación de glucosa y hormonas plasmáticas.....	35
7.10 Diseño experimental.....	36
8.0 Análisis estadístico.....	37
9.0 Resultados.....	38
9.1 Registro del consumo de alimento.....	38
9.2 Alimento del bioterio.....	38
9.3 Pérdida/ganancia de peso y supervivencia.....	40
9.4 Análisis de la conducta sexual masculina.....	42
9.5 Parámetros de calidad espermática.....	44
9.6 Cuantificación de hormonas sexuales.....	46
9.7 Cuantificación de parámetros metabólicos.....	44
9.8 Cuantificación de apoptosis por anexina V.....	50
10.0 Discusión.....	51
11.0 Conclusiones.....	58
12.0 Perspectivas.....	59
13.0 Bibliografía.....	60
14.0 Anexos.....	78

Índice de tablas y figuras

Título	Página
Tabla 1. Análisis bromatológico proporcionado por la UAMI.....	38
Tabla 2. Análisis bromatológico FMVZ UNAM.....	39
Tabla 3. Calorías contenidas en un gramo de alimento.....	39
Tabla 4. Calorías consumidas en los grupos experimentales.....	40
Tabla 5. Efecto de la RC sobre el peso corporal en el envejecimiento de la rata Wistar....	40
Tabla 6. Efecto de la restricción calórica sobre la conducta sexual masculina en el envejecimiento de la rata Wistar.....	43
Tabla 7. Efecto de la restricción calórica sobre la calidad espermática en el envejecimiento de la rata Wistar	45
Tabla 8. Cuantificación de parámetros metabólicos.....	49
Figura 1. Representación de las alteraciones endócrinas durante el envejecimiento.....	8
Figura 2. Representación de la producción del estrés oxidante daño a nivel celular.....	11
Figura 3. Representación del metabolismo energético.....	19
Figura 4. Anexina V como marcador apoptótico y necrótico.....	28
Figura 5. Línea de tiempo del diseño experimental.....	36
Figura 6. Efecto de la restricción calórica en la supervivencia de la rata Wistar envejecida.....	41
Figura 7. Morfología corporal de los animales sometidos a RC.....	42
Figura 8. Efecto de la restricción calórica en la apoptosis del área total del testículo y en los tubos seminíferos en ratas macho Wistar envejecidas.....	50

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
RC	Restricción calórica
CSM	Conducta Sexual Masculina
SIRT1	Sirtuina 1
mTOR	Objetivo de rapamicina en mamífero del complejo (Target of Rapamycin)
IGF1	Factor de crecimiento similar a la insulina
PGC1a	Coactivador del receptor gamma 1 alfa
FOXO	Factores de transcripción (Forkhead box O)
Box O3	Caja de cabeza de orquilla (Forkhead box O3)
AKT	Proteína cinasa T
T	Testosterona
E ₂	Estradiol
PRL	Prolactina
HHG	Hipotálamo Hipófisis Gónada
OMS	Organización Mundial de la Salud
DHT	Dihidrotestosterona
GnRH	Hormona liberadora de Gonadotropinas
LH	Hormona Luteinizante
FSH	Hormona Folículo Estimulante
RL	Radicales libres
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
HIF1	Factor 1 alfa inducible por hipoxia
NRF2	Factor de transcripción

P53	Proteína supresora de tumores
NFKB	Complejo proteico
SOD	Superóxido Dismutasa
CAT	Catalasa
ADNm	Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial
ATP	Adenosina trifosfato
ERO	Especies Reactivas de Oxigeno
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	Adenosina Monofosfato Kinasa
mTORC1	Objetivo de rapamicina en mamífero del complejo 1
TSC	Sclerosis Tuberosa (Tuberous sclerosis)
GTP	Guanosina trifosfato
Rag	Genes activadores de recombinación
mTORC2	Objetivo de rapamicina en mamífero del complejo 2
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PKB	Proteína cinasa B
IGF	1R Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina
HG	Hormona de Crecimiento
CMA	Chaperona Mediada por Autofagia
KFERG	Secuencia en ribonucleasa A mediada por citotoxicidad
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
CARM1	Coactivador asociado a arginina metiltransferasa
A2AR	Receptor de adenosina A2
SIRT3	Sirtuina 3

RE	Retículo Endoplasmático
ATM	Proteína Kinasa
ULK1	Cinasa activadora de autofagia
UPR	Respuesta de la proteína desplegada
SIRT2	Sirtuina 2
SIRT6	Sirtuina 6
SRT 1720	Activador de sirtuina 1
MHY 2233	Activador de sirtuina 1
Rea	Receptor a Estrógenos alfa
PPAR	Receptor gamma activado por proliferados de peroxisoma
E3 NEDD41	Proteína ligasa para MDM2 (Regulador negativo de P53)
HPG	L. Homopropargilglicina
FNT	Factor de Necrosis Tumoral
IL	Interleucina
RI	Resistencia a la Insulina
FFA	Plasma libre de ácidos grasos
PS	Fosfatidilserina
IP	Yoduro de Propidio
LM	Latencia de Monta
LI	Latencia de Intromisión
NM	Número de Monta
NI	Número de Intromisión
LE	Latencia de Eyaculación
IPE	Intervalo Posteyaculatorio

PBS	Solución Salina tamponada con fosfato
NaCL	Cloruro de Sodio
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
TRIS	Trisaminometano
TritonX	Tensoactivo no iónico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Desviación estándar
ANOVA	Análisis de Varianza

Resumen

Los avances en la comprensión en el proceso del envejecimiento han permitido retrasar dicho evento y aumentar la longevidad. Diversos estudios indican que el envejecimiento puede estar influenciado por muchos factores, incluyendo los nutricionales. Así, se sabe que el control dietético puede ser un factor importante sobre la longevidad, demostrándose que la restricción calórica (RC) es la manipulación fisiológica más eficaz para extender la expectativa máxima de vida en algunas especies animales y mejorar el estado de salud en los humanos, dentro de los efectos benéficos sistémicos se encuentran: la mejora a la resistencia a la insulina, mantenimiento de la función hormonal y reproductiva, esto en sujetos jóvenes. Sin embargo, los efectos de la RC en el envejecimiento no han sido totalmente esclarecidos. Por lo que el objetivo principal de este estudio fue evaluar los efectos de la RC sobre parámetros metabólicos y reproductivos en un modelo animal envejecido. Se utilizaron ratas macho Wistar de 12 meses de edad, las cuales fueron distribuidas en los siguientes grupos: control (*ad libitum*), RC 15% y RC 35% durante 6 meses (ratas de 18 meses de edad) y 12 meses (ratas 24 meses de edad); al término de la RC se evaluaron parámetros reproductivos como: la conducta sexual masculina “CSM” y la calidad espermática; así como los bioquímicos: glucosa, hormonas gluco-reguladoras y esteroides sexuales a nivel plasmático. Además, se cuantificó la anexina V en el epitelio seminífero del tejido testicular como marcador de daño o muerte celular. Los resultados obtenidos mostraron que los grupos sometidos a RC a los 6 meses mejoran la CSM y la calidad espermática asociados a un incremento en la testosterona plasmática y anexina V en el epitelio seminífero de los testículos en comparación con su grupo control. Interesantemente, el perfil metabólico de los animales con RC mejoró en comparación a su grupo control basado en la disminución de la glucosa, la insulina, la leptina y el estradiol plasmático. Sin embargo, a los 12 meses de RC no se mantienen los efectos de la RC sobre los parámetros reproductivos. Nuestros datos sugieren que la RC iniciada en la edad madura restablece la CSM, así como la función reproductiva en animales viejos a los 6 meses de RC, a expensas de la mejoría en la función endocrina durante el envejecimiento.

Palabras clave: Restricción calórica, conducta sexual, tubos seminíferos, testículo, testosterona.

Abstract:

Advances in understanding of aging process have made it possible to delay this event and increase longevity. Some studies indicate that aging can be influenced by many factors, including nutritional ones. Thus, it is known that dietary control can be an important factor on longevity, demonstrating that caloric restriction (CR) is the most effective physiological manipulation to extend the maximum life expectancy in some animal species and improve the state of health. In humans, within the systemic beneficial effects are: improvement in insulin resistance, maintenance of hormonal and reproductive function, this in young subjects. However, the effects of CR on aging have not been fully clarified. Therefore, the main objective of this study was to evaluate the effects of CR on metabolic and reproductive parameters in an aged animal model. Male Wistar rats of 12 months of age were used, which were distributed in the following groups: control (*ad libitum*), RC 15% and RC 35% for 6 months (18-month-old rats) and 12 months (24-month-old rats); at the end of the CR, reproductive parameters such as: male sexual behavior "MSB" and sperm quality were evaluated; as well as biochemicals: glucose, glycoregulatory hormones and sex steroids at the plasmatic level. In addition, annexin V was quantified in the seminiferous epithelium of testicular tissue as a marker of cell damage or death. The results obtained showed that the groups with CR at 6 months improved MSB and sperm quality associated with an increase in plasma testosterone and annexin V in the seminiferous epithelium of the testicles compared to the control group. Interestingly, the metabolic profile of CR animals was improved compared to their control group based on decreased plasma glucose, insulin, leptin, and estradiol. However, after 12 months of CR, the effects of CR on reproductive parameters are not maintained. Our data suggest that CR initiated in middle age restores MSB, as well as reproductive function in old animals at 6 months of CR, at the expense of improved endocrine function during aging.

Keywords: calorie restriction; male sexual behavior; seminiferous tubules; testis; testosterone

1.0 Introducción

La restricción calórica (RC) es la reducción de la ingesta de calorías sin detrimento de la nutrición, lo que significa disminuir todos los nutrientes del individuo (proteínas, lípidos, minerales, carbohidratos) afectando sólo la ingesta energética, sin comprometer el funcionamiento del organismo (McCay *et al.*, 1935; Pifferi & Aujard, 2019). La RC es una de las intervenciones geroprotectoras más estudiadas y efectivas en diversos modelos animales, tales como: *caenorhabditis elegans*, *drosophila melanogaster* y en ratones (Weindruch & Sohal, 1997; Fontana y Partridge, 2015); a través de la activación de moléculas mensajeras como la SIRT1, mTOR, IGF1, PGC-1a, FOXO3 (forkhead Box O3), y AKT (protein kinase B), que son capaces de modular el envejecimiento y prolongar la vida de las especies antes mencionadas (Fontana y Partridge, 2015; Niederhofer *et al.*, 2017).

La creciente evidencia ha sugerido que la RC también beneficia la vida útil y la salud de los primates y los humanos (Kemnitz, 2011; Marchal *et al.*, 2012; Le Bourg, 2018); se ha demostrado que la RC puede facilitar la condición física, reduce el índice de masa corporal, mejora el estado de la piel, la función hepática y renal, disminución de riesgo a enfermedades cardiovasculares, así como el mantenimiento de la función endocrina y el restablecimiento de la conducta sexual (McCay *et al.*, 1935; Fontana y Partridge, 2015; Mattison, 2017; Pifferi & Aujard, 2019).

Las concentraciones adecuadas de hormonas como la testosterona (T), el estradiol (E₂), e incluso la prolactina (PRL) son necesarios para la expresión de la conducta sexual masculina (CSM) en los mamíferos, la cual ocurre en respuesta a la presencia de una pareja sexualmente potencial (Jennings & de Lecea, 2020). El despliegue de la CSM requiere de una serie de factores externos e internos, como: el ciclo circadiano o estacional, la temperatura y la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) (Hull & Domínguez, 2015; Pascual-Mathey *et al.*, 2015); además de un sustrato neural capaz de recibir y procesar los estímulos externos para iniciar la interacción sexual, que da lugar a las respuestas motoras que incluyen la monta, intromisión y la eyaculación (Moralí *et al.*, 2003; Bonilla-Jaime *et al.*, 2006;), una alteración en estas hormonas inhibe la CSM (Corona *et al.*, 2016; Kahn & Brannigan 2017; Khodamoradi *et al.*, 2020). Amplia evidencia ha demostrado que la CSM disminuye con la edad en ratas macho (Smith *et al.*, 1992; Wu & Gore., 2010) alterándose los parámetros de latencia de eyaculación y tasa de intromisión en ratas de 24 meses de edad (Lucio *et al.*, 2013). Así como un déficit funcional en las células testiculares (Barry *et al.*, 2000) y como consecuencia se ha reportado una disminución en el número de espermatozoides y de células germinales. La pérdida de las células germinales podría estar relacionado con una disminución en la capacidad de las células de

Sertoli para soportar la supervivencia de las células germinales y su diferenciación, o bien, la reducción en la disponibilidad de T producida por las células de Leydig (Chen *et al.*, 2004). Otros estudios realizados en ratas longevas Brown Norman observaron un aumento en la expresión de genes relacionados con procesos de envejecimiento en la cauda y cuerpo del epidídimo, sitio en donde los espermatozoides obtienen su maduración y son almacenados (Kathryn & Bernard, 2003). Por lo que el proceso del envejecimiento puede ser un factor determinante en la disminución progresiva de la función reproductiva masculina.

A la fecha, los efectos benéficos de la RC sobre la conducta sexual en los roedores no han sido aclarados completamente, debido a que sus efectos pueden ser positivos o negativos dependiendo del porcentaje en la reducción de nutrientes; el tiempo de la exposición a la RC y la edad de inicio de la RC (Anderson 2009). Por ejemplo, ratas macho en edad reproductiva sometidas a RC del 25 % al 50 % por un periodo de 4 a 5 semanas mostraron una reducción importante en el peso corporal, una deficiencia en la ejecución de la CSM y una disminución en la preferencia sexual por la hembra, asociado con una disminución en la concentración de T en las ratas con RC del 50 %; mientras que en las ratas con RC del 25 % no presentaron esas alteraciones (Govic, 2008), por lo que resulta necesario indagar con más detenimiento el efecto de la RC en la ejecución de la CSM en diversas etapas durante el envejecimiento. Por lo que el objetivo de este estudio fue determinar el efecto a largo plazo de la RC sobre parámetros reproductivos de la rata Wistar.

2.0 Marco teórico

Envejecimiento y Longevidad

El envejecimiento desde un punto de vista biológico afecta a todas las especies y se considera un “efecto secundario” natural e inevitable de la vida, muchas teorías y clasificaciones han sido propuestas para explicar el envejecimiento humano (Pardo, 2003), pero una sola no puede explicar todos los puntos relacionados a esta, a pesar de la observación de que la duración de la vida puede variar mucho entre especies e individuos (Taormina *et al.*, 2019). Se define como un proceso paulatino y gradual de deterioro de la capacidad funcional del organismo, con la pérdida progresiva de la función en los distintos tejidos que lo componen. Además, aumenta la vulnerabilidad y susceptibilidad a enfermedades crónico-degenerativas, alteraciones del sistema inmune o tumores derivados de la desregulación de la proliferación celular que tiene como punto final la muerte (OMS, 2015). Además, se ha descrito que la longevidad es un fenómeno multifactorial, complejo en el que las redes hormonales implicadas para la regulación de la homeostasis y la supervivencia ejercen un fuerte impacto sobre la duración o esperanza de vida que tienen los individuos (Garasto *et al.*, 2017; Taormina *et al.*, 2019). Así, el envejecimiento está siendo foco de estudio, pues se sabe que la pirámide poblacional se está invirtiendo, así, se estima que para el 2050 se encontrará totalmente invertida, siendo la mayor parte de la población de la tercera edad (Albright & Albright, 2003). La edad avanzada se ha convertido en el principal factor de riesgo de enfermedades crónicas y devastadoras de alta prevalencia, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las neurodegenerativas (Schmeer *et al.*, 2019). Clásicamente, el proceso de envejecimiento se ha caracterizado por varias características distintivas que comprenden daño genómico y reducción de telómeros, alteraciones epigenéticas, desregulación de la proteostasis y detección de nutrientes, disfunción mitocondrial, colapso de la reserva de células madre, deterioro de la comunicación entre células y senescencia celular (López-Otín *et al.*, 2013; Schemer *et al.*, 2019). El carácter progresivo del envejecimiento determina que sus causas estén presentes durante toda la vida, tanto en individuos jóvenes como en individuos de edad avanzada. Sin embargo, la velocidad con la que se envejece no sólo se encuentra asociada a factores celulares endógenos, como podría ser el acortamiento de los telómeros, el aumento en el estrés oxidante, disfunción mitocondrial, la senescencia celular, la inestabilidad genómica y la pérdida de la proteostasis (López-Otín *et al.*, 2013). También a factores exógenos tales como las radiaciones ultravioletas y las modificaciones en la ingesta dietética podrían modificar a los factores endógenos potenciando o reduciendo sus efectos sobre la calidad y esperanza de vida (López-Otín *et al.*, 2013).

Estudios actuales indican que el envejecimiento puede estar influenciado por factores nutricionales

(Mitchell *et al.*, 2001; Sharp & Richardson, 2011). Así, se sabe que el control dietético puede ser un factor importante sobre la calidad de vida y en algunos casos la longevidad, demostrándose que la RC es la manipulación fisiológica más eficaz para extender la expectativa media y máxima de vida (Weindruch & Walford, 1988; Sinclair, 2005; Colman *et al.*, 2009; Xiang & He, 2011; Speakman & Mitchell, 2011).

Senescencia celular

La senescencia es un estado permanente de detención del ciclo celular que promueve la remodelación tisular durante el desarrollo y después de una lesión, así mismo, interfiere en el potencial regenerativo y la función de los tejidos, la inflamación y la tumorigénesis en organismos envejecidos (Hernández-Segura *et al.*, 2018). La senescencia celular es inducida, durante el envejecimiento, a través del daño al ADN, el estrés oncogénico, el acortamiento de los telómeros y la función mitocondrial alterada (Van Deursen, 2014; Ziegler *et al.*, 2015). Por tanto, la senescencia es un mecanismo de defensa celular que evita que las células adquieran daño innecesario. El estado de senescencia se acompaña de una incapacidad para volver a entrar a el ciclo celular en respuesta a estímulos mitogénicos (Calcinotto *et al.*, 2019). Aunque la senescencia es uno de los procesos causantes del envejecimiento y es responsable de los trastornos relacionados con el mismo, las células senescentes también pueden desempeñar un papel positivo; en otros procesos como la embriogénesis y remodelación tisular, las células senescentes son necesarias para el correcto desarrollo del embrión y la reparación de los tejidos, en el cáncer la senescencia actúa como una potente barrera para prevenir la tumorigénesis (Hernández-Segura *et al.*, 2018; Calcinotto *et al.*, 2019). Las células senescentes se acumulan con la edad en diferentes especies como los ratones, primates y humanos (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Jeyepalan *et al.*, 2007). Por lo que el aumento en el número de células senescentes se correlaciona con la esperanza de vida, mientras que la eliminación selectiva de estas aumenta la salud y probablemente la vida media, implicando, así a las células senescentes como impulsoras del envejecimiento; lo que significa medir la carga de células senescentes para cuantificar la edad biológica y medir el impacto de las terapias anti envejecimiento (Stout *et al.*, 2016; Baker *et al.*, 2016; Niedernhofer *et al.*, 2017).

Acortamiento de telómeros

Una de las funciones importantes de los telómeros, en relación con el envejecimiento, es la regulación de la producción de Progerina (Cao *et al.*, 2011). La cual es una proteína resultante de una mutación del gen de Laminina A, esta proteína se asocia con cambios propios del envejecimiento, así como alteraciones celulares como fallos durante la mitosis, segregación anormal de cromosomas, también se ha reportado que esta proteína se acumula en múltiples tejidos de pacientes con Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford (Olive *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2011).

En los años sesenta Hayflick observó que, las células de los mamíferos tenían una longevidad limitada, lo que los llevó a proponer que, éste fenómeno representaba el envejecimiento a nivel celular (Aulinas *et al.*, 2013). Lo que reportó Hayflick es que las células en cultivo se pueden multiplicar un número determinado de veces (60-70 en humanos, 8-10 en ratones) y posteriormente se mantienen vivas, pero son incapaces de proliferar. Ahora se sabe que el “fenómeno de Hayflick” o “senescencia celular” ocurre como resultado del acortamiento gradual de los telómeros, que ocurre cada vez que una célula se divide. Por mucho tiempo se debatió si este fenómeno ocurre in vivo. Además, se ha demostrado que, el acortamiento de telómeros no es el único mecanismo por el cual una célula puede adquirir el fenotipo senescente, de hecho, muchos estímulos tales como: los radicales libres, la activación inoportuna de oncogenes, o el tratamiento con quimioterapia llevan a un fenotipo indistinguible del descrito por Hayflick (Aulinas *et al.*, 2013).

2.1 Teorías del envejecimiento

A través de los años se han propuesto diversas teorías que han sustentado que el envejecimiento no es una enfermedad, sino un proceso fisiológico que afecta a todos los seres vivos, clásicamente, el proceso de envejecimiento se ha caracterizado por varias características distintivas que comprenden daño genómico, reducción de telómeros, alteraciones epigenéticas, desregulación de la proteostasis, detección de nutrientes, disfunción mitocondrial, colapso de la reserva de células madre, deterioro de la comunicación entre células, estrés oxidante y senescencia celular (López-Otín *et al.*, 2013; Park & Yeo, 2013).

En la actualidad se ha intentado explicar el envejecimiento con un enfoque especial en los humanos, se han propuesto varias teorías que no deben considerarse como excluyentes entre sí, sino como complementarias. Hace poco más de una década Goldstein & Cassidy (2010) las dividieron en dos categorías: las teorías estocásticas, estas señalan que los cambios durante el envejecimiento ocurren de manera aleatoria y se acumulan a lo largo del tiempo. Entre estas se incluyen: a) la teoría del error catastrófico, en la que se propone que la acumulación de errores en la síntesis de proteínas, ocasiona daño en la función celular; b) la teoría del entrecruzamiento, que propone un entrecruzamiento entre las proteínas y otras macromoléculas celulares, como responsables del envejecimiento; c) la teoría del desgaste, la cual plantea que la acumulación de daño en las partes vitales lleva a la muerte de células, tejidos, órganos y finalmente del organismo; d) la teoría de los radicales libres, que es probablemente la más estudiada y la de mayor importancia, la cual tocaremos más adelante (Campos & Barzuna, 2004; Alves *et al.*, 2013).

La segunda categoría representa las teorías no estocásticas (aquellas que suponen que el envejecimiento está predeterminado), e incluye la genética, según la cual se considera que la edad está genéticamente determinada y que los individuos tienen un reloj interno que programa su longevidad. Otra teoría estocástica es la del marcapaso, que propone a los sistemas inmunológico y neuroendocrino como “marcadores” intrínsecos del inicio del envejecimiento. Según esta teoría la involución de ambos sistemas está genéticamente programada para ocurrir en momentos específicos de la vida (Rico-Rosillo *et al.*, 2018) Sin embargo, abordaremos con más detalle aquellas que mayor sustento presentan.

Teoría endócrina

A lo largo de la vida adulta, todas las funciones fisiológicas declinan gradualmente y se caracteriza por cambios en prácticamente todos los sistemas biológicos, dentro de ellos: el sistema endocrino (van *et al.*, 2018). Es bien sabido que las glándulas endocrinas producen y envían a la sangre mensajeros químicos (hormonas) que ejercen en el cuerpo múltiples funciones, a través de órganos blanco, estas hormonas regulan una gran cantidad de actividades necesarias para las funciones fisiológicas como el crecimiento e incluso la reproducción de los organismos, actividades metabólicas, síntesis de proteínas, función inmunitaria, desarrollo y conducta, de tal modo que son muy importantes, pues es sabido que en grandes cantidades son capaces de acelerar procesos como el envejecimiento (Alonso-Fernández & Brown-Bog, 2005; Jones & Boelaert 2015). Así, se sugiere una gran variedad de alteraciones relacionadas a la homeostasis hormonal, modificada por la edad de los individuos (Sunzana, 2009; Jones & Boelaert 2015).

Se ha considerado que el sistema endocrino está involucrado en el envejecimiento debido a que las concentraciones de hormonas como la del crecimiento (GH) y su correspondiente factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-1) que disminuyen con la edad, hace décadas se sugirió la idea de que tales cambios causan el envejecimiento (Hammerman, 1987; Ho *et al.*, 1987), por otro lado, se ha demostrado que en ratas la deficiencia en la producción de la hormona del crecimiento se ha relacionado con la prolongación de la vida y el envejecimiento inmunitario retardado (Flurkey *et al.*, 2001). Debido al hecho de que el cerebro regula el sistema endocrino, la teoría neuroendocrina del envejecimiento se ha convertido en la principal teoría del envejecimiento basada en hormonas (pinzón, 2014; Meites, 2012). Así, muchos productos antienvjecimiento apuntan a restaurar los niveles de hormonas específicas en individuos mayores (Elewa y Zouboulis, 2014; Sah *et al.*, 2013). Por otro lado, en el sexo masculino hay una disminución gradual de los niveles hormonales, reduciendo la actividad de la espermatogénesis cuando estos envejecen, aunque en el sexo masculino aún en edades avanzadas continúan siendo fértiles, esta se ve disminuida con el envejecimiento progresivo (Sunzana, 2009; Mariotti *et al.*, 2009). Así esta teoría sustenta que el envejecimiento se produce a través del daño progresivo del tiempo a las células y tejidos que conforman el sistema endocrino, se produce una pérdida de las secreciones hormonales, que en general dan un equilibrio homeostático a la fisiología del organismo y que además tiene efecto especial sobre las glándulas sexuales, que produciría el decaimiento fisiológico que acarrea el envejecimiento (Sunzana, 2009; Mariotti *et al.*, 2009; Gunes *et al.*, 2016), Figura 1.

Por otro lado, se ha demostrado que en roedores topo del género *Fukomys*, que la actividad sexual y/o la reproducción están asociadas con una duplicación de la esperanza de vida relacionadas con la

actividad de las suprarrenales. Los datos sugieren que los cambios en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal desempeñan un papel clave con respecto a la esperanza de vida prolongada de las ratas topo reproductivas frente a las no reproductivas (Sahm *et al.*, (2021).

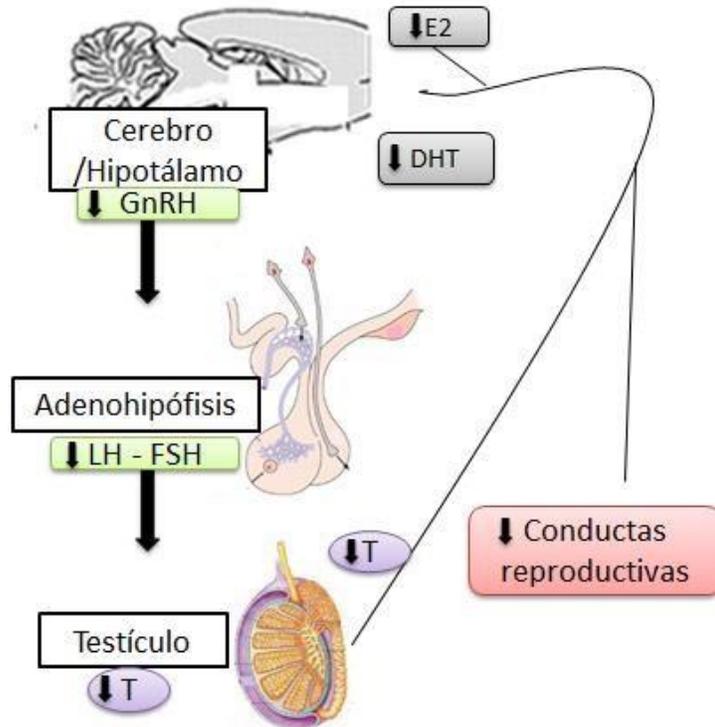


Figura 1. Representación de las alteraciones endocrinas en el organismo envejecido. Modificado de Wade & Jones., 2004.

Estrés oxidante y disfunción mitocondrial

Definitivamente, una de las teorías de mayor sustento es la propuesta por Harman en 1956 (Wood, 1998; Liochev, 2013). Esta teoría propone que el envejecimiento ocurre a través del daño acumulativo producido por los radicales, que se liberan como resultado de la respiración celular (Saez-Freire *et al.*, 2018). Es decir, a las reacciones químicas que se produce en las células cuando ciertas moléculas se oxidan para formar elementos reactivos, estos fragmentos moleculares se llaman radicales libres (RL), los cuales son inestables y pueden unirse o reaccionar al contacto con cualquier molécula reactiva que se encuentre cercana (Page *et al.*, 2010; Liochev, 2013; Höhn *et al.*, 2017; Sies *et al.*, 2017). La teoría argumenta que los RL están involucrados tanto en la formación de los pigmentos de la edad, como alteración en ciertas moléculas que dañan el ADN. Se ha reportado su actividad en la formación de las placas neuríticas características de la demencia y del Alzheimer (Jang & Remmen, 2009; Dorszewska *et al.*, 2021). La teoría de los RL puede vincularse con muchas otras teorías como: la teoría del ritmo de vida, la teoría de la mutación, la del desgaste natural, así como el de muerte celular o apoptosis. Sobre esta teoría, hay evidencias experimentales que confirman que los RL dañan la función celular y que están relacionados con las enfermedades asociadas con la edad como la aterosclerosis, artritis, distrofia muscular, cataratas, disfunción pulmonar, desórdenes neurológicos, declinación del sistema inmune e incluso el cáncer y neurodegeneración (Page *et al.*, 2010; Jang & Remmen, 2009; Dorszewska *et al.*, 2021).

Para detectar el estrés oxidante existen biomarcadores: como la cuantificación de la carbonilación de proteínas, los hidroperóxidos de lípidos, la lipofuscina y las lesiones oxidativas del ADN. Otras medidas indirectas del estrés oxidativo incluyen senescencia celular, apoptosis, niveles de antioxidantes o expresión de genes con respuesta al estrés (HIF1 α , NRF2, p53, NF- κ B) (Niedernhofer *et al.*, 2017).

Se ha observado en una gran variedad de modelos animales, que el tratamiento con antioxidantes es benéfico para la salud, o el desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento (Corton & Brown-Bog, 2005; Saez-Freire *et al.*, 2018; Dorszewska *et al.*, 2021). En *Drosophila*, la sobreexpresión de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) lleva a un aumento en la longevidad. Además, la administración de catalasa a la mitocondria también tiene efectos similares (Corton & Brown-Bog, 2005; Hernández-Mateos, 2010). De tal forma, que los RL parecen jugar un papel importante en la patología y fisiología del individuo envejecido. En la actualidad la teoría de los RL ha sido ampliamente aceptada por su evidencia ante el deterioro continuo y progresivo que conlleva el envejecimiento y sirve como fundamento de numerosas hipótesis para explicar la participación de ciertas sustancias en la mutagénesis, cancerogénesis y propiamente el

envejecimiento (Corton & Brown-Bog, 2005; Wood, 1998; Saez-Freire *et al.*, 2018; Dorszewska *et al.*, 2021). Así, la administración de antioxidantes en animales parece tener un efecto de retraso a enfermedades crónicas como la aparición del cáncer, las enfermedades cardiovasculares o enfermedades degenerativas del sistema nervioso central y la depresión del sistema inmunitario. Es por lo que, uno de los aspectos más interesantes del estudio de los RL es que son biomarcadores del envejecimiento y su medición puede prevenir las enfermedades asociadas a este (Jang & Remmen, 2009; Hernández-Mateos, 2010; Dorszewska *et al.*, 2021).

Adicionalmente, se ha propuesto que en conjunto con la actividad de los RL, se produce daño acumulativo en las mitocondrias, lo cual produce daño a nivel de las membranas celulares, a nivel de las proteínas, así como en el ADN, provocando fragmentación no sólo celular sino al ADN; así como un déficit bioenergético que promueve la activación de vías extrínsecas o intrínsecas que llevan a la apoptosis o muerte celular como producto final del envejecimiento (Corton & Brown-Bog, 2005; Jang & Remmen, 2009; Hernández-Mateos, 2010), Figura 2.

El ADN mitocondrial (ADNm) también llega a producir mutaciones y deleciones que contribuyen de manera significativa en los procesos del envejecimiento (Park & Larsson, 2011). Estas alteraciones del ADNm se pueden expandir de manera policlonal y generar alteraciones en diferentes procesos metabólicos como en la cadena respiratoria, ocasionando fuga de electrones y disminución de la producción de Adenosín Trifosfato (ATP); en la señalización de apoptosis en respuesta al estrés; así como la respuesta inflamatoria mediada por Especies Reactivas de Oxígeno (ERO); permeabilidad ante inflamosomas y alteración de la comunicación intracelular mitocondria-retículo endoplasmático (Kroemer *et al.*, 2007; Ameer *et al.*, 2011; López-Otín *et al.*, 2013).

Así mismo, la biogénesis mitocondrial disminuye durante el envejecimiento o con el deterioro celular, lo que ocasiona una disminución de la eficiencia bioenergética alterando así el metabolismo celular por distintas vías como la cadena respiratoria, ciclo del ácido tricarboxílico, cetogénesis y β -oxidación lipídica (Ameer *et al.*, 2011; López-Otín *et al.*, 2013; Popov, 2020).

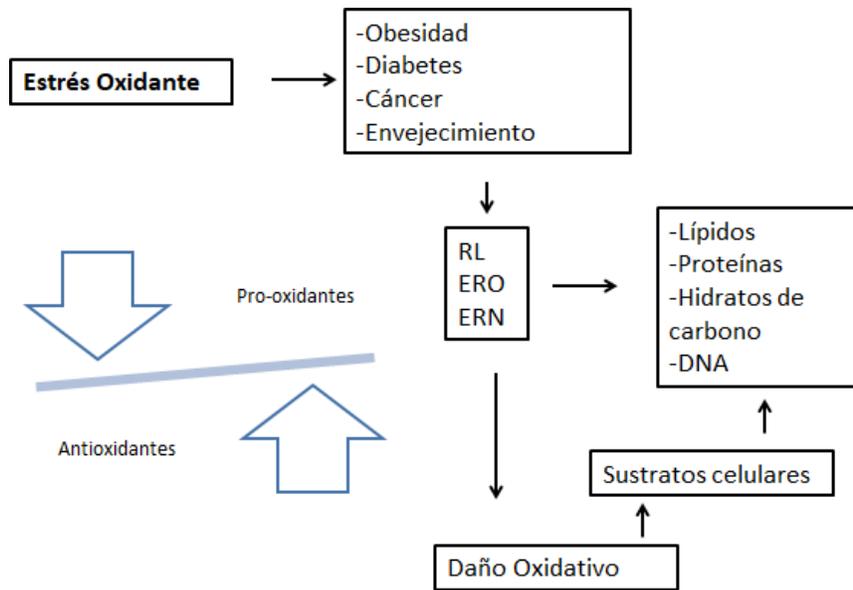


Figura 2. Representación de la producción del estrés oxidante y daños a nivel celular. RL= radicales libres; ERO= especies reactivas de oxígeno; ERN= especies reactivas de nitrógeno.

2.2 Vías de señalización involucradas en el envejecimiento

El envejecimiento está asociado con la función alterada de múltiples vías de señalización y una serie de factores que mantienen la salud celular (Tabibzadeh, 2021). Se han descrito varios mecanismos que modulan el proceso del envejecimiento, entre ellos: el efecto del estrés oxidativo, la restricción calórica, la capacidad de reparación y mantenimiento del material genético y la relación de los factores de crecimiento con la progresión hacia la vejez. Sin embargo, en condiciones normales, la proteína quinasa activada por AMP de 5' (AMPK) de longevidad se dedica a la homeostasis del metabolismo y la autofagia para eliminar las moléculas y las respuestas celulares dañadas (Lopez-Otín *et al.*, 2013; Tabibzadeh, 2021). Una gran cantidad de moléculas de la familia de las sirtuinas, que prolongan la vida útil, regulan el metabolismo y reparan el daño del ADN. Otro grupo de factores pro-longevidad incluye proteínas FOXO (forkhead box), blanco o diana de la rapamicina en células de mamíferos o Target of rapamycin (mTOR) una familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en el crecimiento, proliferación, diferenciación y longevidad celular como el IGF.

Blanco o diana de la rapamicina en células de mamíferos (mTOR)

El papel de la mTOR como regulador central de la esperanza de vida y el envejecimiento se ha estudiado ampliamente, se ha relacionado con muchos procesos asociados con el envejecimiento y la esperanza de vida (Peterson *et al.*, 2009; Saxon & Sabatini., 2017; Yu *et al.*, 2021). A pesar de que los mecanismos subyacentes aún no se han aclarado por completo, se ha demostrado que la relación entre la señalización de mTOR y el envejecimiento se conserva desde gusanos a mamíferos (Kapahi *et al.*, 2004; Kaeberlein *et al.*, 2005; Guertín *et al.*, 2006; Tabibzadeh, 2021). Sin embargo, diana de rapamicina complejo 1 (mTORC1) puede regularse a través de la vía del complejo de esclerosis tuberosa (TSC)-Rheb y la proteína de unión guanosin trifosfato (GTP) relacionada con Ras (Rag) que median la señalización de aminoácidos (Hardie, 2014; Yu *et al.*, 2021). Se ha demostrado que mTORC1 es sensible a factores ambientales como el oxígeno, los aminoácidos, los factores de crecimiento y la glucosa. Regula procesos celulares como la traducción de proteínas, la autofagia y el crecimiento celular (Peterson *et al.*, 2009; Arriola & Lamming, 2016; Saxon & Sabatini., 2017; Yu *et al.*, 2021). Mientras que la diana de rapamicina en células de mamíferos complejo 2 (mTORC2) es un efector de la señalización de insulina / factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) con señalización a fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), esencial para la activación de muchas quinasas. Por ejemplo, mTORC2 fosforila y activa proteína kinasa T y proteína kinasa B (Akt / PKB) y es un regulador clave de la supervivencia celular (Arriola & Lamming, 2016; Yu *et al.*, 2021). La interrupción de mTORC2 conduce a intolerancia a la glucosa, diabetes y disminuye la inmunosupresión (Chellappa *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2021). Así, la inhibición de mTORC2 tiene efectos negativos sobre la salud y la longevidad, mientras que la inhibición de mTORC1 prolonga la vida útil y retrasa el envejecimiento, pues la inhibición crónica de mTOR reduce las deficiencias relacionadas con la edad en el aprendizaje espacial y la memoria (Chellappa *et al.*, 2019).

Debido a que mTORC1 tiene un papel importante en la detección de energía, nutrientes e insulina intracelular y a nivel del organismo (Um *et al.*, 2004; Saxton & Sabatini., 2017), se ha sugerido que los efectos de la RC que mejoran la esperanza de vida en los organismos están mediados, al menos en parte, por la disminución de la señalización de mTORC1. Los regímenes similares a la RC no alargan adicionalmente la esperanza de vida en la levadura o los nemátodos cuando se inhibe mTOR, lo que indica mecanismos superpuestos (Kapahi *et al.*, 2004; Kaeberlein *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2007; Weichhart, 2017). Por el contrario, la inhibición de mTORC1 y la RC muestran efectos benéficos en la esperanza de vida de las moscas (Bjedov *et al.*, 2010). En los monos *rhesus*, la RC tiene beneficios para la salud en general y la supervivencia (Mattison *et al.*, 2017). Actualmente se desconoce si la RC prolonga la esperanza de vida en humanos. Sin embargo, en algunos animales,

incluidas distintas cepas de ratones, la RC no siempre se correlaciona con la extensión de la esperanza de vida, aunque mejora constantemente la salud (Mitchell *et al.*, 2016).

Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)

La insulina y el IGF-1 tienen similitud en la estructura, desempeñan un papel fundamental en la regulación del envejecimiento y la longevidad (Sasako & Ueki, 2016; Gubbi *et al.*, 2018). La insulina se une a su receptor en la superficie celular, mientras que el IGF-1 se une al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R) sin embargo, para la señalización intracelular las moléculas son casi idénticas, incluyendo la Akt y factores de transcripción forkhead box O (FOXO). Akt es una quinasa para regular el crecimiento y el metabolismo en tejidos, mientras que FOXO es uno de los factores de transcripción clave para regular la expresión de genes, incluyendo enzimas antioxidativas. Akt fosforila a FOXO y suprime su actividad mediante la promoción de la translocación al citoplasma (Sasako & Ueki, 2016; Niedernhofer *et al.*, 2017). La supresión de la insulina/IGF1 prolonga la longevidad en levaduras, gusanos y moscas a través de la activación de FOXO (Sasako & Ueki, 2016). Sin embargo, en ratones se observó un aumento en la longevidad con la disrupción de los genes relacionados a la señalización de la insulina/IGF-1 (Pardo *et al.*, 2016; Pardo *et al.*, 2018). Por otro lado, el aumento de la longevidad se acompaña con el de retraso del crecimiento o trastornos metabólicos, lo que significa que no tienen una vida “larga y saludable”. De tal forma que hacen falta estudios para dilucidar si la supresión de la señalización de la insulina/IGF-1 es beneficiosa para el envejecimiento (Sasako & Ueki, 2016).

Se sabe, que las concentraciones circulantes de IGF-1 y hormona de crecimiento (HG) disminuyen con la edad tanto en humanos como en roedores (Sonntag *et al.*, 1999; Gubbi *et al.*, 2018). Así, se ha demostrado que la RC es una estrategia que prolonga la esperanza de vida en numerosas especies, aumentando la secreción de HG, sin embargo, provoca una disminución del IGF-1 plasmático (Sonntag *et al.*, 1999). Así mismo, se ha reportado que el agotamiento genético del receptor de la HG o IGF-1 favorece la esperanza de vida (Laron, 2008; Guevara-Aguirre *et al.*, 2011), disminuye la carga de células senescentes (Stout *et al.*, 2016), a pesar de que el IGF-1 podría inducir la senescencia celular (Tran *et al.*, 2014). Por lo tanto, podría ser que la supresión de la activación HG-IGF-1 sea quien proteja de patologías relacionadas con la edad, como el cáncer, pero a su vez contribuye a la pérdida de masa muscular relacionada con la edad y memoria, así como un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (Carlzon *et al.*, 2014; Niedernhofer *et al.*, 2017).

Autofagia

La autofagia es un proceso intracelular conservado que encapsula y entrega cargas de macromoléculas como proteínas y orgánulos a los lisosomas para su posterior degradación (Galluzi *et al.*, 2017). Existen tres formas de autofagia basadas en distintos mecanismos de entrega de carga a los lisosomas: 1) Macro autofagia, mediante el cual las vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas engullen la carga autofágica y las dirigen a los lisosomas. 2) Autofagia mediada por chaperona (CMA), en dónde la carga se transloca al lumen lisosómico mediante el reconocimiento de su dominio similar a KFERG por las chaperonas citosólicas. 3) La micro autofagia, en dónde la carga ingresa a los lisosomas a través de invaginaciones de membrana (Wong *et al.*, 2020).

La autofagia desempeña un papel fundamental en la resistencia a la senescencia al eliminar los productos metabólicos, así como las células u orgánulos lesionados (Zhang *et al.*, 2019; Wong *et al.*, 2020). La AMPK protege a las células de la senescencia inducida por el estrés oxidativo al restaurar el flujo autofágico y el nivel de nicotamina adenina dinucleótido (NAD⁺) en células envejecidas mediante el método de rescate sintético NAD⁺ (Han *et al.*, 2016). La activación de la señalización AMPK mejoró la autofagia y el nivel de arginina metiltransferasa 1 asociada al coactivador asociado a arginina metiltransferasa (CARM1), que implica varios procesos celulares, incluida la autofagia en el corazón envejecido (Li *et al.*, 2017). La senescencia inducida por estrés oxidativo podría resultar en el envejecimiento anormal de las células de la piel, la cafeína protege contra la senescencia inducida por la radiación ultravioleta en los tejidos de la piel de ratón, activando la autofagia, que acelera la eliminación de EROS a través del receptor de adenosina A2a (A2AR) / sirtuina 3 (SIRT3) / AMPK (Li *et al.*, 2018). La autofagia regula el metabolismo de lípidos e inhibe el estrés del retículo endoplásmico (RE) (Kim *et al.*, 2019). Un estudio con enzima del complejo de saponinas triterpénicas, aumentó los niveles de EROS intracelulares y activó la vía ataxia-telangiectasia-quinasa mutada (ATM) / AMPK / ULK1 para regular la autofagia (Li *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que la RC es un método fiable de prolongación de la vida y/o moderador de enfermedades relacionadas con la edad a través de la modulación de la actividad autofágica en numerosas especies que van desde la levadura hasta los humanos (Bitto *et al.*, 2016; Morselli *et al.*, 2010). Por otro lado, la RC y el ejercicio ejercen efectos sobre la autofagia y la actividad de mTORC1 a través de vías comunes en modelos de roedores y humanos (Egan *et al.*, 2011; Medina *et al.*, 2015; Ng & Tang, 2013; Tam & Siu, 2014; Watson & Bar, 2014). Se ha observado que la RC a largo plazo es un fuerte promotor fisiológico de la autofagia, lo que resulta en una regulación positiva de varios moduladores y transcritos relacionados con la autofagia (Mercken *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016). La

actividad de autofagia mediada por la RC se logra en gran medida a través de la activación de los sensores de nutrientes 5' proteína quinasa activada (AMPK) y SIRT1 (Egan *et al.*, 2011; Meijer *et al.*, 2015; Ng & Tang, 2013).

Proteostasis

La proteostasis es la regulación de un proteoma, el término proteoma se refiere a la totalidad de proteínas expresadas en una célula. Su regulación funcional y equilibrada (Homeostasis), incluye vías biológicas competitivas e integradas que controlan la biogénesis, el plegamiento, el tráfico y la degradación de proteínas presentes dentro y fuera de la célula (Balch *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2017). La proteostasis celular es clave para asegurar un desarrollo exitoso, un envejecimiento saludable, resistencia al estrés ambiental y minimizar las perturbaciones homeostáticas de patógenos como los virus. Una reducción en la capacidad amortiguadora de la red de proteostasis durante el envejecimiento puede aumentar el riesgo de sufrir acumulación de proteínas mal plegadas (Martínez *et al.*, 2017; Komljenovic *et al.*, 2019; Ruan *et al.*, 2020).

La proteostasis incluyen acompañantes como foldasas que son un tipo de chaperonas que ayudan al plegamiento de proteínas, el sistema de ubiquitina-proteasoma, así como la vía de autofagia y respuesta al choque térmico, la maquinaria de degradación asociada al RE y los mecanismos que controlan el equilibrio redox (Balch *et al.*, 2008). Estos procesos están estrechamente coordinados para evitar la proteotoxicidad y garantizar que las proteínas desplegadas o mal plegadas no se acumulen en agregados citotóxicos (Labbadia & Morimoto, 2014). Sin embargo, en varias condiciones patológicas que afectan al sistema nervioso, se comparten características moleculares a pesar de presentar diferentes manifestaciones clínicas, destacando la presencia de agregados de proteínas anormales en el cerebro (Walker *et al.*, 2015). Todas estas patologías reunidas se clasifican como “trastornos de proteínas mal plegadas” que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington, los trastornos relacionados con priones, entre otros (Soto, 2003). Actualmente, los avances en diferentes modelos de organismos han descubierto la importancia de la respuesta de la proteína desplegada (UPR) para el control de la proteostasis durante el envejecimiento, en donde el sistema nervioso tiene un papel central en el seguimiento de las alteraciones en la salud del proteoma (Martínez *et al.*, 2017; Komljenovic *et al.*, 2019; Ruan *et al.*, 2020).

Por otro lado, se sabe que la actividad catalítica del proteosoma es 50% menor en el músculo esquelético de las ratas envejecidas en comparación con las ratas jóvenes (Ferrington *et al.*, 2005). Mientras que, en primates, la expresión de componentes de inmunoproteosomas en fibroblastos dérmicos se correlaciona con la esperanza de vida (Klaips *et al.*, 2018). La regulación al alza de los

componentes del inmunoproteosoma también ocurre en el hígado de ratones enanos de vida larga y ratones normales en los que la prolongación de la vida es inducida por el tratamiento crónico con 17- α -estradiol, ácido nordihidroguaiarético y rapamicina (Klaips *et al.*, 2018). Así, la expresión de los componentes del inmunoproteosoma se correlaciona con la extensión de la esperanza de vida, incluida la intervención farmacológica (Niedernhofer *et al.*, 2017).

La RC juega un papel importante en la regulación a la baja de las vías de insulina/IGF1 y la señalización de mTOR a partir de una reducción de la glucosa y los aminoácidos circulantes que promueven los mecanismos de reparación celular, incluidas la autofagia y la proteostasis, que confieren resistencia al estrés celular y atenúan la senescencia celular (Hoong & Chua, 2021).

Sirtuinas (SIRT)

Recientemente se han revelado varios genes que pueden extender la vida útil de los organismos sin afectar la vida media o máxima. Un ejemplo es la sobreexpresión de SIRT1 que mejora la tolerancia a la glucosa, la cicatrización de heridas y presenta un efecto positivo ante el cáncer (Herranz *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019). En ratones transgénicos con sobreexpresión de SIRT1 específicos del cerebro aumentaron la esperanza de vida en hasta un 16 % en las hembras y en un 9 % para machos (Satoh *et al.*, 2013). De igual forma, la sobreexpresión de SIRT2 y SIRT6 en *saccharomyces cerevisiae*, *caenorhabditis elegans*, *hesus nól melanogaster* e incluso en roedores, aumenta la esperanza de vida (Kaeberlein *et al.*, 1999; Tissenbaum, 2001; Rogina, 2004; Kanfi *et al.*, 2012).

La SIRT1 aumenta la sensibilidad de la insulina y reduce la resistencia a la insulina (Wang *et al.*, 2019). El resveratrol, SRT1720 y MHY2233, pueden mejorar la resistencia a la insulina, así como tener efectos benéficos sobre el hígado graso, por obesidad o diabetes, ya que son activadores de la SIRT1 (Kim *et al.*, 2018). Por otro lado, los alquilresorcinoles, miembros de la familia de los lípidos fenólicos, activaron la desacetilación dependiente de SIRT1 para reducir la histona acetilada en células monocíticas de humanos y prolongaron la esperanza de vida de *Drosophila melanogaster* (Kayashima *et al.*, 2017). El ácido ursólico puede estimular directamente a SIRT1 al unirse a su superficie exterior, cambiando su estructura de la forma inactiva a su forma activa, *in silico*, *in vitro* o *in vivo* (Bakhtiari *et al.*, 2018). El ácido deshidroabiético, un ácido de resina diterpénica natural, activa a SIRT1 para prevenir la acumulación de lipofuscina y secreción de colágeno en humano, además de extender la vida útil en *Caenorhabditis elegans* (Kim *et al.*, 2015). Además, el 17 β -estradiol activó RE α / SIRT1 para reducir el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la apoptosis neuronal en ratones macho inducidos por D-galactosa y aumentó el nivel de SIRT1 al mejorar la degradación de PPAR γ a través de la ubiquitina ligasa E3 NEDD4-1 para retrasar el envejecimiento

celular (Han *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2019). Aunque SIRT1 tiene efectos benéficos ante el envejecimiento, sus mecanismos subyacentes siguen sin estar claros, por lo que la expresión de estos u otras moléculas conocidas en los procesos de envejecimiento se puede utilizar para identificar las vías del envejecimiento.

Todas estas vías convergen para desencadenar un metabolismo en armonía que pueden engranarse y desencadenar señalizaciones que llevan al correcto funcionamiento celular; sin embargo, para tener esta homeostasis fisiológica debe haber energía disponible que provee moléculas suficientes para las respuestas celulares.

Metabolismo energético

Durante la reproducción hay un alto costo energético, así que la capacidad reproductiva de un individuo depende de su estado energético y nutricional, que refleja el equilibrio de la homeostasis entre la ingesta de energía y el gasto calórico que realiza para todos los procesos reproductivos. Considerando que es esencial mantener una cantidad suficiente de energía para la supervivencia del individuo y de poder preservar la función reproductiva, podemos inferir, que la energía y la reproducción están íntimamente relacionadas. Por otro lado, el organismo ha desarrollado complejos mecanismos fisiológicos que limitan la reproducción en función del estado metabólico en que se encuentren. Actualmente, se sabe que estos mecanismos están ampliamente integrados, actuando de manera sinérgica con el metabolismo energético, el sistema endócrino y el sistema nervioso central (Krasnow & Steiner, 2006; Sun *et al.*, 2021).

En tanto, el metabolismo energético se traduce como la serie de reacciones que almacenan y consumen combustible para cubrir las necesidades energéticas y fisiológicas del organismo. Tanto los lípidos como los carbohidratos están considerados dentro de los cuatro mayores grupos de biomoléculas activas, los cuales sirven como biocombustible y reservas de energía, principalmente la glucosa es uno de los carbohidratos esenciales para la vida celular, así los niveles de glucosa sanguíneos se deben encontrar altamente regulados por diferentes mecanismos para mantener la homeostasis energética (Van Cauter *et al.*, 1997; Krasnow & Steiner, 2006; Pak *et al.*, 2021).

La reproducción es un proceso metabólicamente alto, que necesita de una cantidad considerable de energía, para que un individuo tenga la capacidad reproductiva debe tener un balance homeostático entre la energía que gasta y la que consume (Krasnow & Steiner, 2006). Así, la función reproductiva se somete a mecanismos reguladores, que afectan a diferentes niveles del eje HPG (Tena-Sempere, 2015). Sin embargo, existen diversos factores que afectan de manera directa los procesos reproductivos, la alimentación es la más importante ya que de ella dependen los procesos primarios de los individuos, que serán requeridas en primera instancia para la supervivencia del organismo que

involucra los procesos de termorregulación, función celular, función sensorial, locomoción, entre otras y posteriormente la reproducción (Krasnow & Steiner, 2006; Moatt *et al.*, 2016).

De tal modo que, todas las funciones del individuo pueden continuar siempre y cuando la ingesta de energía sea suficiente para satisfacer todas las demandas. Sin embargo, si los alimentos se vuelven escasos o si se produce un gasto desregulado en el organismo, el individuo redistribuye la energía en los procesos básicos dejando al crecimiento y la reproducción como punto final (Krasnow & Steiner, 2006; Tena-Sempere, 2015).

2.3 Regulación del metabolismo

El metabolismo celular está conformado por varios procesos entrelazados impulsado por productos enzimáticos específicos de la expresión génica. A su vez, la expresión génica requiere la síntesis continua de ciertos metabolitos y ATP. Por lo tanto, los dos procesos están acoplados y deben coordinarse entre sí a medida que las células navegan por condiciones cambiantes de existencia. Además, esta coordinación debe estar dirigida a estrategias celulares particulares como el crecimiento, la división o la diferenciación según las condiciones (Carthew, 2021).

La ingesta de alimento (apetito) como el metabolismo energético están altamente regulados por una amplia red neural que interactúan con señales que pueden ser de tipo hormonales dentro de ellas la leptina, adiponectina y glucagón, entre otras y neurales a nivel hipotalámico que controlan el metabolismo. Dentro de los parámetros más importantes para la regulación energética como los carbohidratos y los ácidos grasos son: la glucosa e insulina (Graaf, 2004; Gromada *et al.*, 2007).

Por otro lado, sin restar importancia, el tejido adiposo juega un papel importante en la regulación energética, ya que además del resguardo energético, se sabe que es el encargado de la secreción de las adipocinas; dentro de estas se encuentran la leptina, adiponectina, el factor de necrosis tumoral (TNF α), interleucina 6 (IL-6) y la resistina (Matsuzawa, 2006; Tang & Lane, 2012). Estas estimulan la secreción de factores que tienen un papel importante a niveles local, periférico y central en una variedad de procesos fisiológicos incluyendo la asimilación de alimento, balance energético, acción de insulina, metabolismo de lípidos y procesos homeostáticos. (Matsuzawa, 2006; Tang & Lane, 2012).

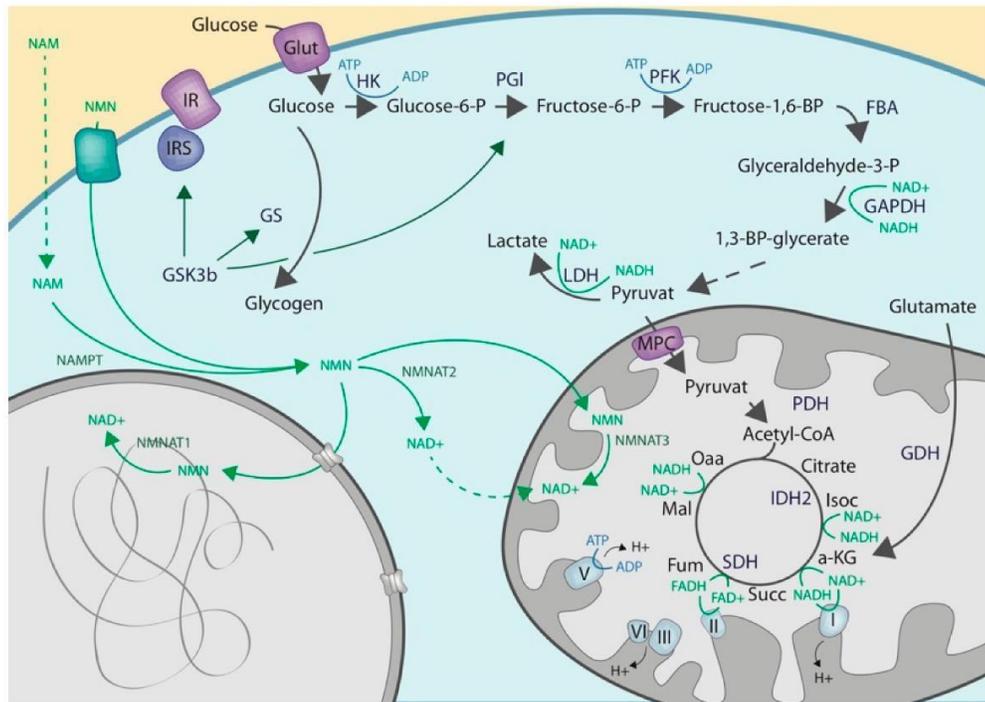


Figura 3. Representación del metabolismo energético. Tomado de (Hopp *et al.*, 2019).

Glucosa

Los carbohidratos son la principal fuente de energía para nuestro cuerpo, incluyen monosacáridos (glucosa) y disacáridos (sacarosa), denominados azúcares, sin embargo, es la glucosa la principal fuente de energía para el cuerpo (Sun & James, 2014). La regulación de la glucosa en sangre no es solo un fenómeno complejo, sino que los niveles reguladores de la glucosa también varían significativamente entre individuos. Por tanto, a los individuos comprometidos con concentraciones de glucosa en sangre moderadamente elevadas se le diagnostica una tolerancia a la glucosa alterada, la concentración de glucosa en sangre excesivos da lugar a un diagnóstico de diabetes tipo II (Messier & Gagnon, 2000; Hopp & Hottiger, 2019). Se estima que para el 2040, 642 millones de personas presenten algún padecimiento relacionado con el metabolismo de la glucosa (Pasquetti *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha observado que durante el envejecimiento el metabolismo de la glucosa se ve alterado negativamente, correlacionado con patologías como la obesidad, diabetes tipo II y glicación (Suji & Sivakami, 2004; Kim *et al.*, 2017).

Insulina

Está formada por dos cadenas polipeptídicas de 30 y 21 aminoácidos, unidas por puentes disulfuro, se sintetiza en los islotes de Langerhans, en las células β pancreáticas. La insulina tiene diversas funciones, dentro de las más conocidas se encuentran las relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, por otro lado, pero no de menor importancia se encuentra las que ejerce sobre el metabolismo de los lípidos (Nofzinger, 2002; Lewis & Brubaker, 2021). La insulina estimula los procesos anabólicos e inhibe los catabólicos, a corto plazo aumenta la oferta de sustratos en el interior celular para el almacenamiento de energía y a mediano plazo provoca un incremento de las actividades enzimáticas relacionadas con la formación de reservas energéticas. Así, en el metabolismo de los carbohidratos, la insulina aumenta el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática de las células en la mayoría de los tejidos, excepto en el cerebro (excluyendo el centro de la saciedad hipotalámico), los túbulos renales, la mucosa intestinal, las propias células β pancreáticas y los eritrocitos (Nedeltcheva, 2010). Los efectos de la insulina sobre el metabolismo de los lípidos se observan en periodos más largos que los que tienen lugar sobre los glúcidos. La insulina favorece el transporte de los ácidos grasos procedentes de los quilomicrones y las lipoproteínas liberadas del hígado, así como su captación por la célula adiposa para ser almacenados. Finalmente, la insulina tiene también una importante acción inhibitoria sobre la lipasa del tejido adiposo sensible a esta hormona, impidiendo que se liberen ácidos grasos a la sangre y sean transportados a otros tejidos. Cuando la insulina disminuye su capacidad para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo se habla de una resistencia a la insulina (RI). Actualmente se considera que la RI de manera crónica o mantenida es la base común de numerosas enfermedades metabólicas como la diabetes tipo II, obesidad, dislipidemias y enfermedad cardiovascular, mismas que conforman el famoso síndrome metabólico (Nofzinger, 2002; Spiegel, 2009; Nedeltcheva, 2010; Lewis & Brubaker, 2021).

Glucagón

Es una hormona peptídica de 29 aminoácidos, cuya función es estimular la producción de glucosa en el hígado, para el aumento de la glicemia, además de la disminución de la fructosa 2-6 bisfosfato y con ello el aumento de la gluconeogénesis, esta hormona tiene un peso molecular de 3.5 kDa, fue descubierta por Murlin y cols. en 1923. Posteriormente se supo que las células alfa de los islotes de Langerhans son las productoras de esta hormona y que su secreción es el resultado de un estado hipoglucémico (Gromada *et al.*, 2007; Rodgers, 2022).

El glucagón es una hormona contrarreguladora de la insulina que desempeña funciones en diversos órganos y tejidos con el fin de contribuir al mantenimiento del metabolismo energético. Dentro de sus funciones se encuentra el metabolismo de los carbohidratos, las vías involucradas son, la estimulación de la glucogenolisis y gluconeogénesis, por otro lado, también puede inhibir la glucólisis y glucogénesis. Así, el glucagón favorece la producción y la movilización hepática de la glucosa, también regula el metabolismo de ácidos grasos promoviendo la lipólisis en los adipocitos en rata (Zeigerer *et al.*, 2021; Rodgers, 2022). Cuando hay una elevación de glucagón/insulina aumentan las tasas de gluconeogénesis y de β -oxidación, así como la formación de cuerpos cetónicos (Asadi & Dhanvantari, 2021). Actualmente se sabe que el glucagón juega un papel importante en el metabolismo de lípidos en ratón en condiciones de ayuno (Longuet *et al.*, 2008), se ha demostrado que el glucagón inhibe la síntesis y secreción de triglicéridos en hepatocitos, y favorece la β -oxidación. Así mismo el glucagón es capaz de estimular la incorporación de aminoácidos para gluconeogénesis en el hígado (Cynober, 2002; Rodgers, 2022).

Leptina

Es una hormona de 167 aminoácidos, se conoce como la hormona de la saciedad ya que participa en la regulación de la ingesta de alimentos y el peso corporal, con una función anorexigénica (Graaf, 2004; Obradovic *et al.*, 2021). La Leptina es sintetizada principalmente en el tejido adiposo blanco y liberada al torrente sanguíneo de manera proporcional con la cantidad de masa grasa corporal del individuo, lo que significa que en adultos la concentración plasmática de la leptina tenga una relación directa con la masa de grasa corporal (Considine, 1996; Zhang & Chua, 2017). En condiciones normales, el perfil de los niveles plasmáticos de leptina durante las 24 horas revela que existe una elevación de esta hormona en alimentación parenteral nocturna, por otro lado, se sabe también que un incremento de esta conlleva a problemas metabólicos, generando lo que se conoce como resistencia a la Leptina y que resulta ser un paso anterior a la obesidad (Graaf, 2004; Obradovic *et al.*, 2021).

En condiciones normales la Leptina tiene un papel importantísimo en la reproducción pues diversos autores han estipulado que podría actuar como un mediador o switch de encendido y apagado del eje HHG, activando o inhibiendo el eje reproductivo, dependiendo de las reservas energéticas de los individuos (Graaf, 2004., Martin *et al.*, 2006., Krasnow & Steiner, 2006; Zhang & Chua, 2017).

Adiponectina

Es una hormona de tipo proteico de 30 KDa secretada por el tejido adiposo que sufre gran cantidad de modificaciones postraduccionales, esta hormona es capaz de disminuir la producción hepática de glucosa, además su expresión se correlaciona de manera directa con una disminución en los procesos patológicos relacionados con los estados de inflamación y a la resistencia a la insulina, como ocurre en la obesidad, diabetes mellitus y la enfermedad coronaria (Hotta *et al.*, 2000; Kishida *et al.*, 2003; Fang & Judd, 2018). Así, la adiponectina es considerada la única adipocina con efectos saludables sobre diferentes células y tejidos, mismos que se asocian con la actividad de la enzima AMPK. Así mismo se ha demostrado que los niveles de adiponectina aumentan cuando hay una mejora en la sensibilidad a la insulina, misma que puede deberse a los efectos de la disminución del peso corporal (Chandran *et al.*, 2003; Diez e Iglesias, 2003; Engin, 2017). En estudios realizados en ratones con deficiencias en adiponectina se reporta que desarrollan de forma prematura Intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, cuando es inducida por dieta muestran valores elevados de ácidos grasos libres (FFA) y aumento en la proliferación de células del músculo liso vascular en respuesta al daño tisular (Kubota *et al.*, 2002). Por otro lado, la sobreexpresión de adiponectina mejora la resistencia a la insulina, la tolerancia a la glucosa y los niveles séricos de FFA (Wanders *et al.*, 2010; Farup *et al.*, 2022).

2.4 Restricción calórica (RC)

Actualmente se conocen los efectos de la RC en el incremento de la longevidad misma que ha abierto un campo de investigación básica-aplicada que trata de adecuar la ingesta de alimento al mejor estado de salud. Esto ha sido el resultado de los estudios clásicos realizados por Mc Cay *et al.*, en 1935, en donde se observó que, ratas con un régimen específico de reducción calórica del 30 al 40% de ingesta de comida ad libitum favorecía la expectativa de vida y los animales presentaban un aspecto más saludable. La RC sigue siendo la intervención promotora de la longevidad no farmacológica más sólida conocida para retrasar la aparición de enfermedades relacionadas con la edad y aumentar la esperanza de vida en numerosos tipos de animales de experimentación, desde levaduras hasta mamíferos (Colman *et al.*, 2009; Xiang & He, 2011; Speakman & Mitchell, 2011; Ferreira-Marques *et al.*, 2021; Rhoads & Anderson, 2022).

La RC es definida por Neel como la disminución del 30 al 40% de la alimentación *ad libitum* sin malnutrición (Mercken *et al.*, 2012), es la estrategia no genética que, consistentemente, ha demostrado efectos metabólicos benéficos y ha conseguido extender el promedio y el periodo máximo de vida en la mayoría de los seres vivos en los que se ha realizado, desde microorganismos hasta primates no humanos (Madeo *et al.*, 2019). La RC ha demostrado ser una manipulación fisiológica efectiva para mejorar diversos parámetros metabólicos que ayudan a mantener la homeostasis celular, tales como la normoglucesmia, mejorar la sensibilidad a la insulina en tejidos como el hígado, el músculo y el tejido graso, aumenta la secreción de leptina y de la adiponectina; disminuyen los triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (Solon-Biet *et al.*, 2015). Además, mejora características celulares y moleculares como la autofagia, la proteostasis y también tiene efecto antidepresivo e inmunoprotector (Manchishi *et al.*, 2018; Ferreira-Marques *et al.*, 2021; Rhoads & Anderson, 2022).

Además de aumentar la vida en los roedores, la RC también se ha demostrado que puede retrasar una amplia gama de enfermedades como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas asociadas con el envejecimiento en primates no humanos e incluso en humanos (Roth *et al.*, 2001; Holloszy & Fontana, 2007; Cruzen & Colman, 2009; Brandhorst & Longo, 2016; Madeo *et al.*, 2019). Por lo tanto, la RC puede influir en los procesos de envejecimiento y contribuir en los aspectos generales de la salud, incluyendo los procesos reproductivos como la conducta sexual masculina y mejoramiento en la calidad espermática, pues al disminuir la ingesta de alimento, se provee de energía suficiente para el funcionamiento del organismo, desde la producción, utilización de la glucosa y secreción de insulina, hasta el funcionamiento de todos los órganos a través de la movilización de los nutrientes en torrente sanguíneo.

En *S. cerevisiae*, la inanición implementada al cambiar las células de un medio que contiene

nutrientes a agua provoca una duplicación de la vida cronológica (Wei *et al.*, 2008). Reducciones moderadas de glucosa en el medio de crecimiento del 2% al 0,5 o 0,05% extienden tanto la vida replicativa como la vida útil cronológica, aunque no está claro si las mismas vías genéticas regulan la duración de la vida del SPI y de la vida útil cronológica o si regulan la extensión de la vida en tanto en agua como en los medios reducidos en glucosa (Smith *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2008). Se cree que los efectos de una RC de glucosa al 0,5 % en el SPI implican una disminución de la señalización de las vías Ras-AC-PKA y Tor-Sch9, que aumenta la actividad transcripcional de Msn2 y Msn4 y la consiguiente expresión de Pnc1, una nicotinamida desaminasa que regula la actividad de la desacetilasa Sir2 dependiente de NAD (Medvedik *et al.*, 2006). Se cree que la traducción alterada y la autofagia también contribuyen a la longevidad replicativa.

La inhibición de las vías Ras-AC-PKA y Tor-Sch9 también está implicada en la extensión de la vida útil cronológica dependiente de RC, la falta de la proteína quinasa Rim15 o la triple eliminación de los factores de transcripción MSN2, MSN4 y GIS1 revierten los efectos de la inanición o la RC sobre la longevidad (Wei *et al.*, 2008).

En *C. elegans* se han utilizado múltiples métodos de RC, incluidas las mutaciones que reducen el bombeo faríngeo, la eliminación de la fuente de alimento bacteriano, la dilución de bacterias vivas o muertas en cultivos sólidos o líquidos, la dilución de peptona y cultivo axénico (Mair & Dillin, 2008). La reducción de la ingesta de alimentos puede no ser la única vía por la cual la RD prolonga la vida útil, ya que las sustancias difusibles de las bacterias pueden reducir la vida útil sin reducir la ingesta de alimentos (Smith *et al.*, 2008). Al igual que en los roedores, al menos un método de DR, que requiere factor de choque térmico 1, puede proteger contra la proteotoxicidad asociada con enfermedades relacionadas con la edad (Steinkraus *et al.*, 2008).

Para el caso de la *Drosophila* se ha implementado comúnmente mediante una reducción cuantitativa de los componentes de la dieta (levadura, azúcar y, a veces, una fuente de carbohidratos complejos) (Bass *et al.*, 2007). Las moscas no compensan la dilución de los alimentos aumentando la ingesta dietética, sino que aumentan el volumen de su tracto digestivo y, en consecuencia, acumulan niveles más altos de nutrientes (Wong *et al.*, 2008). Por otro lado, la reducción de la levadura provoca una extensión mucho mayor de la vida útil que la reducción del azúcar, mientras que los aminoácidos esenciales median el aumento de la vida útil (Grandison *et al.*, 2009).

2.5 Parámetros reproductivos en el envejecimiento

Con respecto a la edad y la CSM en estudios clásicos se ha reportado para una variedad de especies de mamíferos como las ratas, los monos e incluso los seres humanos, un declive en la expresión de la conducta sexual que puede ser atribuible a los cambios fisiológicos o incluso psicológicos para los humanos (Chambers *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1992; Nicolosi 2004; Jennings & de Lecea, 2020). Las concentraciones adecuadas de hormonas como la T, el E2, e incluso la PRL son necesarios para la expresión de la CSM en los mamíferos, la cual ocurre en respuesta a la presencia de una pareja sexualmente potencial (Jennings & de Lecea, 2020). El despliegue de la CSM requiere de una serie de factores externos e internos, como el ciclo circadiano o estacional, la temperatura y la función del eje HHG (Hull & Domínguez, 2015); además de un sustrato neural capaz de recibir y procesar los estímulos externos para iniciar la interacción sexual, que da lugar a las respuestas motoras que incluyen la monta, intromisión y la eyaculación (Moralí *et al.*, 2003; Bonilla-Jaime *et al.*, 2006), sin embargo, una alteración en estas hormonas inhibe la CSM (Corona *et al.*, 2016; Kahn & Brannigan 2017; Khodamoradi *et al.*, 2020). Gran parte de la pérdida de la función sexual masculina con el envejecimiento se ha correlacionado con una disminución en la concentración de T en suero. Este cambio se ha demostrado en los seres humanos, en los monos Rhesus (Downs & Urbanski, 2006) y en las ratas, incluyendo la cepa Sprague-Dawley (Harman *et al.*, 2001; Wu & Gore, 2009) y las ratas Wistar (Gruenewald *et al.*, 2000). Sin embargo, no todos estos estudios muestran una clara relación entre la T, el envejecimiento y el comportamiento sexual. De hecho, durante esta etapa de la vida, las concentraciones de T en ratas parecen no ser completamente diferentes de las de los animales jóvenes. Así, mientras algunos estudios han demostrado disminuciones relacionadas con la edad en la T otros no han demostrado tal pérdida de la conducta sexual relacionada con la T de manera contundente (Gruenewald *et al.*, 2000; Wu & Gore, 2009).

La edad no solo reduce la conducta sexual, sino que provoca cambios genéticos y epigenéticos en los espermatozoides, que deterioran las funciones reproductivas masculinas a través de sus efectos adversos sobre la calidad y el recuento de los espermatozoides, así como los órganos sexuales y el eje HHG. La producción de hormonas como la espermatogénesis y los testículos sufren alteraciones a medida que el hombre envejece, con ello hay una disminución en la fertilidad, misma que no implica un cese completo de la espermatogénesis (Gunes *et al.*, 2016 Almeida *et al.*, 2017). Durante el envejecimiento se reduce la calidad de los parámetros espermáticos de las muestras de eyaculados; así se sabe que, en humanos se reduce el volumen del eyaculado en hombres de 50 años o más, mientras que la concentración de espermatozoides no se reporta como afectada por la edad (Kidd *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2015; Gunes *et al.*, 2016).

En la rata, se ha reportado efectos similares al de los humanos, en cuanto a la disminución del volumen del eyaculado, además de una reducción en el porcentaje de espermatozoides móviles y un incremento en la proporción de espermatozoides con gota citoplásmica en la cauda del epidídimo (Syntin *et al.*, 2001). Por otro lado, Lucio *et al.* (2013) reportaron una técnica para determinar parámetros de calidad espermática a partir de muestras de eyaculado, obtenidos de hembras inmediatamente después de la eyaculación con la presencia de tapón vaginal, denominadas muestras espermáticas intrauterinas. En este estudio, se utilizaron ratas con edades desde 3, 12 y hasta 24 meses. Además, estos autores correlacionaron la expresión de la CSM con los parámetros de calidad espermática de estos mismos machos. Ellos reportan un incremento importante en la proporción de espermatozoides inmóviles y una disminución en la movilidad en las ratas de 12 y 24 meses de edad, mientras que en los parámetros de conducta sexual reportan un aumento considerable en la latencia de eyaculación en las ratas de 24 meses de edad.

Por otro lado, la inflamación, la oxidación y la apoptosis son eventos considerados predictores de la patología y el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad y que se observan con frecuencia en los testículos envejecidos. A pesar de que los mecanismos moleculares aún no se comprenden bien, la evidencia acumulada apunta hacia las moléculas proinflamatorias y las especies reactivas de oxígeno como los principales factores que contribuyen al envejecimiento testicular (Zhang *et al.*, 2020).

Se ha demostrado que la longevidad está asociada con un déficit funcional en las células testiculares (Barry *et al.*, 2000; Santiago *et al.*, 2019) y como consecuencia se ha reportado una disminución en los espermatozoides e incluso una disminución en el número de células germinales. La pérdida de las células germinales podría estar relacionado con una disminución en la capacidad de las células de Sertoli para soportar la supervivencia de las células germinales y la diferenciación, o bien, la reducción en la disponibilidad de T producida por las células de Leydig (Chen *et al.*, 2004). En un estudio realizado por Hussein *et al.* (2020) analizaron los cambios histológicos y ultraestructurales de los testículos de ratas albinas adultas durante el envejecimiento, así como los marcadores oxidativos y antioxidantes de los testículos envejecidos. Demostraron la presencia de cambios estructurales regresivos relacionados con la edad de los testículos acompañados de un aumento de la apoptosis y una disminución de la capacidad proliferativa, además de un desequilibrio entre el daño oxidativo y la defensa antioxidante indicando un aumento del estrés oxidativo de los testículos envejecidos.

Se ha demostrado también que la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), la gonadotropina coriónica humana y la T regulan la supervivencia de las células germinales en el testículo, por lo que la exposición a un exceso de hormonas o la privación de estas puede conducir a la apoptosis testicular (Shaha, 2008). Las células de Sertoli tienen receptores para FSH y T que son

los principales reguladores hormonales de la espermatogénesis. Mientras que la eliminación hormonal induce la apoptosis de las células germinales (Sofikitis *et al.*, 2008). Durante la maduración de los túbulos seminíferos, la T y la acción sinérgica de la FSH con el E₂ favorecen la supervivencia de las células germinales, mientras que el E₂ solo tiene un efecto inhibitorio proapoptótico (Shaha *et al.*, 2010). Se observado que las vías extrínseca e intrínseca están activas en las células germinales tras la disminución de los niveles de FSH y T; siendo estas quiénes mantiene la homeostasis espermatogénica, pues son capaces de inhibir las señales de muerte de las células germinales (Pareek *et al.*, 2007).

Por otro lado, el exceso de T puede causar muerte en el tejido testicular por aumento en la expresión de Fas/FasL (Zhou *et al.*, 2001). Sin embargo, una disminución de T estimula la actividad de la caspasa y produce la fragmentación del ADN en las células de Sertoli y células germinales (Tesarik *et al.*, 2002). Así mismo, la evidencia de que los estrógenos son esenciales para la espermatogénesis y que las concentraciones intratesticulares son altas (Hess, 2003). Mientras que las sustancias químicas similares a los estrógenos pueden actuar como agonistas o antagonistas e interferir con la espermatogénesis (Shaha *et al.*, 2010).

2.6 Anexina V como marcador apoptótico en testículo

Los marcadores apoptóticos pueden usarse potencialmente para evaluar la vitalidad de células como de tejidos epiteliales e incluso la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Existen diferentes marcadores apoptóticos dentro de estos: los marcadores de pérdida de potencial mitocondrial que son buenos en espermatozoides (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2009). Por otro lado, el aumento de la actividad de la caspasa, la tinción con anexina V la fragmentación del ADN son marcadores importantes para la supervivencia celular. En los espermatozoides con baja motilidad se expresa mayor actividad de caspasa y exposición de fosfatidilserina por lo que la tinción de anexina V toma relevancia (Weng *et al.*, 2002). Así, los marcadores de apoptosis también pueden servir como parámetros de diagnóstico para la fertilidad, la investigación adicional sobre otros marcadores apoptóticos podría reforzar este campo de estudio. Los procesos de muerte celular programada se caracterizan por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan en degradación celular sin respuesta inflamatoria. Al igual que en otros procesos fisiológicos y patológicos los reproductivos no son ajenos a estas vías de activación, lo que repercute en la capacidad reproductiva (Colin-Valenzuela *et al.*, 2010).

En los últimos años ha habido interés en la participación de estos procesos apoptóticos en la espermatogénesis y en el desarrollo espermático tardío, que se refleja en la capacidad reproductiva final. Está demostrado que las alteraciones en los procesos apoptóticos se asocian con infertilidad masculina y con una elevada frecuencia de apoptosis en células germinales de tejido testicular (Colin-

Valenzuela *et al.*, 2010; Stobezki *et al.*, 2020).

Para evaluar la expresión de la apoptosis en el espermatozoide existen diferentes técnicas que detectan el proceso apoptótico en etapas tempranas y las que lo detectan en etapas tardías. Uno de los métodos de detección temprana de apoptosis es la identificación de la fosfatidilserina (PS) en la capa externa de la membrana celular mediante la adición de anexina V, que es una proteína con afinidad por fosfolípidos dependientes de calcio, con alta afinidad por la PS. (Colin-Valenzuela *et al.*, 2010; Crowley *et al.*, 2016)

La superficie de las células sanas está compuesta por lípidos que se distribuyen asimétricamente en la hoja interna y externa de la membrana plasmática. Uno de estos lípidos, la PS, normalmente está restringido a la capa interna de la membrana plasmática, solo está expuesto al citoplasma celular (Uriondo *et al.*, 2011). Durante la apoptosis se pierde la asimetría lipídica y la PS queda expuesta en la hoja externa de la membrana plasmática. La anexina V, es una proteína fijadora de calcio de 36 kDa, se une a la PS; por lo tanto, la anexina V marcada con fluorescencia puede usarse para detectar PS que está expuesta en el exterior de las células apoptóticas (Crowley *et al.*, 2016). La anexina V también puede teñir las células necróticas porque estas células tienen membranas rotas que permiten que la anexina V acceda a toda la membrana plasmática. Sin embargo, las células apoptóticas se pueden distinguir de las células necróticas mediante tinción conjunta con yoduro de propidio (IP) porque el IP entra en las células necróticas, pero se excluye de las células apoptóticas. Este protocolo describe la unión de la anexina V y la captación de IP seguida de citometría de flujo para detectar y cuantificar las células apoptóticas y necróticas (Crowley *et al.*, 2016; Moghadam *et al.*, 2020).

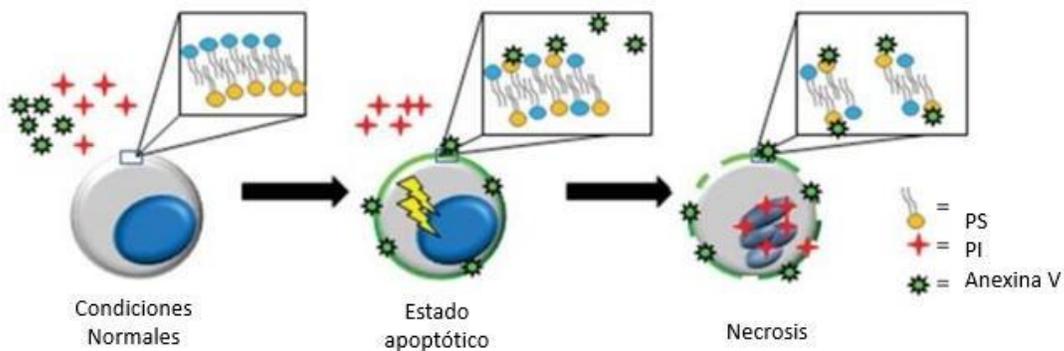


Figura 4. Anexina V como marcador apoptótico y necrótico. Modificado de Crowley *et al.*, 2016.

2.7 Restricción calórica y parámetros reproductivos

La nutrición juega un papel importante durante la longevidad, se ha observado que la RC retrasa la aparición de los cambios fisiopatológicos asociados con la edad (Khaled *et al.*, 2008; Niederhofer *et al.*, 2017). La RC induce beneficios sobre la longevidad de ratas como la Brown Norman (Luo *et al.*, 2001; Khaled *et al.*, 2008) mostrando efectos sobre el peso corporal y en el peso testicular, asociados con el aumento en la expresión de los genes de la enzima SOD y CAT, así como una disminución en la lipoperoxidación. Además, en este mismo estudio, se demostró que la expresión de los genes para los receptores a estrógenos y la aromatasa testicular, se reducen durante el envejecimiento de la rata, y en animales que fueron expuestos durante un mes a 60% de RC, la expresión de los genes para SOD y CAT se incrementó en comparación con los animales sin RC. Estos resultados indican que, durante el envejecimiento, una dieta baja en calorías es benéfica para la expresión de enzimas antioxidantes, además de mejorar la movilidad espermática en el epidídimo (Khaled *et al.*, 2008). Sin embargo, no se evalúan los efectos de la RC sobre la conducta sexual.

El envejecimiento tiene un efecto deletéreo sobre la morfología del sistema reproductor masculino que, a su vez, puede conducir a cambios en la espermatogénesis y, en consecuencia, a una disminución tanto en la calidad como en la cantidad de espermatozoides (Hussein *et al.*, 2020). Así en ratas Brown Norman, se ha observado aumento en la expresión de genes relacionados con procesos de envejecimiento en la cauda y cuerpo del epidídimo, sitio en donde los espermatozoides obtienen su maduración y son almacenados (Kathryn & Bernard, 2003). Sin embargo, en ratas macho con edad de 3 meses de edad en etapa reproductiva y sometidas a RC al 25% y 50% por un periodo de 4 a 5 semanas, en las cuales evaluaron conducta sexual y patrones de preferencia hacia una hembra o un macho; así como la concentración de T y de leptina antes y después de la RC. Observaron, que después de la RC al 50%, se presenta una reducción importante en el peso corporal, así como una deficiencia en la ejecución de la CSM y una disminución en la preferencia sexual por la hembra, asociado con una disminución en la concentración de T y de leptina. Mientras que en las ratas con RC al 25% no se observaron dicho efecto, sin embargo, se presentó una disminución en la concentración de T (Govic *et al.*, 2008). Sin embargo, es sabido que la T es la responsable de iniciar y mantener la CSM en la rata (Hull & Domínguez, 2015), por lo que resulta necesario indagar con más detenimiento el efecto de la RC en la ejecución de la CSM.

3.0 Justificación

El envejecimiento es un proceso que ocurre de manera natural asociado a enfermedades crónico-degenerativas y cardiovasculares como obesidad, diabetes, disfunción renal, cáncer, entre otras. Se sabe que durante el envejecimiento las funciones endócrinas cambian, así como la homeostasis metabólica. La posibilidad de mejorar la función endócrina, principalmente la función testicular, así como favorecer la síntesis de testosterona y la espermatogénesis, son importantes para mejorar la calidad de vida, tanto como la función reproductiva. Por lo que, investigar los efectos de la RC es de suma importancia en las funciones antes mencionadas, pues podría aumentar la ventana reproductiva en las personas que por algún motivo decidieron aplazar su reproducción y con esta estrategia de RC podrían mantener la conducta sexual activa, mediante la acción de las hormonas gonadales, mismas que regulan las conductas reproductivas.

Por otro lado, indagar los efectos de la RC para saber si mantiene en condiciones óptimas los parámetros reproductivos y hormonales, así como, la salud metabólica durante el envejecimiento adquiere gran importancia pues puede proveer beneficios a la salud humana, así como en animales en cautiverio, con importancia económica y en peligro de extinción, alargando el periodo reproductivo sin alterar la homeostasis metabólica, mejorando la calidad de vida del senescente.

4.0 Pregunta de investigación

¿Cuál será el efecto de la restricción calórica sobre la conducta sexual masculina, la calidad espermática y las hormonas metabólicas en la rata Wistar longeva?

5.0 Hipótesis

La restricción calórica mejorará la conducta sexual masculina, la calidad espermática y las hormonas metabólicas en la rata Wistar longeva.

6.0 Objetivos

6.1 General

Analizar el efecto de la restricción calórica sobre la CSM, la calidad espermática y las hormonas relacionadas al metabolismo durante el envejecimiento de la rata Wistar.

6.2 Específicos

Analizar el efecto de la RC en la rata Wistar a los 18 y 24 meses de edad sobre:

1. La conducta sexual masculina
2. La concentración, movilidad, vitalidad y fragmentación del DNA de espermatozoides
3. Cuantificación de la expresión de Anexina V como marcador apoptótico en testículo
4. La concentración de hormonas sexuales como testosterona, estradiol, prolactina
5. La concentración de hormonas metabólicas como insulina, leptina, glucagón y adiponectina

7.0 Materiales y métodos

7.1 Sujetos experimentales

Los sujetos experimentales que fueron utilizados para este proyecto contaban con 12 meses de edad y eran sexualmente expertos, antes de ser asignados a los diferentes grupos de RC se les realizó una prueba de CSM previa para asegurar su experiencia sexual.

Todos los sujetos experimentales se manejaron según los lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa y según la NOM-062-ZOO-1999. Los sujetos fueron mantenidas en cajas individuales bajo un ciclo de luz-obscuridad invertido 12hrs:12hrs (encendido de luz a las 8:00 pm y apagado a las 8:00 am) a una temperatura constante de 24°C.

Antes del inicio de la RC, se les realizó durante 15 días un registro del consumo de alimento y peso corporal para conocer el consumo diario de alimento, así como la ganancia de peso corporal. Esto con el objeto de saber cuánto es el consumo de alimento *ad libitum* diario de cada uno de los sujetos, para poder realizar la RC de acuerdo con el consumo *ad libitum* diario para cada animal. Posteriormente los sujetos, fueron asignados azarosamente a los siguientes tres grupos experimentales:

Grupo 1 (Control). - Ratas de 12 meses de edad con comida *ad libitum* (n=6) Grupo 2.- Ratas de 12 meses de edad con RC al 15% (RC15, n=6) y Grupo 3.- Ratas de 12 meses de edad con RC al 35% (RC35, n=6).

El porcentaje de RC seleccionado en este estudio fue elegido según lo reportado por Govic *et al.*, 2008. Cuidando siempre la salud y el estado nutricional de los animales.

7.2 Evaluación de la conducta sexual masculina

Se realizaron de manera individual dos pruebas de ejecución sexual a cada una de las ratas. Este registro se realizó en las primeras 4 horas del apagado de la luz, durante la fase oscura del ciclo y bajo luz roja tenue. El macho se colocó en un redondel de Plexiglas de 50 cm x 42 cm de base y 42 cm de altura con piso de aserrín durante 5 minutos para que se adapte al mismo. Pasado este tiempo, se introdujo una hembra receptiva tratada previamente con benzoato de estradiol (5µg/50µl, 48 horas previas a la prueba) y progesterona (500µg/50µl 4 horas previas a la prueba), con la que se le permitió interactuar libremente, se continuo la cópula hasta cumplirse el criterio de 30 minutos por registro de conducta sexual masculina. Durante los 30 min se registraron los siguientes parámetros: 1). Latencia de monta (LM). 2). Latencia de intromisión (LI). 3). Número de Montas (NM). 4). Número de

intromisiones (NI). 5). Latencia de eyaculación (LE). 6). Intervalo Post-eyaculatorio (o refractario) (IPE). 7). Hit rate o eficiencia copulatoria; se calcula dividiendo el número total de intromisiones entre la sumatoria del número de montas e intromisiones ($HR = I/M+I$).

7.3 Obtención de espermatozoides epididimarios

Una vez transcurridos los seis o doce meses de la RC se practicó eutanasia a cada uno de los sujetos experimentales con ketamina (50 mg / kg) y xilazina (10 mg / kg) mediante inyección intraperitoneal a las ratas. Se realizó una punción cardíaca para la obtención de sangre para su análisis. Posteriormente, se realizaron las disecciones para la obtención de las muestras epididimarias para la evaluación de los parámetros espermáticos. Además, se extrajeron los testículos con epidídimos, los cuales fueron colocados en cajas Petri en cuyo interior contenía solución PBS y fueron mantenidos a 37°C.

Los espermatozoides fueron obtenidos de la cola del epidídimo por perfusión con 1mL PBS. Cada muestra obtenida se homogenizó con pipeteos constantes y una alícuota (10 μ l) se colocó en un portaobjetos y posteriormente se cubrió con un cubreobjetos de 22x22 mm. Cada muestra fue analizada a 40x utilizando un microscopio de contraste de fases Labophot (Nikon, Japon).

7.4 Evaluación de los parámetros microscópicos de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo

El análisis microscópico comprende la valoración de la vitalidad, concentración y morfología espermática. Se homogenizó el semen con pipeteos constantes y se tomaron 10 μ l, este se colocó en un portaobjetos previamente atemperado, las células se observaron en objetivo a 40x con microscopio de contraste de fases (Nikon, Japon).

7.5 Análisis de vitalidad

La vitalidad celular fue evaluada utilizando el Live/Dead Sperm Viability Kit (Thermo, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una alícuota de los espermatozoides obtenidos (100 μ L) se le agregaron 10 μ l de yoduro de propidio y 10 μ l de SYBR 14 y la mezcla se homogenizó y se dejó incubando a 37°C por 10 minutos. Después, una alícuota de 10 μ L se colocó en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos de 22x22 mm para ser analizadas en un microscopio equipado con sistema de epifluorescencia Eclipse E-600 (Nikon, Japón). Los espermatozoides vivos una fluorescencia en color verde y los espermatozoides muertos en color rojo. Para la interpretación de los resultados se obtuvo el porcentaje de espermatozoides vivos, del total de 200 células contadas.

7.6 Análisis de la concentración espermática

Para el conteo espermático se usó un portaobjetos. Previamente se realizó un conteo de 3 campos al azar, se tomó la media de estos valores para hacer la dilución, se utilizó una solución que contenía formaldehído al 10% para inmovilizar a los espermatozoides dentro de un tubo cónico. Dependiendo del conteo de estos tres campos se realizó la dilución con base a las células que se observaron. Las diluciones fueron 1/5, 1/10, 1/20 o 1/50; una vez hecha la dilución se cargó la Cámara de Neubauer con 10 μ l y se procedió a contar los cuadros. Para conocer la concentración de células por ml se sumaron las cantidades obtenidas de las 2 cámaras y se realizaron los cálculos dependiendo de la dilución realizada y del número de cuadros contados en la cámara de Neubauer.

7.7 Fragmentación de DNA por electroforesis de célula única (prueba cometa)

Sobre un portaobjetos se formó una base de agarosa al 4.0%, posteriormente se agregó una segunda capa de agarosa formada por una mezcla de espermatozoides y agarosa de bajo punto de fusión al 3%. Después, las preparaciones se incubaron en buffer de lisis alcalino (NaCl 2.5M, EDTA 0.1M, Tris 10mM, TritonX-100 1%, DMSO 1%, Ditiotreitól 10mM a un pH de 10) por un lapso de 105 minutos a 4°C y protegidos de la luz. Después, los portaobjetos fueron lavados con un amortiguador Tris [0.4 M] y colocados en una cámara de electroforesis horizontal donde se realizó un corrimiento electroforético a 50V/300 mAmp por 20 minutos. Inmediatamente, cada una de las laminillas fue lavada con medio de neutralización (Tris 0.4 M, pH 7.5). Posteriormente, cada laminilla se tiñó con una solución de anaranjado de acridina (0.01mg/ml) y lavada con agua destilada. En seguida, las laminillas fueron analizadas a través de microscopio de epifluorescencia Eclipse E-600 (Nikon, Japón) para determinar el número de células con fragmentación en el ADN nuclear, caracterizadas por el corrimiento y dispersión del ADN espermático adoptando una forma de cometa. Para la interpretación de los resultados se obtuvo el porcentaje de espermatozoides con dispersión del ADN, del total de 200 células contadas.

7.8 Cuantificación de apoptosis por Anexina V

Una vez anestesiados los animales, fueron perfundidos intracardiamente con paraformaldehído al 4%, posteriormente los testículos fueron deshidratados en un equipo Histoquinet STP 120 de Thermo Scientific durante 24 horas y procesados en parafina. Las secciones de tejido fueron obtenidas a través un microtomo Leica RM2155 con cortes de 5 µm, la detección de Annexin V se realizó con el kit Alexa fluor 488 Annexin V/Dead cell Apoptosis (Thermo Fisher Scientific, USA). El análisis histológico se realizó utilizando un microscopio de epifluorescencia con Axio Observer 2 (Karl Zeiss, Germany) sistema de iluminación estructurado acoplado Apotome V2. Se analizaron 20 cortes transversales de los tubos seminíferos por animal. Las imágenes fueron analizadas utilizando, el programa de análisis de imágenes ZEN black (Karl Zeiss, Germany).

7.9 Determinación de glucosa y hormonas plasmáticas

Todos los animales fueron anestesiados con ketamina (50 mg / kg) y xilacina (10 mg / kg) mediante inyección intraperitoneal, para la obtención de las muestras de sangre por punción cardiaca. Las muestras de sangre se colocaron en un tubo con gel separador de suero (REF 36815, BD Vacutainer SST, Méx). La obtención de los sueros fue a través de centrifugación (3000 rpm, 15 minutos). La concentración de glucosa fue obtenida por el método de oxidación por el analizador Vitalab Eclipse (Merck, Dieren, The Netherlands). Para la determinación de las hormonas sexuales testosterona (EIA-1559), estradiol (EIA-2693) y prolactina (EIA-1291) se empleó un kit comercial de ELISA de DRG International Inc (NJ, USA). Para el resto de las hormonas, como son insulina (80-INSRT-E01); glucagón (48-GLUHU-E01); leptina (22-LEPMS-E01) y adiponectina (22-ADPRT-E01), se empleó un kit comercial de ELISA de Alpcó (Bensheim, Germany). Cada muestra fue analizada por duplicado, leídos a 450 nm mediante un espectrofotómetro para multiplacas Multiskan™ GO Thermo Scientific (MA, USA).

7.10 Diseño experimental

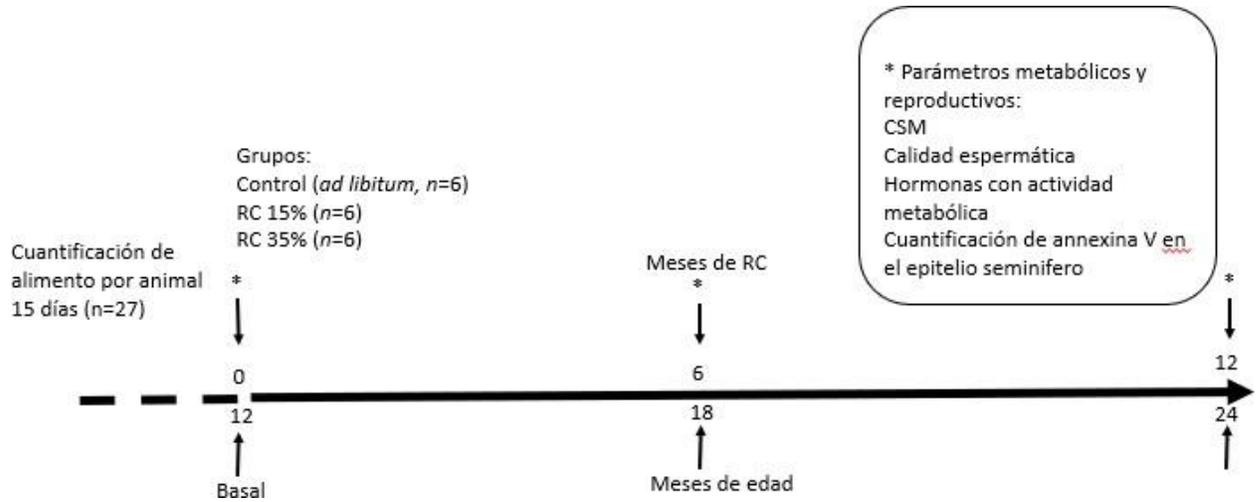


Figura 5. Línea de tiempo del Diseño experimental. Se registró la cuantificación *ad libitum* del alimento por animal antes de la RC durante 15 días (líneas punteadas). El experimento se inició a los 12 meses de edad de los animales (Basal 0) con los grupos control (*ad libitum*), RC 15 y RC 35 % (n=6) en cada grupo. Se realizaron las pruebas reproductivas y bioquímicas (*), en el tiempo basal, y a los 6 y 12 meses después de RC.

8.0 Análisis estadístico

Todos los parámetros son expresados como la media \pm DS y fueron analizados por una prueba ANOVA de dos vías para cada parámetro, seguida por la prueba post hoc de Tukey. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico GraphPad Prism 8.0.1 (La Jolla, CA).

9.0 Resultados

9.1 Registro del consumo de alimento

De los registros del consumo de alimento *ad libitum* previo a la RC se obtuvo un valor de 37 ± 6 g.

Una vez analizado el consumo de alimento *ad libitum* diario de cada uno de los animales se realizó la RC al 15 y al 35% para cada uno de los grupos.

9.2 Alimento del Bioterio

El bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa proporcionó un Análisis Bromatológico del alimento que maneja, en dónde especifica el contenido de los nutrientes en porcentaje, el cual no estaba completo, pues solo contiene proteína, grasa y fibra, mientras que el alimento contiene más (tabla 1).

Tabla 1. Análisis bromatológico proporcionado por la Universidad Autónoma Metropolitana.

Nutriente	Porcentaje	RC al 15 %	RC al 35 %
Proteína	28 %	4.2	9.8
Grasa	4.5 %	0.67	1.57
Fibra	6 %	0.9	2.1

De tal modo que se realizó un análisis bromatológico en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, el cual arrojó la información derivada de nutrientes, porcentaje de nutriente que contiene el alimento que consumían los animales sometidos a la RC (tabla 2).

Tabla 2. Análisis bromatológico de la FMVZ- UNAM.

Análisis Químico Inmediato	
Materia seca	92.04%
Humedad	7.96%
Proteína Cruda	25.37%
Extracto Etéreo	7.44%
Cenizas	9.10%
Fibra Cruda	4.18%
Extracto libre de Nitrógeno	45.94%

Para verificar el contenido energético del alimento también se realizó un análisis de “Determinación de energía bruta” para corroborar la ingesta energética contenida en el alimento que consumían los animales durante los meses de tratamiento, (tabla 3). Así se pudo comprobar que los animales con comida *ad libitum* ingerían entre 117 y 164 kcal/ día. Del mismo modo, los animales sometidos a RC al 15 % ingerían de 95 hasta 104 kcal/ día y el grupo RC al 35 % consumía de 77 hasta 87 kcal/ día (tabla 4). Lo que indica una disminución en la ingesta de alimento de los grupos RC vs el grupo Control con alimentación *ad libitum*.

Tabla 3. Calorías contenidas en un gramo de alimento.

Energía bruta	
Kcal	Gramos de alimento
4.32	1

Tabla 4. Muestra las calorías consumidas en cada uno de los grupos experimentales.

Grupo	Alimento en gramos	Kcal
Control	22 – 35	95 – 151
RC15	22 – 24	95 – 104
RC35	18 - 20	77.7– 87

9.3 Pérdida / ganancia de peso y supervivencia

El monitoreo del peso corporal de los animales involucrados en el experimento se llevó a cabo desde el tiempo 0 o basal, por lo tanto, los datos se muestran desde el tiempo 0, así como a los 6 y 12 meses de exposición al tratamiento de la RC, después de 6 y 12 meses se redujo significativamente el peso corporal en los grupos RC 15 % y RC 35 %, en comparación con el grupo control y su valor basal ($p < 0.01$, Tabla 1). Así, el peso corporal permaneció a la baja de manera significativa para los grupos sometidos a RC al compararse con el grupo control con alimentación *ad libitum* hasta los 24 meses de edad, cuando los animales han llegado al límite de longevidad. Los animales correspondientes al grupo control con alimentación *ad libitum* y sin RC tuvieron un aumento progresivo del peso corporal desde los primeros 6 meses de tratamiento, volviéndose significativo hasta los 12 meses de experimentación y 24 meses de edad. ($p < 0.01$, Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de la RC sobre el peso corporal en el envejecimiento de la rata.

	Basal	<u>6 meses después de RC</u>			<u>12 meses después de RC</u>		
		Control	RC 15%	RC 35%	Control	RC 15%	RC 35%
Peso corporal	541.6 ± 6.7	640.2 ± 10.6 [#]	447.0 ± 19.6*	437.7 ± 7.2*	630.3 ± 15.3 [#]	443.2 ± 15.3*	446.7 ± 17.0*

Los valores obtenidos muestran la media \pm SE del peso corporal en ratas con RC al 15 y 35 % por 6 y 12 meses. *Indica diferencias significativas entre los grupos de RC al 15 y 35 % vs el grupo control, $p < 0.01$; #Indica diferencias significativas entre el grupo control después de 6 y 12 meses de RC vs el valor basal, $p < 0.05$.

Uno de los efectos del envejecimiento es la muerte del individuo. En este estudio pudimos observar que el 100 % de los animales sobrevivió a los 6 meses después de la RC 15 y 35 %. A los 9 meses de RC (21 meses de edad), el 50 % de animales del grupo control sobrevivió en comparación con los grupos RC 15 y 35 %, cuya supervivencia fue 100 % y 80 %, respectivamente. Interesantemente, a los 12 meses de RC (24 meses de edad) se mantiene la supervivencia para el grupo control al 50 %, mientras que el grupo RC 15 % disminuyó la supervivencia (Figura 6).

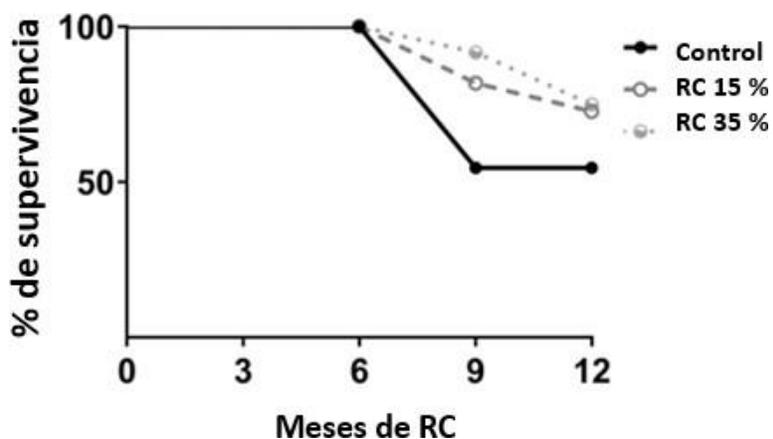


Figura 6. Efecto de la RC sobre la supervivencia en la rata Wistar envejecida. Los valores muestran el porcentaje de supervivencia de las ratas con RC al 15 y 35 % por 6 y 12 meses de RC.

Por otro lado, se observó un deterioro en las características físicas de los animales, propios del envejecimiento, sin embargo, en los animales del grupo control se observó que hubo además del aumento del peso corporal, pequeñas laceraciones en piel y pérdida de pelo (Alopecia), figura 7 A. No así, para los animales de los grupos sometidos a RC, en estos animales, se observó que el pelaje es abundante, la piel está sin laceraciones, y en algunos casos se presentaban indicios de cambios en la coloración del pelaje. Además, presentan una mejor apariencia física respecto del grupo control, figura 7 B y C.



Figura 7. Muestra la morfología corporal de los animales sometidos a tratamiento con RC a 24 meses de edad, se observan las características físicas de cada uno de los grupos. A y B) muestran ratas del grupo control con alimentación *ad libitum*, con alteraciones en la piel, pérdida de pelo y con mayor peso. C) Muestra la morfología del grupo con RC al 15 %. D) Animales del grupo con RC al 35%.

9.4 Análisis de la conducta sexual masculina

El análisis de la CSM consistió en la evaluación de la LM, LI, NM, NI, LE, NE e IPE los parámetros de las latencias. Estos datos se muestran en la Tabla 6. Observamos, que la ejecución de la CSM fue óptima, es decir los sujetos presentaron valores similares a cuando las ratas tenían 12 meses de edad. Observándose un aumento en la LM según transcurría el tiempo de exposición a la RC, tomando en cuenta los valores basales, es decir, los valores que presentaron los animales a los 12 meses de edad, antes de distribuirse en los grupos de RC y el grupo control con alimentación *ad libitum*. De tal modo que, se encontró que a los seis meses de tratamiento los grupos sometidos RC 15 y RC 35 % mantenían las LM y LI como al inicio del experimento, no así para el grupo control con alimentación *ad libitum*, que aumentó la LM. Por otro lado, hubo un aumento en la ejecución de la CSM para los animales RC 35 % que presentaban hasta 3 eyaculaciones, no así para el grupo control que presentó 1 eyaculación.

Por otro lado, después de 12 meses de tratamiento y 24 meses de edad, el grupo RC 35 % presentó una segunda serie copulatoria (2 de 6 animales), sin embargo, se presentó un aumento en la LM, así como de la LI, al compararse con los valores de CSM a los 12 meses. El grupo RC 15 % presentó 1 eyaculación (2 de 6 animales), pero estos mantuvieron la LM y la LI similar a los valores de la CSM a los 12 meses. El grupo Control a los 12 meses de tratamiento y 24 meses de edad no presentó eyaculaciones.

Tabla 6. Efecto de la RC sobre la CSM en el envejecimiento de la rata Wistar

	6 meses después de RC			
	Basal	Control	RC 15 %	RC 35 %
Latencia de montas (seg)	56.5 ± 7.37	200.0 ± 47.70**	83.0 ± 55.33*	40.83 ± 7.50*
Número de montas	3.4 ± 0.77	5.5 ± 1.25	4.16 ± 1.35	3.16 ± 0.47
Latencia de Intromisión (seg)	73.6 ± 52.5	142.5 ± 62.08**	78 ± 56.5*	67.5 ± 28.03*
Número de Intromisiones	8.5 ± 0.43	14.5 ± 1.89	17.8 ± 2.44**	14.0 ± 1.61
Latencia de eyaculación (seg)	521.0 ± 145.0	624 ± 235	738 ± 165**	638 ± 98
Intervalo post-eyaculatorio (seg)	443.3 ± 103.4	414.8 ± 155.4	670.8 ± 203.6	442.0 ± 48.13
Número de eyaculaciones	2.3 ± 0.2	1 ± 0 **	2 ± 1	3 ± 1*
Hit Rate	0.77 ± 0.26	0.67 ± 0.007	0.79 ± 0.033*	0.82 ± 0.25*

Los valores obtenidos (n= 6) muestran X ± ES de los parámetros copulatorios de ratas con RC al 15 o 35 % durante 6 meses después de la RC.

* Indica diferencias significativas entre los grupos de RC 15 y 35 % vs el grupo control, p<0.01; ** indica diferencias significativas entre los grupos de RC 15 y 35.

9.5 Parámetros de calidad espermática

Los valores de los parámetros evaluados en la calidad espermática se vieron disminuidos con la edad de las ratas. En el parámetro de movilidad espermática en los grupos RC15 y 35 % a los 6 meses de RC, solamente se observó un incremento significativo en comparación con el grupo control y el valor inicial (Basal). ($p < 0.05$, Tabla 7). A los 12 meses de la RC, se observó un incremento en la movilidad y vitalidad espermática en comparación con el grupo control ($p < 0.05$, Tabla 7). Cabe destacar que en este grupo control todos los parámetros de calidad espermática a excepción de la fragmentación mostraron una disminución significativa con respecto al tiempo inicial (basal) ($p < 0.05$, Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de la RC sobre la calidad espermática en el envejecimiento de la rata Wistar

	6 meses después de RC				12 meses después de RC		
	Basal	Control	RC 15 %	RC 35 %	Control	RC 15 %	RC 35 %
Mobilidad	64.0 ± 3.6	43.8 ± 0.9	50 ± 2.0*	56.6 ± 0.8**	25.3 ± 2.0**	40.2 ± 0.4*	43.0 ± 2.5*
Vitalidad	89.0 ± 2.1	80.3 ± 0.9	81.1 ± 1.6	86 ± 1.6	44.1 ± 4.7**	50.8 ± 6.9**	55 ± 8.4**
Concentration	245 ± 16.9	220 ± 16.6	257 ± 8.3	245 ± 12.7	148.2 ± 6.2**	218 ± 15.2	178 ± 9
Fragmentación	96.4 ± 0.3	97 ± 0.4	97 ± 0.3	97 ± 0.2	96 ± 0.3	96 ± 0.2	96 ± 0.3

Los valores obtenidos muestran $X \pm ES$ de los parámetros de calidad espermática de ratas con RC al 15 o 35 % durante 6 y 12 meses. * Indica diferencias significativas entre los grupos de RC 15 y 35 % vs el grupo control, $p < 0.01$. ** Indica diferencias significativas entre los grupos de RC 15 y 35 % vs el tiempo 0 (basal), $p < 0.05$.

9.6 Cuantificación Hormonas sexuales

Una vez transcurrido el tiempo de experimentación y terminados los registros de CSM, los animales fueron eutanaciados, para posteriormente recolectar el suero sanguíneo para cuantificación de la T. Al inicio del tratamiento todos los sujetos contaban con 12 meses de edad, y una concentración de T de 2.12 ± 0.32 ng/dL. Al exponer a RC durante seis meses a los animales, se logró mantener elevadas las concentraciones séricas de T para las ratas sometidas a RC 15 % hasta a 1.63 ± 0.27 ng/dL y para el grupo con RC 35 % fue de 1.85 ± 0.25 ng/dL, incluso estos valores son similares a cuando los animales tenían 12 meses de edad, el grupo control con alimentación *ad libitum* mostró una disminución significativa de T con un valor de 0.77 ± 0.13 ng/dL. Cuando los grupos experimentales llegaron hasta los 12 meses con RC y 24 meses de edad se observó que la concentración de T disminuyó aún más para los animales con alimentación *ad libitum*, observándose un valor de 0.162 ± 0.05 ng/dL siendo estos los valores más bajos, no así para el grupo con RC al 15 %, quien presentó un valor de 1.38 ± 0.24 y 35 % 1.30 ± 0.27 , los cuales presentaron una tendencia a disminuir, sin embargo, no alcanzan los valores del grupo control, Tabla 8).

Los datos de E₂ mostraron una disminución significativa cuando se comparó el grupo control de 18 meses de edad con los grupos RC al 35 % para 18 y 24 meses de edad ($p < 0.01$, Tabla 8). Para el caso de la prolactina, no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados, aunque se observa una tendencia al aumento para el caso de los grupos control para 18 y 24 meses de edad, Tabla 8).

9.7 Cuantificación de los parámetros metabólicos.

Al igual que el análisis de la concentración de T para la cuantificación hormonal metabólica, los animales fueron eutanaciados después de transcurrido el tiempo de experimentación, se recolectó el suero sanguíneo del cual se cuantificó las concentraciones de insulina, glucagón, adiponectina y leptina.

Glucosa

La cuantificación de la glucosa nos arrojó valores iniciales de 8.87 ± 0.52 mmol/L, sin embargo, después de 6 meses de RC se observó una disminución significativa para los grupos al 15 y 35 % de RC, mostraron valores de 6.17 ± 1.23 y 5.72 ± 1.12 comparados con el grupo control con alimentación *ad libitum*, mismo que mostró un valor de 11.88 ± 0.42 . Este efecto ocurrió, también, a los 12 meses de RC, mostrándose valores de 6.07 ± 1.22 para el grupo RC al 15 %, 5.22 ± 0.99 para el grupo con RC al 35 % y finalmente 11.90 ± 0.92 para el grupo control ($p < 0.01$, Tabla 8).

Insulina

El análisis de la concentración de insulina se revisó a partir de los doce meses de edad (basal) con un grupo de animales previo a la RC y se encontró lo siguiente: a los 12 meses de edad la insulina mostró un valor de 0.719 ± 0.11 ng/mL. Después de 6 meses de RC se observaron cambios relacionados a esta hormona pues el grupo RC al 15 % presentó un valor de 0.532 ± 0.79 mientras que el grupo con RC al 35 % presentó 0.559 ± 0.075 . En el caso del grupo control con alimentación *ad libitum* aumentó Los valores de insulina hasta 1.52 ± 0.16 al ser comparado con los sujetos del grupo con RC.

Por otro lado, después de 12 meses de RC se observó, que la insulina para el grupo con RC al 15% obtuvo un valor de 0.513 ± 0.12 , para el grupo con RC al 35 % fue de 0.650 ± 0.58 y para el grupo control de 4.371 ± 0.56 , se observó un aumento significativo para el grupo control después de doce meses de RC ($p < 0.01$, Tabla 8).

Glucagón

La concentración de glucagón en el cuerpo es inversamente proporcional a la concentración de insulina, a pesar de esto, la cuantificación se realizó de una manera similar, pues iniciamos con animales de 12 meses de edad (basales) previo a la exposición a RC, los datos obtenidos son los siguientes: los valores iniciales son de 199.0 ± 22.0 pg/mL. Mientras que después de 6 meses de RC se observó que los valores de glucagón tuvieron una tendencia a disminuir, siendo los valores para el grupo con RC al 15 % de 56.0 ± 8.9 , para el grupo al 35% 63.0 ± 7.1 y para el grupo control de: 237.0 ± 55.0 , se observa una disminución para los grupos RC respecto al valor basal (Tabla 7). A los 12 meses de RC y 24 meses de edad se observó que el grupo de RC al 15 % presentó un valor de 74.0 ± 11.0 , el grupo RC al 35 % 36.0 ± 6.3 , mientras que el grupo control presentó un valor de 161.0 ± 16.0 , observándose cambios para los grupos con RC respecto al valor basal. ($p < 0.01$; tabla 8).

Adiponectina

Se sabe que las concentraciones de adiponectina ejercen un efecto sinérgico con la insulina para el metabolismo de la glucosa, así el análisis de las concentraciones de adiponectina es necesario para comprender el funcionamiento energético y la homeostasis metabólica de los organismos sometidos a RC, para lo cual, iniciamos la cuantificación hormonal a los 12 meses de edad (basales) con animales sin RC. Los valores basales fueron de $12.18 \pm .23$ ng/mL. Después de 6 meses de RC y 18 meses de edad no se encontraron cambios significativos en ninguno de los grupos, pues para el grupo con RC al 15 % fue de 13.80 ± 0.69 , para el grupo con RC al 35 % fue de 12.30 ± 0.20 y para el grupo

control se presentó un valor de 12.60 ± 0.80 . De igual forma, a los 12 meses de RC y 24 meses de edad, no se encontraron cambios en los valores de adiponectina, los valores para el grupo RC 15 % fueron de 12.27 ± 0.75 para el grupo al con RC al 35 % fue de 11.60 ± 1.08 y finalmente para el grupo control con alimentación *ad libitum* se presentó un valor de 10.80 ± 0.18 ($p < 0.01$, Tabla 8).

Leptina

Se conoce a la Leptina como la hormona de la saciedad, que a su vez está relacionada con el encendido del eje HHG, además de que esta hormona nos da un indicio del reservorio de energía. Así, se tomaron valores iniciales (basales) de Leptina con ratas de 12 meses de edad los cuales mostraron valores de 2680.0 ± 380.0 pg/mL. Sin embargo, a los 6 meses de RC y 18 meses de edad, se observó una disminución en los valores de la adiponectina para los animales con RC al 15 y 35 %, siendo los valores 773.0 ± 114.0 y 481.0 ± 87.0 , respectivamente, mientras que el grupo control con alimentación *ad libitum* presentó un valor de 3004.0 ± 341.0 , mostrándose un aumento significativo en comparación con los grupos RC.

Después de 12 meses de RC se observa una tendencia a la disminución de esta hormona para los animales sometidos a RC al 15 y 35 % pues los valores disminuyeron a 466.0 ± 59.0 y 336.0 ± 67.0 , mientras que el grupo control con alimentación *ad libitum* alcanzó los valores de 1427.0 ± 119.0 ($p < 0.01$; tabla 8).

Tabla 8. Cuantificación de parámetros metabólicos

	Basal	6 meses después de RC			12 meses después de RC		
		Control	CR 15%	CR 35%	Control	CR 15%	CR 35%
Glucosa (mmol/L)	8.87 ± 0.52	11.88 ± 0.42	6.17 ± 1.23*	5.72 ± 1.12*	11.90 ± 0.92	6.07 ± 1.22*	5.22 ± 0.99*
Leptina (pg/mL)	2680.0 ± 398.0	3004.0 ± 341.0	773.0 ± 114.0*	481.0 ± 87.0*	1427.0 ± 119	466.0 ± 59.0*	336.0 ± 67.0*
Adiponectina (ng/mL)	12.18 ± 0.23	12.60 ± 0.80	13.80 ± 0.69	12.30 ± 0.20	10.80 ± 0.18	12.27 ± 0.75	11.60 ± 1.08
Insulina (ng/mL)	0.719 ± 0.11	1.52 ± 0.16	0.532 ± 0.79*	0.559 ± 0.075*	4.371 ± 0.56 [#]	0.513 ± 0.12*	0.650 ± 0.58*
Glucagón (pg/mL)	199.0 ± 22.0	237.0 ± 55.0	56.0 ± 8.9 [#]	63.0 ± 7.1 [#]	161.0 ± 16.0	74.0 ± 11.0 [#]	36.0 ± 6.3 [#]
Testosterona (ng/mL)	1.95 ± 0.04	0.57 ± 0.03 [#]	1.75 ± 0.14*	2.10 ± 0.15*	0.17 ± 0.02 [#]	1.47 ± 0.07*	1.17 ± 0.08*
Estradiol (pg/mL)	1.68 ± 0.03	1.99 ± 0.05 [#]	1.80 ± 0.03	1.78 ± 0.04*	1.96 ± 0.06 [#]	1.76 ± 0.03*	01.74 ± 0.04*
Prolactina (pg/mL)	65.0 ± 1.56	80.0 ± 5.07	69.0 ± 4.60	71.0 ± 6.01	92.0 ± 13.16 [#]	65.0 ± 3.75	66.0 ± 3.63

Los valores obtenidos muestran X ± ES (n=6 por grupo) para los parámetros metabólicos de animales con RC al 15 y 35 % durante 6 y 12 meses. *Indica diferencias significativas entre el grupo al 15 y 35 % vs el grupo control; [#]Indica diferencias significativas entre los grupos con RC al 15 y 35 % vs el valor basal p < 0.01.

9.8 Cuantificación de apoptosis por anexina V

Una vez desparafinados los cortes de testículo se cuantificó el área de los tubos seminíferos, así como la intensidad de fluorescencia de la Anexina V, en donde se observó que, el área del túbulo seminífero estuvo afectada en el grupo control, sin embargo, observamos que en los grupos RC 15 y RC 35 % a los 6 y 12 meses de RC se mantuvo con respecto a los valores iniciales (Basal). Por otro lado, el área del túbulo seminífero disminuyó 1.2 veces a los 6 meses y 2.3 veces a los 12 meses de tratamiento para el grupo control en comparación con los grupos RC 15 y 35 % ($p < 0.01$, Figura 8A).

Para el caso de la detección de anexina V, no se observaron cambios en los grupos RC 15 y 35 % a los 6 y 12 meses de RC con respecto a su valor inicial (Basal). Mientras que en el grupo control la intensidad de fluorescencia de anexina V se incrementó significativamente a partir de los 6 y hasta los 12 meses de tratamiento (24 meses de edad) ($p < 0.01$, Figura 8B).

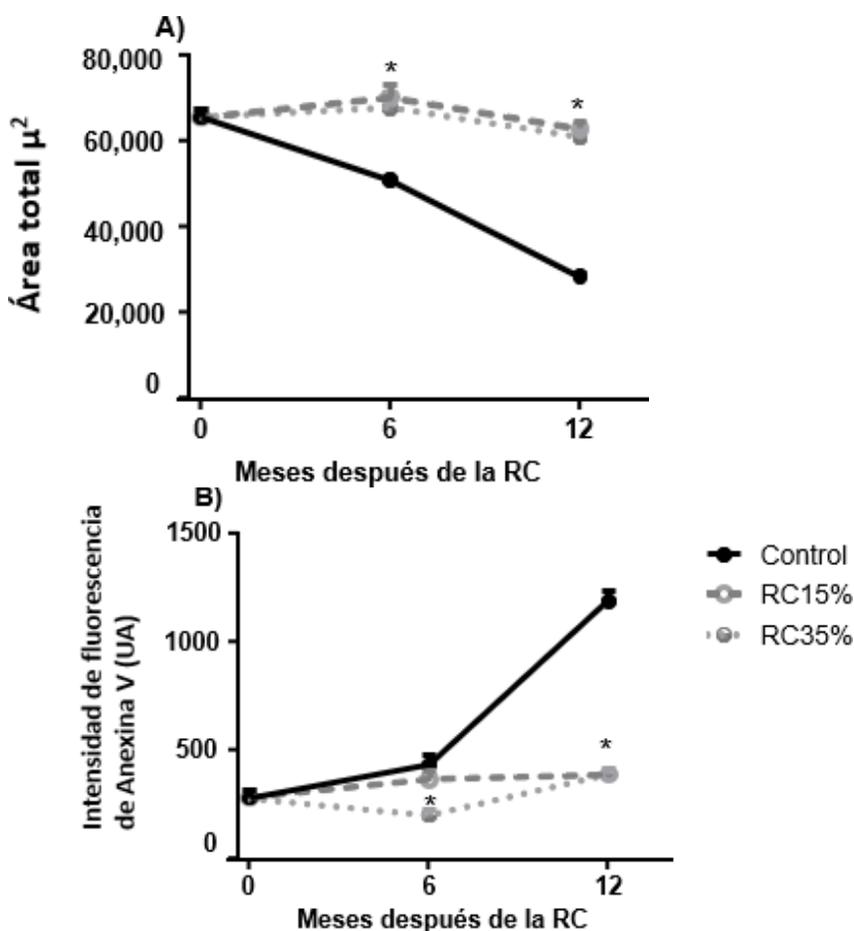


Figura 8. Efecto de la RC en la apoptosis del área total del testículo y de los tubos seminíferos en ratas macho Wistar envejecidas. Los valores obtenidos muestran la media \pm SE del área total y del epitelio de los tubos

seminíferos (A) y la intensidad de fluorescencia de la proteína annexina V como un marcador preapoptótico en el epitelio de los tubos seminíferos (B) en ratas con RC al 15 y 35 % por 6 y 12 meses de RC. *Indica diferencias significativas entre los grupos RC 15 % y 35 % vs el grupo control, $p < 0.01$.

10.0 Discusión

Durante el envejecimiento existe diversos cambios que llevan al individuo al límite de su vida, cambios que pueden verse atenuados según el tratamiento y las condiciones de vida, dentro de estos se encuentra la reducción del metabolismo, la disfunción renal, reducción en la función muscular, cardiovascular y del sistema nervioso central, entre otros (Pak *et al.*, 2021).

Actualmente la investigación busca disminuir la fragilidad del individuo longevo, lo que significa mejorar la calidad y expectativa de vida, contribuyendo o llevando al envejecimiento saludable, que incluye el funcionamiento general del individuo, e incluso el reproductivo (Colman *et al.*, 2014; Yamada *et al.*, 2018). Es aquí donde este proyecto toma importancia, pues contribuye al conocimiento en el campo de la RC como una estrategia nutricional. Demostrando que la RC es una estrategia eficaz para extender la expectativa de vida en la rata Wistar aumentando la longevidad en hasta un 25 % respecto al grupo control, del mismo modo, Colman *et al.*, 2014 reportaron un aumento en la supervivencia de hasta 25 % para el grupo con RC al 30% en mono Rhesus respecto a su control, mientras que Yamahada *et al.*, 2018 reportaron un aumento del 16 % para su grupo con RC. Nuestros datos apoyan lo reportado por estos autores y revelan la importancia, así como la eficacia de la RC en la esperanza de vida, dejando expuesto que los animales con libre alimentación viven menos respecto a los animales con RC.

En una revisión realizada por Pifferi & Aujard, en el 2019 resaltaron los beneficios de la RC para la salud y la esperanza de vida en varias especies, incluidos los primates no humanos. Sin embargo, los efectos de la RC usualmente son evaluados a corto y mediano plazo. Cabe resaltar que nuestros animales estuvieron expuestos hasta 12 meses a la RC que en edad-rata a edad- humano equivale a unos 50-55 años, siendo este un dato muy importante porque revela los beneficios tanto en la salud reproductiva, supervivencia, así como en la salud en general a largo plazo a diferencia de la mayoría de estudios y que mostró para el grupo control con alimentación ad libitum una supervivencia del 50 %, apenas por encima de lo reportado por Yamada *et al.*, 2018; aunque coincide con lo reportado por Colman *et al.*, 2014. Lo que demuestra que el envejecimiento tiende a reducir de manera significativa a la población cuando no se tiene un control en la alimentación.

Por otro lado, el envejecimiento genera un fenotipo degenerado, al tiempo de las alteraciones metabólicas y orgánicas que lleva a la muerte. Colman *et al.*, 2014 reportaron las condiciones físicas mejoradas para su grupo con RC respecto a la abundancia de pelaje y coloración, en este trabajo se demostró los beneficios en la apariencia física de las ratas sometidas a RC desde el 15 % o hasta el 3

5 %, mismos que no solo mostraron una apariencia más juvenil con características físicas mejoradas como: afectaciones en piel, alopecia y/o afectación ocular al compararse con el grupo control, también se redujo el peso corporal y se aumentó la supervivencia.

Los datos mostrados en este trabajo reportan que la RC inicialmente reduce el peso corporal de las ratas sometidas a experimentación al exponerlas a los primeros seis meses de tratamiento y que se mantienen así hasta concluirlo, dado que hay una disminución de la ingesta calórica por parte de los grupos con RC. Sin embargo, cuando los animales tienen alimentación ad libitum como en es el caso del grupo control, el peso corporal tiende a subir, llegando a ser significativo al final del tratamiento. Esto demuestra, que en la ingesta de alimento ad libitum proporciona una ingesta calórica mayor en este grupo. El aumento del peso corporal es una tendencia normal para los individuos que envejecen y no son sometidos a RC, nuestros datos fueron consistentes con los de Sengupta (2013) que reporta pesos similares a los de nuestro grupo control y esclarece que estos deben oscilar entre los 650 a los 750g. Demostrando que nuestro grupo control con un peso de 637 ± 60 g está acorde a los de una rata envejecida, sin embargo, cabe resaltar que en el estudio de este autor no se evaluó la RC en el envejecimiento y el peso corporal. Nuestros datos son los primeros en reportar para animales de 24 meses de edad con y sin RC y que demuestran un peso acorde a su edad para el grupo control según Segupta (2013), pero un peso disminuido para los grupos con RC que corresponden a seis meses de edad, mismo que les permite mejor desempeño en la actividad motora y sexual.

La actividad metabólica en los diferentes grupos experimentales en este estudio fue evaluada a través de las determinaciones de glucosa y hormonas como la insulina, el glucagón, la adiponectina y la leptina, que en conjunto dan un panorama central de la actividad, gasto y resguardo energético para el correcto funcionamiento del individuo (Azzu & Valencak, 2017). Lo anterior es importante, ya que se ha reportado que, con el envejecimiento, los niveles de glucosa se mantienen altos (126 ± 4 ng/dL) por alteraciones en la concentración de insulina y glucagón (1.2 ± 0.28 mg/dL y 188 ± 2 pg/dL respectivamente) (Solis. 2011 y López, 2016)., ya que durante el envejecimiento hay un deterioro en las células α y β pancreáticas (Chang & Halter, 2003), un aumento de la adiposidad visceral, disminución de la actividad física, entre otras (Lemar-Garber & Rosales-Calderón., 2010; Gulcelik *et al.*, 2013; Azzu & Valencak., 2017).

En el presente trabajo, observamos que, en las ratas adultas de 12 meses de edad sometidas a RC por 6 y 12 meses, las concentraciones de glucosa e insulina no presentan cambios respecto a sus valores basales, estos valores se observan en animales en etapa juvenil, los cuales se han reportado que alcanzan valores de: 123 ± 4 mg/dL y 1.0 ± 0.1 ng/dL. En contraste, hay un aumento para estas variables en los animales del grupo control, lo que denota que el consumo del alimento ad libitum conlleva al aumento de la secreción de la insulina para el metabolismo de la glucosa, este evento podría permitir a la RC

mejorar la sensibilidad a la insulina por la disminución de alimento en ambos grupos con RC. Sin embargo, el aumento de la glucosa, producto de la alimentación ad libitum, podría llevar a un problema de resistencia a la insulina, a pesar de que este dato no fue evaluado en este proyecto, se sabe que la resistencia a la insulina ocurre por la lipotoxicidad que influye en la disfunción de las células del páncreas Yazıcı & Sezer (2017) por lo que, el aumento de los niveles circulantes de lípidos y las alteraciones metabólicas se han correlacionado con la resistencia a la insulina en el músculo e hígado, lo que disminuye el metabolismo de la glucosa y puede ocasionar problemas mayores como Diabetes tipo II (Morley, 2015). A pesar de que no evaluamos resistencia a insulina o tolerancia a la glucosa, podemos inferir que nuestros animales del grupo control podrían presentar problemas de este tipo ya que presentaron aumento tanto en la insulina como de la glucosa, lo que significa que hay un déficit en el metabolismo de la glucosa, que podría deberse a resistencia a insulina, quizás por fallas en los receptores a glucosa, también, se ha demostrado que varios neuropéptidos de acción central modulan los procesos cognitivos (Morley, 2015) mismos que podrían verse afectados en el envejecimiento. El envejecimiento altera la función, proliferación, tamaño y número de células adiposas lo que conduce a alteraciones en la secreción, síntesis y función de las adipocitocinas (Lutz & Quinn, 2012). Los adultos mayores tienen niveles más altos de adiponectina asociados con la longevidad, e incluso se propone a la adiponectina como sensibilizador de la insulina para el metabolismo de la glucosa como hormona antiinflamatoria y antiaterógena (Azzu & Valencak., 2017). Sin embargo, en las personas mayores de 65 años o más, la adiponectina se asocia con mayor mortalidad, pues la desregulación de la adiponectina en sujetos mayores puede deberse a una respuesta al aumento de los procesos inflamatorios (Gulcelik *et al.*, 2013). Por otro lado, la adipocitocina-leptina como producto de los adipocitos ejerce efectos endócrinos (Mantzoros *et al.*, 2011). Trabajos sobre leptina, en el envejecimiento mencionan su relación con las enfermedades relacionadas con la edad, como el sarcolema y la enfermedad de Alzheimer, entre otras. El envejecimiento, también se asocia con resistencia a la leptina y/o disminución de los receptores de esta hormona (Mantzoros *et al.*, 2011; Gulcelik *et al.*, 2013; Azzu & Valencak, 2017). En este estudio observamos que la RC mantiene una mayor supervivencia en comparación al grupo control. Además, las concentraciones de adiponectina se mantienen constantes hasta los 24 meses de edad, lo que sugiere el correcto metabolismo de la glucosa tal como lo han sustentado Gulcelik *et al.* (2013). Cabe resaltar que las concentraciones de leptina se vieron disminuidas para los animales con RC 15 y RC 35 % a los 18 y 24 meses de edad, este evento podría explicar la reducción del peso corporal ya que el tejido adiposo es el responsable de la producción de la leptina sugiriendo que a mayor cantidad de tejido adiposo habrá mayor cantidad de leptina (4.6 ± 0.5 ng/ dL y 6 ± 1 ng/ dL) tal como lo muestra Solis, 2011 y López, 2016 y esto se vio reflejado en los resultados. Sumado a lo anterior, la mejora de los parámetros reproductivos pudo verse favorecidos por

la disminución del peso corporal que permite mayor interacción sexual de las ratas aún envejecidas, la reducción de leptina seguramente permitió mejorar la sensibilidad a la insulina tal como lo reporta Quirós *et al.* (2020), lo que permitió el metabolismo de la glucosa y mantuvo la saciedad de los grupos con RC 15 y RC 35 %. Así mismo se ha reportado que la leptina aporta información nutricional pues una disminución de esta hormona conlleva a disfunción reproductiva (Zhang & Chua, 2017) este efecto se vio claramente expresado en nuestras ratas del grupo control que tuvieron un aumento de peso, así como de leptina, sin embargo, las conductas reproductivas se vieron bloqueadas. Mientras que la disminución de la leptina permitió el correcto desempeño de la CSM de las ratas sometidas a RC a través de la pérdida de peso corporal que mejoró las conductas motoras necesarias para la expresión de la CSM en la rata envejecida.

Por otro lado, el envejecimiento disminuye la función celular y fisiológica que altera la homeostasis y afecta la funcionalidad del eje HHG, en varones se ha reportado que hay una disminución en las concentraciones séricas de T a partir de los 50 años (Garasto *et al.*, 2017; Martínez-Mota *et al.*, 2008). Nuestro trabajo resalta el declive de las concentraciones T para las ratas del grupo control cuando llegan a los 18 meses de edad que a su vez equivalen a personas de la tercera edad, mientras que a los 12 meses permanecen similares a etapas juveniles, este dato es similar a lo reportado por (Shortliffe *et al.*, 2014). Sin embargo, los animales con RC mantienen en todo el experimento las concentraciones de T similares a los valores basales. El declive en las concentraciones séricas de T, no solo se ha reportado en humanos, sino también, en roedores y en mono Rhesus (Álvarez *et al.*, 2009; Molina *et al.*, 2010; Colman *et al.*, 2014). Sin embargo, la reducción de T en el grupo control podría ser causado por la disfunción celular propia del envejecimiento tal como lo menciona Garasto *et al.* (2017); mientras que los animales con RC 15 y 35 % a los 6 y 12 meses de tratamiento, misma edad que el grupo control (18 y 24 meses) mantuvieron la concentración de T, que podría deberse a los efectos benéficos de la RC, a través de la mejora en el funcionamiento celular, que activa las vías fisiológicas para la secreción de la GNRH así como la FSH para el funcionamiento de eje HHG. Nuestros datos son apoyados por los reportados por Govic *et al.* (2008) en donde reporta que la RC mantiene constante la T, así mismo con los experimentos realizados por Sitzman *et al.*, (2014) en *Macaca mulatta*, donde los sujetos fueron sometidos a RC al 30 % y reportaron mejora en la funcionalidad del eje HHG manteniendo estables las concentraciones de T. Por otro lado, la actividad de la aromatasa es necesaria para la aromatización de la T a E₂, misma que aumenta su concentración en el envejecimiento (Brooks *et al.*, 2020); pues modifica el anillo A de la molécula de T para convertirlo en un anillo con dobles enlaces alternados, que va a tener afinidad por estructuras cerebrales tales como la amígdala, el área preóptica y el núcleo de la cama de la estra terminal (Corona *et al.*, 2016; Kahn & Brannigan 2017; Khodamoradi *et al.*, 2020; Brooks *et al.*, 2020), estructuras necesarias para la expresión de la CSM. En este estudio, observamos que la concentración

de E₂ para los animales del grupo control de 18 y 24 meses de edad se vio aumentada, probablemente por la actividad de la aromatasa ya que esta hormona es mayor en individuos con más peso, ya que tiene resguardo en el tejido adiposo. Mientras que los grupos RC no mostraron este aumento de E₂, posiblemente por que la RC es capaz de mantener la homeostasis del eje HHG a través de un aporte energético no excesivo que disminuye el estrés oxidante y con este, el daño a nivel celular permitiendo su correcta función (Eriau *et al.*, 2021).

Actualmente la investigación de las acciones centrales de la PRL está muy centrada en las mujeres, sin embargo, esta hormona también tiene funciones en la fisiología y el comportamiento masculino, y se ha reportado que puede alterar la CSM al aumentar su concentración durante el envejecimiento (Corona *et al.*, 2016; Eriau *et al.*, 2021). Nosotros pudimos observar que la concentración de PRL en ratas envejecidas mostraba cambios solo en el grupo control y hasta los 24 meses de edad seguramente provocado por el envejecimiento, lo que concuerda con lo reportado por Corona *et al.* (2016) aunque este hecho resulta controversial, pues los datos reportados por Smith *et al.* (1992) en donde llevan a sus grupos experimentales al envejecimiento, pero no reportan cambios para la PRL.

Se ha reportado que con el envejecimiento se desarrolla hipogonadismo, las células de Leydig reducen gradualmente su capacidad para producir T (Nieschlag, 2020). Las concentraciones de T en varones comienzan a disminuir a partir de la edad media en un 2% por año (Feldman *et al.*, 2002; Jubiz *et al.*, 2007). Las concentraciones bajas de T también se asocian con obesidad, depresión, fatiga, masa muscular reducida, disfunción de órganos sexuales y pérdida de la función cognitiva (Devoto & Aravena, 2004; Kelly & Jones, 2015). El aumento de la apoptosis asociado a la edad es responsable del deterioro de las funciones testiculares (Yang *et al.*, 2015; Jeremy, Gurusubramanian & Roy., 2019). En este estudio observamos un aumento en la apoptosis testicular a partir de los 18 meses de edad lo que sugiere que la disminución en las concentraciones de T tiene un efecto contundente en la función testicular; nuestros datos son apoyados por los reportados por Yao *et al.* (2019) en donde encontraron un aumento de la apoptosis testicular a partir de los 12 y hasta los 24 meses de edad en ratas Sprague Dawley. En nuestro estudio, nuestras ratas con RC al 15 y 35 % no mostraron cambios en la apoptosis testicular, incluso hasta los 24 meses de edad, demostrando que la RC es una buena estrategia para mantener la integridad testicular.

Por otro lado, Uriondo *et al.* (2011) correlacionaron la expresión de anexina V con apoptosis en espermatozoides para personas mayores de 40 años, ellos reportaron un aumento de estos marcadores al analizarse con la edad de los pacientes, similar a lo reportado por Muller *et al.* (1998), Sastre *et al.* (2000) y Luo *et al.* (2006). Mientras que, Colin-Valenzuela *et al.* (2010) analizaron la apoptosis espermática a partir de la externalización de fosfatidil serina, cuantificado a través de anexina V, reportando un aumento para personas mayores de 40 años.

Diversos trabajos han demostrado la existencia de una correlación directa entre las concentraciones de T y la CSM, cuando hay un déficit de T la CSM se ve afectada, incluso cuando los animales son adultos jóvenes (Chen *et al.*, 2005; Govic *et al.*, 2008; Yeap, 2009; Rana *et al.*, 2021). Sin embargo, es necesaria la actividad sinérgica de la T y del E₂ para el correcto despliegue de la CSM, pues un aumento de E₂ resulta en una posible feminización del cerebro y aumenta las latencias en las pruebas de CSM (Oliveira *et al.*, 2019). En nuestro estudio observamos que los animales del grupo control presentaron un aumento de E₂, así como un aumento en las latencias durante las pruebas de CSM. Estos resultados demuestran la inactivación parcial de la CSM a través del envejecimiento para las ratas del grupo control. Sin embargo, la RC puede prevenir este proceso ya que disminuye las concentraciones de E₂. Por otra parte, se ha demostrado que un aumento en las concentraciones de PRL trae consigo un déficit en la expresión de la CSM (Corona *et al.*, 2016; Salais-López *et al.*, 2018). En nuestro trabajo, no observamos cambios significativos en la PRL entre los grupos RC, aunque sí hubo un aumento para los animales del grupo control. En nuestro estudio, el aumento en las concentraciones de E₂, la disminución de T y el aumento de PRL son las causales en la reducción en la expresión de la CSM. Sin embargo, la RC mantiene activa la CSM aún en ratas con 24 meses de edad, a través del mantenimiento de las concentraciones de T y E₂ importantes para el funcionamiento del eje HHG. Nuestros datos son apoyados por los estudios realizados por Sitzman *et al.* (2014) que después de someter a RC al 30% mantiene óptimas las concentraciones de T.

Estudios en ratas han demostrado que la LM, LI, LE e IPE se ven aumentadas a partir de los 11 meses de edad, siendo aún más marcado a los 24 meses, en donde también disminuyen las eyaculaciones (Smith *et al.*, 1992; Lucio *et al.*, 2013). En nuestra investigación, observamos que las ratas del grupo control, a los 18 meses de edad, presentaron un aumento en la LE. Además, los mismos sujetos, a los 24 meses de edad, no presentaron eyaculaciones. Sin embargo, los animales sometidos a RC hasta los 24 meses de edad presentaron hasta dos eyaculaciones. Estas observaciones nos permiten decir que la RC al 15 y 35% mejora la CSM durante el envejecimiento, ya que la rata Wistar es capaz de desplegar la CSM hasta la eyaculación. Probablemente porque la RC permite una mejor comunicación neural entre las estructuras que regulan la expresión de la CSM y una funcionalidad del eje HHG, pues las concentraciones de T son mayores, lo que lleva a un buen desempeño sexual, pues se sabe que con el envejecimiento hay pérdida de la actividad neural, específicamente en la acción de receptores hipotalámicos (receptores a andrógenos y estrógenos) que son los encargados de codificar las señales en el área preóptica (Wu & Gore, 2009). Estos datos sugieren que la RC permiten tener homeostasis en las hormonas sexuales y un correcto funcionamiento de las áreas cerebrales, necesarias para desplegar la CSM aún en el envejecimiento. Estas observaciones son apoyadas por el experimento de Govic *et al.* (2008), en donde observaron que la RC al 25% en ratas jóvenes mejoran la CSM al reducir la LI y LE

y que de igual forma mantienen constantes las concentraciones de T.

La concentración sérica de T no solo es necesaria en estructuras neurales para la expresión de la CSM, también es indispensable para el funcionamiento del sistema reproductor, por lo que la T para los animales sometidos a RC al 15 y 35 % mantiene estable el proceso de espermatogénesis en el testículo, lo que se ve reflejado en la cuenta espermática, aumentada para los grupos con RC respecto a su control. Nuestros resultados toman fuerza ya que diversos autores reportan un declive en el conteo de espermatozoides para ratas de edades similares a nuestros controles de 18 y 24 meses de edad (Syntin, 2001; Lucio *et al.*, 2009; Lucio *et al.*, 2013; Niu *et al.*, 2014; Hussein *et al.*, 2020). Sin embargo, estos trabajos solo evalúan envejecimiento y nuestro estudio combina envejecimiento con restricción calórica a largo plazo permitiendo mejorar el eje HHG y con ello la calidad espermática. La disminución de T afecta la movilidad espermática, esto se ha reportado para la rata Brow Norman, rata Wistar y humano (Syntin, 2001; Lucio 2009; Nui *et al.*, 2014). En nuestro estudio pudimos observar que la movilidad de los espermatozoides se redujo para el grupo control a partir de los 18 meses de edad, no así para los animales con RC. Lo que sugiere un mejor funcionamiento celular, que puede derivar de la concentración de T. Nuestros datos toman mayor relevancia pues son los primeros en mostrar estos efectos en la rata Wistar envejecida, ya que existen estudios similares, pero son realizados en *Macaca mulatta* con RC al 30 % (Sitzman *et al.*, 2010; 2014). Por otro lado, pudimos observar que el envejecimiento conlleva a un declive en la vitalidad espermática incluso con RC a los 24 meses de edad, a pesar de que hay mejora en distintos puntos del eje HHG.

A la fecha la investigación sobre la fragmentación del ADN de los espermatozoides y sus consecuencias en la reproducción de los individuos se encuentra en la etapa de exploración y el mecanismo específico involucrado no está claro (Qiu *et al.*, 2020). Sin embargo, se sabe que la obesidad y el envejecimiento potencian este evento a través del aumento en las EROS (Vendramini *et al.*, 2014; Esteves *et al.*, 2017). En el presente estudio no observamos fragmentación del ADN espermático, en ninguno de los tratamientos quizás como consecuencia de la mejora en el eje HHG.

11.0 Conclusiones

Nuestros datos muestran que:

- La RC favorece el envejecimiento saludable, logra mantener los parámetros de la CSM, la calidad espermática, correlacionado con un aumento en la concentración de T, misma que promueve las conductas reproductivas.
- La RC al 15% tiene mejor respuesta al envejecimiento respecto a la RC al 35 %.
- La RC favorece el metabolismo de la glucosa, el estado hormonal y con ello la homeostasis energética.
- Es una estrategia eficaz que puede ayudar a la preservación de especies con importancia económica y en peligro de extinción.

12.0 Perspectivas

En la actualidad la RC es la estrategia más eficaz para prolongar la vida útil de los organismos, mejorar las condiciones metabólicas y reproductivas tanto en organismos adultos jóvenes como en edad avanzada, por lo que, la RC tiene muchas posibles aplicaciones o perspectivas a futuro dentro de ellas:

- Analizar moléculas como la mTOR, la IGF1 para indagar en las posibles vías que actúan en el envejecimiento.
- Analizar también la actividad de las moléculas antioxidantes y poder tener un panorama del nivel de oxidación en el cuerpo de los individuos.
- Mientras que a nivel celular; se podrían realizar cultivos para verificar la senescencia celular que puede incluir desde células del músculo, hasta celular reproductivas.
- Mientras que, en modelos biológicos, hace falta indagar en los efectos de la RC en hembras de todas las edades y su descendencia.
- Como un tratamiento para el humano (investigación traslacional) podría traer muchos beneficios a la población para disminuir problemas como: Obesidad, diabetes, hipertensión entre otras, con alta aplicación a pacientes para la prevención de enfermedades crónico-degenerativas y disminuir riesgo de muerte prematura.

13. Bibliografía

- Almeida, Susana et al. 2017. "Fertility and Sperm Quality in the Aging Male". *Current Pharmaceutical Design* 23(30). <http://www.eurekaselect.com/152125/article> (el 16 de enero de 2023).
- Alonso-Fernández, Patricia, y Mónica de la Fuente. 2008. "Marcadores inmunológicos de envejecimiento". *Revista Española de Geriátría y Gerontología* 43(3): 167–79.
- Alves, R., T. Castro Esteves, y M.A. Trelles. 2013. "Factores Intrínsecos y Extrínsecos Implicados En El Envejecimiento Cutáneo". *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana* 39(1): 89–102.
- Ameur, Adam et al. 2011. "Ultra-Deep Sequencing of Mouse Mitochondrial DNA: Mutational Patterns and Their Origins" ed. Gregory S. Barsh. *PLoS Genetics* 7(3): e1002028.
- Anderson, Rozalyn M., Dhanansayan Shanmuganayagam, y Richard Weindruch. 2009. "Caloric Restriction and Aging: Studies in Mice and Monkeys". *Toxicologic Pathology* 37(1): 47–51.
- Arriola Apelo, Sebastian I., y Dudley W. Lamming. 2016. "Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges From the Soil of Easter Island". *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 71(7): 841–49.
- Asadi, Farzad, y Savita Dhanvantari. 2021. "Pathways of Glucagon Secretion and Trafficking in the Pancreatic Alpha Cell: Novel Pathways, Proteins, and Targets for Hyperglucagonemia". *Frontiers in Endocrinology* 12: 726368.
- Aulinas, Anna et al. 2013. "[Telomeres, aging and Cushing's syndrome: are they related?]". *Endocrinología Y Nutrición: Organo De La Sociedad Espanola De Endocrinología Y Nutrición* 60(6): 329–35.
- Azzu, Vian, y Teresa G. Valencak. 2017. "Energy Metabolism and Ageing in the Mouse: A Mini-Review". *Gerontology* 63(4): 327–36.
- Bakhtiari, Nuredin et al. 2018. "Mounting Evidence Validates Ursolic Acid Directly Activates SIRT1: A Powerful STAC Which Mimic Endogenous Activator of SIRT1". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 650: 39–48.
- Bass, Timothy M. et al. 2007. "Optimization of Dietary Restriction Protocols in Drosophila". *The Journals of Gerontology: Series A* 62(10): 1071–81.
- Balch, William E., Richard I. Morimoto, Andrew Dillin, y Jeffery W. Kelly. 2008. "Adapting Proteostasis for Disease Intervention". *Science* 319(5865): 916–19.
- Bitto, Alessandro et al. 2016. "Transient Rapamycin Treatment Can Increase Lifespan and Healthspan in Middle-Aged Mice". *eLife* 5: e16351.
- Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, et al. 2010. Mecanismos de extensión de la vida útil por rapamicina en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. *Metab. celular enero*;

11 :35–46.

Bonilla-Jaime, H., G. Vázquez-Palacios, M. Arteaga-Silva, y S. Retana-Márquez. 2006. “Hormonal Responses to Different Sexually Related Conditions in Male Rats”. *Hormones and Behavior* 49(3): 376–82.

Brandhorst, Sebastian, y Valter D. Longo. 2016. “Fasting and Caloric Restriction in Cancer Prevention and Treatment”. En *Metabolism in Cancer, Recent Results in Cancer Research*, eds. Thorsten Cramer y Clemens A. Schmitt. Cham: Springer International Publishing, 241–66. http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-42118-6_12 (el 16 de enero de 2023).

Brooks, David C et al. 2020. “Brain Aromatase and the Regulation of Sexual Activity in Male Mice”. *Endocrinology* 161(10): bqaa137.

Calcinotto, Arianna et al. 2019. “Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury”. *Physiological Reviews* 99(2): 1047–78.

Campos, R & Barzuna, L. 2004. Estudio del Envejecimiento. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, 39 (2), 33-47.

Cao, Kan et al. 2011. “Progerin and Telomere Dysfunction Collaborate to Trigger Cellular Senescence in Normal Human Fibroblasts”. *Journal of Clinical Investigation* 121(7): 2833–44.

Carlos García, B. 2013. “Enfermedades endocrinas en el adulto mayor”. *Revista Médica Clínica Las Condes* 24(5): 866–73.

Carlzon, Daniel et al. 2014. “Both Low and High Serum IGF-1 Levels Associate With Increased Risk of Cardiovascular Events in Elderly Men”. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99(11): E2308–16.

Carthew, Richard W. 2021. “Gene Regulation and Cellular Metabolism: An Essential Partnership”. *Trends in Genetics* 37(4): 389–400.

Chambers, Kathleen C., Janice E. Thornton, y Charles E. Roselli. 1991. “Age-Related Deficits in Brain Androgen Binding and Metabolism, Testosterone, and Sexual Behavior of Male Rats”. *Neurobiology of Aging* 12(2): 123–30.

Chandran, Manju, Susan A. Phillips, Theodore Ciaraldi, y Robert R. Henry. 2003. “Adiponectin: More Than Just Another Fat Cell Hormone?” *Diabetes Care* 26(8): 2442–50.

Chellappa, Karthikeyani et al. 2019. “Hypothalamic MTORC2 Is Essential for Metabolic Health and Longevity”. *Aging Cell* 18(5). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/accel.13014> (el 16 de enero de 2023).

Chen, Haolin, Rafael A Irizarry, Lindi Luo, y Barry R Zirkin. 2004. “Leydig Cell Gene Expression: Effects of Age and Caloric Restriction”. *Experimental Gerontology* 39(1): 31–43.

Colin-Valenzuela, A.; Gómez López, N.; Avila Lombardo, R.; Barroso Villa, G. (2010) Impacto del

envejecimiento masculino en la capacidad funcional del espermatozoide a través de la expresión de fosfatidil serina y oligonucleomas. *Ginecol. Obstet. México*, 78, 669–676.

Colman, Ricki J. et al. 2009. “Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys”. *Science* 325(5937): 201–4.

Colman, Ricki J. et al. 2014. “Caloric Restriction Reduces Age-Related and All-Cause Mortality in Rhesus Monkeys”. *Nature Communications* 5(1): 3557.

Considine, R. V. et al. 1996. “Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans”. *The New England Journal of Medicine* 334(5): 292–95.

Corona, Giovanni et al. 2016. “Endocrinologic Control of Men’s Sexual Desire and Arousal/Erection”. *The Journal of Sexual Medicine* 13(3): 317–37.

Corton, J. C., y H. M. Brown-Borg. 2005. “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator 1 in Caloric Restriction and Other Models of Longevity”. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 60(12): 1494–1509.

Crowley, Lisa C., Brooke J. Marfell, Adrian P. Scott, y Nigel J. Waterhouse. 2016. “Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry”. *Cold Spring Harbor Protocols* 2016(11): pdb. prot087288.

Cruzen, Christina, y Ricki J. Colman. 2009. “Effects of Caloric Restriction on Cardiovascular Aging in Non-Human Primates and Humans”. *Clinics in Geriatric Medicine* 25(4): 733–43.

Cynober, Luc A. 2002. “Plasma Amino Acid Levels with a Note on Membrane Transport: Characteristics, Regulation, and Metabolic Significance”. *Nutrition* 18(9): 761–66.

Devoto C, Enzo, y Lucía Aravena C. 2004. “HIPOGONADISMO ASOCIADO A LA SENILIDAD EN EL VARÓN (CLIMATERIO MASCULINO - ANDROPAUSIA - ADAM)”. *Revista chilena de obstetricia y ginecología* 69(5). http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75262004000500012&lng=en&nrm=iso&tlng=en (el 16 de enero de 2023).

Diez, Jj, y P Iglesias. 2003. “The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease”. *European Journal of Endocrinology*: 293–300.

Dorszewska, Jolanta et al. 2021. “Oxidative Stress Factors in Parkinson’s Disease”. *Neural Regeneration Research* 16(7): 1383.

Downs, Jodi L, y Henryk F Urbanski. 2006. “Aging-related sex-dependent loss of the circulating leptin 24-h rhythm in the rhesus monkey”. *Journal of Endocrinology* 190(1): 117–27.

Egan, Daniel F. et al. 2011. “Phosphorylation of ULK1 (HATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy”. *Science* 331(6016): 456–61.

Elewa R. and Zouboulis CC.2014. “moleculares de acción de los compuestos tópicos antienvjecimiento.” *Revista de la Sociedad Mecanismos Dermatológica de Mujeres Egipcias*, 11 (2),

73-78.

Engin, Atilla. 2017. "Adiponectin-Resistance in Obesity". En *Obesity and Lipotoxicity, Advances in Experimental Medicine and Biology*, eds. Ayse Basak Engin y Atilla Engin. Cham: *Springer International Publishing*, 415–41. http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5_18 (el 16 de enero de 2023).

Eriau, Erwan, Juliette Paillet, Guido Kroemer, y Jonathan G. Pol. 2021. "Metabolic Reprogramming by Reduced Calorie Intake or Pharmacological Caloric Restriction Mimetics for Improved Cancer Immunotherapy". *Cancers* 13(6): 1260.

Esteves, Sandro C., Ashok Agarwal, Chak-Lam Cho, y Ahmad Majzoub. 2017. "A Strengths-Weaknesses-Opportunities-Threats (SWOT) analysis on the clinical utility of sperm DNA fragmentation testing in specific male infertility scenarios". *Translational Andrology and Urology* 6(S4): S734–60.

Fang, Han, y Robert L. Judd. 2018. "Adiponectin Regulation and Function". En *Comprehensive Physiology*, ed. Ronald Terjung. Wiley, 1031–63. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c170046> (el 16 de enero de 2023).

Farup, Per G. et al. 2022. "APOE Polymorphism and Endocrine Functions in Subjects with Morbid Obesity Undergoing Bariatric Surgery". *Genes* 13(2): 222.

Feldman, Henry A. et al. 2002. "Age Trends in the Level of Serum Testosterone and Other Hormones in Middle-Aged Men: Longitudinal Results from the Massachusetts Male Aging Study". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(2): 589–98.

Ferreira-Marques, Marisa, André Carvalho, Cláudia Cavadas, y Célia A. Azeiteiro. 2021. "PI3K/AKT/MTOR and ERK1/2-MAPK Signaling Pathways Are Involved in Autophagy Stimulation Induced by Caloric Restriction or Caloric Restriction Mimetics in Cortical Neurons". *Aging* 13(6): 7872–82.

Ferrington, Deborah A., Aimee D. Husom, y Ladora V. Thompson. 2005. "Altered Proteasome Structure, Function, and Oxidation in Aged Muscle". *The FASEB Journal* 19(6): 1–24.

Finch, Caleb E. 2014. "The Menopause and Aging, a Comparative Perspective". *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 142: 132–41.

Fontana, Luigi, y Linda Partridge. 2015. "Promoting Health and Longevity through Diet: From Model Organisms to Humans". *Cell* 161(1): 106–18.

Flurkey, Kevin, John Papaconstantinou, Richard A. Miller, y David E. Harrison. 2001. "Lifespan Extension and Delayed Immune and Collagen Aging in Mutant Mice with Defects in Growth Hormone Production". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(12): 6736–41.

Galluzzi, Lorenzo et al. 2017. "Molecular Definitions of Autophagy and Related Processes". *The EMBO*

journal 36(13): 1811–36.

Garasto, Sabrina et al. 2017. “Thyroid Hormones in Extreme Longevity”. *Mechanisms of Ageing and Development* 165: 98–106.

Grandison RC, Piper MD, Partridge L. 2009. *Naturaleza*. 2 de diciembre de 2009.

Goldstein JR, Cassidy T (2010). “How slowing senescence changes life expectancy”. MPIDR Working paper WP 2010-006. Max Planck Institute for Demographic Research. Rostock, Germany.

Govic, Antonina et al. 2008. “Alterations in Male Sexual Behaviour, Attractiveness and Testosterone Levels Induced by an Adult-Onset Calorie Restriction Regimen”. *Behavioural Brain Research* 190(1): 140–46.

Graaf C, Blom W, Smeets P, Stafleu A, Hendriks H. 2004. “Biomarkers of satiation and satiety”. *Am J Clin Nutr*; 79: 946–61.

Gromada J, Franklin I & Wollheim CB. 2007. “Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains”. *Endocrinology Rev* 28, 84-116.

Gruenewald, D. A., M. A. Naai, B. T. Marck, y A. M. Matsumoto. 2000. “Age-Related Decrease in Hypothalamic Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Gene Expression, but Not Pituitary Responsiveness to GnRH, in the Male Brown Norway Rat”. *Journal of Andrology* 21(1): 72–84.

Gubbi, Sriram et al. 2018. “40 YEARS of IGF1: IGF1: The Jekyll and Hyde of the Aging Brain”. *Journal of Molecular Endocrinology* 61(1): T171–85.

Guertin, David A. et al. 2006. “Ablation in Mice of the MTORC Components Raptor, Rictor, or MLST8 Reveals That MTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1”. *Developmental Cell* 11(6): 859–71.

Guevara-Aguirre, Jaime et al. 2011. “Growth Hormone Receptor Deficiency Is Associated with a Major Reduction in Pro-Aging Signaling, Cancer, and Diabetes in Humans”. *Science Translational Medicine* 3(70). <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3001845> (el 16 de enero de 2023).

Gulcelik, N.E.; Halil, M.; Ariogul, S.; Usman, A. 2013.” Adipocytokines and aging: Adiponectin and leptin.” *Minerva Endocrinol.*, 38, 203–210.

Gunes, Sezgin, Gulgez Neslihan Taskurt Hekim, Mehmet Alper Arslan, y Ramazan Asci. 2016. “Effects of Aging on the Male Reproductive System”. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 33(4): 441–54.

Hamden, Khaled et al. 2008. “Age-Related Decrease in Aromatase and Estrogen Receptor (ER α and ER β) Expression in Rat Testes: Protective Effect of Low Caloric Diets”. *Asian Journal of Andrology* 10(2): 177–87.

Han, Limin et al. 2013. “Upregulation of SIRT1 by 17 β -Estradiol Depends on Ubiquitin-Proteasome Degradation of PPAR- γ Mediated by NEDD4-1”. *Protein & Cell* 4(4): 310–21.

- Han, Xiaojuan et al. 2016. “AMPK Activation Protects Cells from Oxidative Stress-induced Senescence via Autophagic Flux Restoration and Intracellular NAD⁺ Elevation”. *Aging Cell* 15(3): 416–27.
- Hansen, Malene et al. 2007. “Lifespan Extension by Conditions That Inhibit Translation in *Caenorhabditis Elegans*”. *Aging Cell* 6(1): 95–110.
- Hardie, D. Grahame. 2014. “AMP-Activated Protein Kinase: Maintaining Energy Homeostasis at the Cellular and Whole-Body Levels”. *Annual Review of Nutrition* 34(1): 31–55.
- Harman, S. Mitchell et al. 2001. “Longitudinal Effects of Aging on Serum Total and Free Testosterone Levels in Healthy Men”. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(2): 724–31.
- Hammerman M. R. 1987. “Insulin-like growth factors and aging.” *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 16(4), 995–1011.
- Hernández-Matos Y. Delgado-Roche L. López-Pérez R. Martínez-Sánchez G. Mallok A. 2010. Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 153-158.
- Hernandez-Segura, Alejandra, Jamil Nehme, y Marco Demaria. 2018. “Hallmarks of Cellular Senescence”. *Trends in Cell Biology* 28(6): 436–53.
- Hess, Rex A. 2003. “[No title found]”. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1(1): 52.
- Höhn, Annika et al. 2017. “Happily (n)Ever after: Aging in the Context of Oxidative Stress, Proteostasis Loss and Cellular Senescence”. *Redox Biology* 11: 482–501.
- Hoong, Caroline W S, y Marvin W J Chua. 2021. “SGLT2 Inhibitors as Calorie Restriction Mimetics: Insights on Longevity Pathways and Age-Related Diseases”. *Endocrinology* 162(8): bqab079.
- Hopp, Grüter, y Hottiger. 2019. “Regulation of Glucose Metabolism by NAD⁺ and ADP-Ribosylation”. *Cells* 8(8): 890.
- Ho, K. Y. et al. 1987. “Effects of Sex and Age on the 24-Hour Profile of Growth Hormone Secretion in Man: Importance of Endogenous Estradiol Concentrations*”. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 64(1): 51–58.
- Hotta, Kikuko et al. 2000. “Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients”. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20(6): 1595–99.
- Hull, E. and Dominguez, J. 2015. “Male Sexual Behavior.” In: Neill J. D., et al., editors. *Knobil and Neill’s Physiology of reproduction*. 2211-2268.
- Hussein, S. M., A. B. El-Fadaly, A. G. Metawea, y B. E. A. Khaled. 2020. “Aging changes of the testis in albino rat: light, electron microscopic, morphometric, immunohistochemical and biochemical study”. *Folia Morphologica* 79(3): 503–15.
- Jang, Y.C., and Remmen, H.V. 2009. “The mitochondrial theory of aging: Insight from transgenic and knockout mouse models.” *Exp. Gerontol.* 44, 256–260.

- Jennings, K.J.; de Lecea, L. 2020. “Neural and Hormonal Control of Sexual Behavior.” *Endocrinology*, 161, bqaal150.
- Jeremy, M.; Gurusubramanian, G.; Roy, V.K. 2019. “Vitamin D3 regulates apoptosis and proliferation in the testis of D-galactose-induced aged rat model.” *Sci. Rep.*, 9, 14103.
- Jeyapalan, Jessie C., Mark Ferreira, John M. Sedivy, y Utz Herbig. 2007. “Accumulation of Senescent Cells in Mitotic Tissue of Aging Primates”. *Mechanisms of Ageing and Development* 128(1): 36–44.
- Johnson, Sheri L., Jessica Dunleavy, Neil J. Gemmell, y Shinichi Nakagawa. 2015. “Consistent Age-Dependent Declines in Human Semen Quality: A Systematic Review and Meta-Analysis”. *Ageing Research Reviews* 19: 22–33.
- Jubiz W. and Cruz E. A. 2007. “Hipogonadismo masculino: Causas, genética, diagnóstico y tratamiento.” *Colombia Médica*, 38 (1), 84-91. [Fecha de Consulta 22 de Julio de 2021]. ISSN: 0120-8322.
- Kaeberlein, Matt et al. 2005. “Regulation of Yeast Replicative Life Span by TOR and Sch9 in Response to Nutrients”. *Science* 310(5751): 1193–96.
- Kaeberlein, M., M. McVey, y L. Guarente. 1999. “The SIR2/3/4 Complex and SIR2 Alone Promote Longevity in *Saccharomyces Cerevisiae* by Two Different Mechanisms”. *Genes & Development* 13(19): 2570–80.
- Kahn, B.E.; Brannigan, R.E. 2017. “Obesity and male infertility”. *Curr. Opin. Urol.*, 27, 441–445.
- Kanfi, Yariv et al. 2012. “The Sirtuin SIRT6 Regulates Lifespan in Male Mice”. *Nature* 483(7388): 218–21.
- Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S. 2004. “Regulación de la vida útil en *Drosophila* mediante la modulación de genes en la vía de señalización TOR”. *Curr Biol.* 25 de mayo; 14 :885–890.
- Kathryn M. Jervis y Bernard R. 2003. “Effects of caloric restriction on gene expression along the epididymis of the Brown Norway rat during aging”. *Experimental Gerontology* 38 549–560.
- Kayashima, Yasunari et al. 2017. “Alkylresorcinols Activate SIRT1 and Delay Ageing in *Drosophila Melanogaster*”. *Scientific Reports* 7(1): 43679.
- Kelly, D. M., y T. H. Jones. 2015. “Testosterone and Obesity: Testosterone and Obesity”. *Obesity Reviews* 16(7): 581–606.
- Khan, Mehtab et al. 2019. “17 β -Estradiol Modulates SIRT1 and Halts Oxidative Stress-Mediated Cognitive Impairment in a Male Aging Mouse Model”. *Cells* 8(8): 928.
- Kemnitz, J.W. 2011. “Calorie restriction and aging in nonhuman primates.” *ILAR J.*, 52, 66–77.
- Khodamoradi, K.; Parmar, M.; Khosravizadeh, Z.; Kuchakulla, M.; Manoharan, M.; Arora, H. 2020. “The role of leptin and obesity on male infertility.” *Curr. Opin. Urol.*, 30, 334–339.

- Kidd SA., Eskenazi B., Wyrobek AJ. 2001. "Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature." *Fertil Steril* 75: 237-48.
- Kim, Chan-Sik, Sok Park, y Junghyun Kim. 2017. "The Role of Glycation in the Pathogenesis of Aging and Its Prevention through Herbal Products and Physical Exercise". *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry* 21(3): 55-61.
- Kim, Dae Hyun et al. 2019. "Novel Role of Lck in Leptin-Induced Inflammation and Implications for Renal Aging". *Aging and disease* 10(6): 1174.
- Kim, Juewon et al. 2015. "The Natural Phytochemical Dehydroabietic Acid Is an Anti-Aging Reagent That Mediates the Direct Activation of SIRT1". *Molecular and Cellular Endocrinology* 412: 216-25.
- Kim, Min Jo et al. 2018. "Novel SIRT1 Activator MHY2233 Improves Glucose Tolerance and Reduces Hepatic Lipid Accumulation in Db/Db Mice". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 28(4): 684-88.
- Kishida-K., Nagaretan., Kondo H., Kobayashi H. H., Takanaka S., Maeda N., Nagasawa A., Hibuse T., Ohashi K., Kumada M., Nishizawa H., Okamoto Y., Ouchi N., Meda K., Kihara S., Funahashi T., Matsuzawa Y. 2003. "Disturbed secretion of mutant adiponectin associated with the metabolic syndrome." Issue 1, 20 June 2003, 286-292.
- Klaips, Courtney L., Gopal Gunanathan Jayaraj, y F. Ulrich Hartl. 2018. "Pathways of Cellular Proteostasis in Aging and Disease". *Journal of Cell Biology* 217(1): 51-63.
- Komljenovic, Andrea et al. 2019. "Cross-Species Functional Modules Link Proteostasis to Human Normal Aging" ed. Roderic Guigo. *PLOS Computational Biology* 15(7): e1007162.
- Krasnow SM. and Steiner R A. 2006. "Physiological Mechanisms Integrating Metabolism and Reproduction. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction." Third Edition edited by Jimmy D. Neill, Elsevier © 2006. 2553-2625.
- Krishnamurthy, Janakiraman et al. 2004. "Ink4a/Arf Expression Is a Biomarker of Aging". *Journal of Clinical Investigation* 114(9): 1299-1307.
- Kroemer, Guido, Lorenzo Galluzzi, y Catherine Brenner. 2007. "Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death". *Physiological Reviews* 87(1): 99-163.
- Kubota N., Terauchi Y., Yamauchi T., Kubota T., Moroi M., Matsui J., Eto K., Yamashita T., Kamon J., Satoh H., Yano W., Froguel P., Nagai R., Kimura S., Kadowaki T., and Noda T. 2002. "Disruption of Adiponectin Causes Insulin Resistance and Neointimal Formation." Issue of July 19, 25863-25866.
- Labbadia, John, y Richard I. Morimoto. 2014. "Proteostasis and longevity: when does aging really begin?" *F1000Prime Reports* 6. <http://f1000.com/prime/reports/b/6/7/> (el 16 de enero de 2023).
- Laron, Zvi. 2008. "The GH-IGF1 axis and longevity. The paradigm of IGF1 deficiency". *HORMONES* 7(1): 24-27.

- Le Bourg, E. 2018. “Does Calorie Restriction in Primates Increase Lifespan?” Revisiting Studies on Macaques (*Macaca mulatta*) and Mouse Lemurs (*Microcebus murinus*). *Bioessays*, 40, e1800111.
- Lewis, Gary F., y Patricia L. Brubaker. 2021. “The Discovery of Insulin Revisited: Lessons for the Modern Era”. *Journal of Clinical Investigation* 131(1): e142239.
- Li, Chen et al. 2017. “Nuclear AMPK Regulated CARM1 Stabilization Impacts Autophagy in Aged Heart”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 486(2): 398–405.
- Liochev, Stefan I. 2013. “Reactive Oxygen Species and the Free Radical Theory of Aging”. *Free Radical Biology and Medicine* 60: 1–4.
- Longuet C, Sinclair EM, Maida A, Baggio LL, Maziarz M, Charron MJ & Drucker DJ. 2008. “The Glucagon Receptor Is Required for the Adaptive Metabolic Response to Fasting.” *Cell Metabolism* 8, 359-371.
- López-Otín C., Blasco MA., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. 2013. *Cell*:1194-217.
- López Gómez-Carreño V. 2016. Adaptaciones metabólicas y fisiológicas de la combinación de una restricción calórica moderada y un tratamiento central con leptina en el hígado de ratas Wistar de mediana edad. Tesis doctoral. España.
- Solon-Biet, Samantha M. et al. 2015. “Dietary Protein to Carbohydrate Ratio and Caloric Restriction: Comparing Metabolic Outcomes in Mice”. *Cell Reports* 11(10): 1529–34.
- Lucio, RA., Tlacli-López, JL., Eguibar, JR. Y Agmo, A. 2013. “Sperm count and sperm motility decrease in old rats.” *Physiology and Behavior*. 100-11:73-79.
- Luo L, Chen H, Zirkin BR. 2001. “Leydig cell aging: steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cholesterol side-chain cleavage enzyme.” *J Androl*; 22:149–56.
- Luo, L.; Chen, H.; Trush, M.A.; Show, M.D.; Anway, M.D.; Zirkin, B.R. 2006 “Aging and the brown Norway rat leydig cell antioxidant defense system.” *J. Androl.* 27, 240–247.
- Madeo, Frank, Didac Carmona-Gutierrez, Sebastian J. Hofer, y Guido Kroemer. 2019. “Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential”. *Cell Metabolism* 29(3): 592–610.
- Marchal, J.; Perret, M.; Aujard, F. 2012. “La restriction calorique chez les primates. Caloric restriction in primates: How efficient as an anti-aging approach.” *Med. Sci.*, 28, 1081–1086.
- Mariotti S, Franceschi C, Cossarizza A, Pinchera A. 1995. “The aging thyroid.” *Endocr Rev.*; 16:686.
- Martin B., Mattson M., Maudsley S. 2006 “Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging”. *Ageing Res. Rev.* 5: 332-353.
- Martínez, Gabriela et al. 2017. “Endoplasmic Reticulum Proteostasis Impairment in Aging”. *Aging Cell* 16(4): 615–23.
- Martínez-Mota, L, Cruz-Martínez, J.J, Márquez-Baltazar, S, Fernández-Guasti, A. 2008. “Estrogens

participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats.” *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 88:332– 340.

Matsuzawa Y. 2006. “Definition and history of metabolic syndrome.” *Nihon Rinsho*; 28;64 Suppl 9:9-12.

Mattison, Julie A. et al. 2017. “Caloric Restriction Improves Health and Survival of Rhesus Monkeys”. *Nature Communications* 8(1): 14063.

Mair, William, y Andrew Dillin. 2008. “Aging and Survival: The Genetics of Life Span Extension by Dietary Restriction”. *Annual Review of Biochemistry* 77(1): 727–54.

Meites, J. 2012. “Neuroendocrinología del envejecimiento.” Springer Science & Business Media.

Medvedik, Oliver, Dudley W Lamming, Keyman D Kim, y David A Sinclair. 2007. “MSN2 and MSN4 Link Calorie Restriction and TOR to Sirtuin-Mediated Lifespan Extension in *Saccharomyces Cerevisiae*” ed. Andy Dillin. *PLoS Biology* 5(10): e261.

McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. 1935. “The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size.” *Nutrition* 5:155-171.

Medina, DL, Di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., Ballabio, A. 2015. “La señalización de calcio lisosomal regula la autofagia a través de calcineurina y TFEB.” *Nature Cell Biology*, 17 (3), 288–299. 10.1038/ncb3114.

Meijer, AJ, Lorin, S., Blommaert, EF y Codogno, P. 2015. “Regulación de la autofagia por aminoácidos y transducción de señales dependiente de MTOR.” *Aminoácidos*, 47 (10), 2037– 2063.

Mercken, Evi M. et al. 2013. “Calorie Restriction in Humans Inhibits the PI 3 K / AKT Pathway and Induces a Younger Transcription Profile”. *Aging Cell* 12(4): 645–51.

Messier, C., & Gagnon, M. 2000. “Glucose regulation and brain aging. *The journal of nutrition, health & aging*,” 4(4), 208–213.

Mitchell BD. Hsueh WC. King TM. Pollin TI. Sorkin J. Agarwala R. Schäffer AA. Shuldiner AR. 2001. “Heritability of life span in the Old Order Amish.” *Am J Med Genet*, 102:346-352.

Mitchell SJ, Madrigal-Matute J, Scheibye-Knudsen M, Fang E, Aon M, González-Reyes JA, et al. 2016. “Efectos del sexo, la tensión y la ingesta de energía sobre las características del envejecimiento en ratones.” *Metab. Celular*, junio; 23 :1093–1112.

Moatt, Joshua P., Shinichi Nakagawa, Malgorzata Lagisz, y Craig A. Walling. 2016. “The Effect of Dietary Restriction on Reproduction: A Meta-Analytic Perspective”. *BMC Evolutionary Biology* 16(1): 199.

Moralí, G.; Asunción Pía Soto, M.; Luis Contreras, J.; Arteaga, M.; González-Vidal, M.D.; Beyer, C. 2003. “Detailed analysis of the male copulatory motor pattern in mammals: Hormonal bases.” *Scand. J. Psychol.*, 44, 279–288.

- Morley, John E. 2015. "Peptides and Aging: Their Role in Anorexia and Memory". *Peptides* 72: 112–18.
- Morselli, E et al. 2010. "Caloric Restriction and Resveratrol Promote Longevity through the Sirtuin-1-Dependent Induction of Autophagy". *Cell Death & Disease* 1(1): e10–e10.
- Mueller, A.; Hermo, L. 1998. "Robaire, B. The effects of aging on the expression of glutathione S-transferases in the testis and epididymis of the Brown Norway rat." *J. Androl.*, 19, 450–465.
- Nedeltcheva A, Kilkus J, Imperial J, Schoeller D, Penev P. 2010. "Insufficient sleep undermines dietary efforts to reduce adiposity." *Ann Intern Med*; 153(7):435–441.
- Ng, F. y Tang, BL 2013. "La modulación de la autofagia de las sirtuinas." *Revista de fisiología celular*, 228 (12), 2262–2270. 10.1002/jcp.24399.
- Nicolosi A, Laumann EO, Glasser DB, Moreira ED Jr, Paik A, Gingell C 2004. "Sexual behavior and sexual dysfunctions after age 40: the global study of sexual attitudes and behaviors." *Urology*; 64:991–7.
- Niedernhofer, LJ., Kirkland, JL., Ladiges, W. 2017. "Molecular pathology endpoints useful for aging studies." *Ageing Res Rev.* May;35:241-249. doi: 10.1016/j.arr.2016.09.012.
- Nieschlag, E. 2020. "Late-onset Hypogonadism: A Concept Comes of Age". *Andrology* 8(6): 1506–11.
- Nofzinger E, Buysse D, Miewald J. 2002. "Human regional cerebral glucose metabolism during non-rapid eye movement sleep in relation to waking." *Brain*; 125:1105– 15.
- Nui S. Chen J. Duan f. Song Q. Qin M. Zhenshan W., Lui J. 2014. "Possible mechanism underlying the effect of heshouwuyin, a tonifying kidney herb. On sperm quality in aging rats." *Complementary & Alternative medicine*. 14:250.
- Obradovic, Milan et al. 2021. "Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication". *Frontiers in Endocrinology* 12: 585887.
- Olive, Michelle et al. 2010. "Cardiovascular Pathology in Hutchinson-Gilford Progeria: Correlation with the Vascular Pathology of Aging". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30(11): 2301–9.
- Oliveira, E.C.; Leonelli, C.; Pereira, O.; Bittencourt, J.C.; Carvalho, H.F. 2019. "Estrogen imprinting compromises male sexual behavior and affects the number of androgen-receptor- expressing hypothalamic neurons†". *Biol. Reprod.*, 100, 737–744.
- OMS (2015). Organización Mundial de la Salud. Evaluation of certain food contaminants. WHO Technical Report. Series 930. World Health Organization, Geneva.
- Ortega-Ferrusola C., Macías García B., Gallardo-Bolaños JM, González-Fernández L., Rodríguez

- Martinez H., Tapia JA, Peña FJ. 2009. “Los marcadores apoptóticos pueden usarse para pronosticar la congelabilidad de los espermatozoides de semental.” *Animación reprod. ciencia* 114 , 393–403.
- Page, M.M., Robb, E.L., Salway, K.D., and Stuart, J.A. 2010. “Mitochondrial redox metabolism: Aging, longevity, and dietary effects.” *Mech. Ageing Dev.* 131, 242–252.
- Pak, Heidi H. et al. 2021. “Fasting Drives the Metabolic, Molecular and Geroprotective Effects of a Calorie-Restricted Diet in Mice”. *Nature Metabolism* 3(10): 1327–41.
- Pardo A. G. 2003. “Consideraciones generales sobre algunas de las teorías del envejecimiento.” *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1).
- Pardo, Joaquín et al. 2018. “IGF-I Gene Therapy in Aging Rats Modulates Hippocampal Genes Relevant to Memory Function” ed. Rafael de Cabo. *The Journals of Gerontology: Series A* 73(4): 459–67.
- Pardo, Joaquín et al. 2016. “Insulin-like Growth Factor-I Gene Therapy Increases Hippocampal Neurogenesis, Astrocyte Branching and Improves Spatial Memory in Female Aging Rats” ed. Thomas Klausberger. *European Journal of Neuroscience* 44(4): 2120–28.
- Pareek, Tej K., Ayesha R. Joshi, Amartya Sanyal, y Rajan R. Dighe. 2007. “Insights into Male Germ Cell Apoptosis Due to Depletion of Gonadotropins Caused by GnRH Antagonists”. *Apoptosis* 12(6): 1085–1100.
- Park, Chan Bae, y Nils-Göran Larsson. 2011. “Mitochondrial DNA Mutations in Disease and Aging”. *Journal of Cell Biology* 193(5): 809–18.
- Pascual-Mathey, L.I.; Rodríguez Romero, S.; Becerra Lara, P.; Manzo, J.; Hernández, M.E. 2015. “Effect of the induction of moderate hyperprolactinemia on sexual behavior in Wistar male rats.” *J. Behav. Health Soc. Issues*, 7, 9–17.
- Pasqualetti, Sara, Federica Braga, y Mauro Panteghini. 2017. “Pre-Analytical and Analytical Aspects Affecting Clinical Reliability of Plasma Glucose Results”. *Clinical Biochemistry* 50(10–11): 587–94.
- Peterson, Timothy R. et al. 2009. “DEPTOR Is an MTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival”. *Cell* 137(5): 873–86.
- Pifferi, F.; Aujard, F. 2019. “Caloric restriction, longevity and aging: Recent contributions from human and non-human primate studies.” *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2019, 95, 109702.
- Popov, Lucia-Doina. 2020. “Mitochondrial Biogenesis: An Update”. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24(9): 4892–99.
- Qiu, Y.; Yang, H.; Li, C.; Xu, C. 2020. “Progress in Research on Sperm DNA Fragmentation.” *Med. Sci. Monit.*, 26, e918746.
- Quirós Cognuck, S.; Reis, W.L.; Silva, M.; Debarba, L.K.; Mecawi, A.S.; de Paula, F.; Rodrigues Franci, C.; Elias, L.; AntunesRodrigues, J. 2020. “Sex differences in body composition metabolism-

related hormones, and energy homeostasis during aging in Wistar rats.” *Physiol. Rep.*, 8, e14597.

Rhoads, Timothy W., y Rozalyn M. Anderson. 2022. “Caloric Restriction Has a New Player”. *Science* 375(6581): 620–21.

Rico-Rosillo, M. G., Oliva-Rico, D., & Vega-Robledo, G. B. 2018. “Envejecimiento: algunas teorías y consideraciones genéticas, epigenéticas y ambientales.” *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 56(3), 287-294.

Rodgers, Robert L. 2022. “Glucagon, Cyclic AMP, and Hepatic Glucose Mobilization: A Half-century of Uncertainty”. *Physiological Reports* 10(9).

Rogina, Blanka, y Stephen L. Helfand. 2004. “Sir2 Mediates Longevity in the Fly through a Pathway Related to Calorie Restriction”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(45): 15998–3.

Roth GS, Ingram DK, Lane MA. 2001. “Caloric restriction in primates and relevance to humans.” *Acad Sci.* 928:305-315.

Ruan, Linhao et al. 2020. “Mitochondria-Associated Proteostasis”. *Annual Review of Biophysics* 49: 41–67.

Sáez-Freire, M. del M., Blanco-Gómez, A., Castillo-Lluva, S., Gómez-Vecino, A., Galvis-Jiménez, J.M., Martín-Seisdedos, C., Isidoro-García, M., Hontecillas-Prieto, L., García-Cenador, M.B., García-Criado, F.J., et al. 2018. “The biological age linked to oxidative stress modifies breast cancer aggressiveness.” *Free Radic. Biol. Med.* 120, 133–146.

Sahm, Arne et al. 2021. “Increased Longevity Due to Sexual Activity in Mole-Rats Is Associated with Transcriptional Changes in the HPA Stress Axis”. *eLife* 10: e57843.

Sanchez HL., Silva LB., Portiansky EL., Herenu CB., GoyaRG., Zucolilli GO. 2008. “Domaminergic mesencephalic systemsand behavioral performance in very old rats.” *Neuroscience* 154:1598-606.

Santiago, Joana et al. 2019. “Testicular Aging: An Overview of Ultrastructural, Cellular, and Molecular Alterations”. *The Journals of Gerontology: Series A* 74(6): 860–71.

Sasako, Takayoshi, y Kohjiro Ueki. 2016. “[Insulin/IGF-1 signaling and aging]”. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine* 74(9): 1435–40.

Sanzana G. 2009. “tratamiento de la diabetes en el paciente mayor.” *Rev.med.clin. condes*20, 635-638.

Sastre, Juan, Federico V. Pallardó, José García de la Asunción, y José Viña. 2000. “Mitochondria, Oxidative Stress and Aging”. *Free Radical Research* 32(3): 189–98.

Satoh, Akiko et al. 2013. “Sirt1 Extends Life Span and Delays Aging in Mice through the Regulation of Nk2 Homeobox 1 in the DMH and LH”. *Cell Metabolism* 18(3): 416–30.

Saxton RA & Sabatini DM. 2017. “Señalización mTOR en crecimiento, metabolismo y enfermedad.”

Célula. Marzo; 168 :960–976.

Schmeer et al. 2019. “Dissecting Aging and Senescence—Current Concepts and Open Lessons”. *Cells* 8(11): 1446.

Sengupta P. 2013. “The laboratory Rat. Relating it Age with Humans.” *Int.j Prev Med.* 6:624-630.

Shaha C. 2008. “Apoptosis de células germinales: relevancia para la infertilidad y la anticoncepción.” *inmunol. Endoc. metab. Agentes Med. química* 8, 66–78.

Sah, Cem et al. 2013. “Effects of Long-Term Administration of the Antiaging Hormone Dehydroepiandrosterone Sulfate on Rat Prostates and Testes as Androgen-Dependent Organs”. *Korean Journal of Urology* 54(3): 199.

Shaha, Chandrima, Rakshamani Tripathi, y Durga Prasad Mishra. 2010. “Male Germ Cell Apoptosis: Regulation and Biology”. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365(1546): 1501–15.

Sharp ZD. and Richardson A. 201. “Aging and cancer: can mTOR inhibitors kill two birds with one drug” *Target Oncol.* 6:41-51.

Shortliffe, L.M.; Ye, Y.; Behr, B.; Wang, B. 2014. “Testosterone changes bladder and kidney structure in juvenile male rats.” *J. Urol.*, 191, 1913–1919.

Sies, Helmut, Carsten Berndt, y Dean P. Jones. 2017. “Oxidative Stress”. *Annual Review of Biochemistry* 86(1): 715–48.

Sinclair DA (2005). Toward a theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev.* 126:987-1002.

Sitzmann Brandon D., Brown Donald I., Garyfallou Vasilios T., Kohama Steven G., Mattison Julie A., Ingram Donald K., Roth George S., Ottinger Mary Ann, Urbanski Henryk F. 2014. “Impact of moderate calorie restriction on testicular morphology and endocrine function in adult rhesus macaques (*Macaca mulatta*).” *Age.* 36:183–197.

Sitzmann B D., Leone E H., Mattison J A., Ingram D K., Roth G S., Urbanski H F., Zelinski M B., Ottinger M A. 2010. “Effects of Moderate Calorie Restriction on Testosterone Production and Semen Characteristics in Young Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*).” *Biology of reproduction* 83, 635–640.

Smith E.R., Stefanick M.L., Clark J.T., Davidson J.M. 1992. “Hormones and sexual behavior in relationship to aging in male rats.” *Horm Behav.* 26:110–35.

Smith, Jr, Daniel L., Julie M. McClure, Mirela Matecic, y Jeffrey S. Smith. 2007. “Calorie Restriction Extends the Chronological Lifespan of *Saccharomyces Cerevisiae* Independently of the Sirtuins”. *Aging Cell* 6(5): 649–62.

- Smith, Erica D et al. 2008. “Age- and Calorie-Independent Life Span Extension from Dietary Restriction by Bacterial Deprivation in *Caenorhabditis Elegans*”. *BMC Developmental Biology* 8(1): 49.
- Solis A. J. 2006. Acción de la insulina en el músculo esquelético de la rata Wistar: Efecto del envejecimiento, la restricción calórica y la leptina en la rata Wistar. Tesis doctoral. España,
- Sofikitis, Nikolaos et al. 2008. “Hormonal Regulation of Spermatogenesis and Spermogenesis”. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 109(3–5): 323–30.
- Solon-Biet S.M., Mitchell S.J., de Cabo R., Raubenheimer D., Le Couteur D.G., Simpson S.J. 2015. “Macronutrients and caloric intake in health and longevity.” *J Endocrinol.* 226:17-28.
- Sonntag, W. E. et al. 1999. “Pleiotropic Effects of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 on Biological Aging: Inferences From Moderate Caloric-Restricted Animals”. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 54(12): B521–38.
- Soto, Claudio. 2003. “Unfolding the Role of Protein Misfolding in Neurodegenerative Diseases”. *Nature Reviews Neuroscience* 4(1): 49–60.
- Speakman J.R and Mitchell S.E. 2011. “Caloric Restriction. *Molecular Aspects of medicine*”; 32:3;159-221.
- Steinkraus, Katherine A. et al. 2008. “Dietary Restriction Suppresses Proteotoxicity and Enhances Longevity by an Hsf-1-Dependent Mechanism in *Caenorhabditis Elegans*”. *Aging Cell* 7(3): 394–404.
- Spiegel K, Tasali E, Leproult R, Van Cauter E. 2009. “Effects of poor and short sleep on glucose metabolism and obesity risk.” *Nat Rev Endocrinol*; 5(5):253–261.
- Suji, George, y S. Sivakami. 2004. “Glucose, Glycation and Aging”. *Biogerontology* 5(6): 365–73.
- Sun, Jiayi et al. 2021. “Caloric Restriction in Female Reproduction: Is It Beneficial or Detrimental?” *Reproductive Biology and Endocrinology* 19(1): 1.
- Sun, Xiaolong, y Tony D. James. 2015. “Glucose Sensing in Supramolecular Chemistry”. *Chemical Reviews* 115(15): 8001–37.
- Syntin P and Robaire B. 2001. “Sperm structural and motility changes during aging in the Brown Norway rat.” *Journal Andrology* 22: 235-244.
- Tabibzadeh, Siamak. 2021. “Signaling Pathways and Effectors of Aging”. *Frontiers in Bioscience* 26(1): 50–96.
- Tam, BT. and Siu, PM. 2014. “Respuestas celulares autofágicas al ejercicio físico en el músculo esquelético.” *Sports Medicine* (Auckland, Nueva Zelanda) , 44 (5), 625–640. 10.1007/s40279-013-0140-z.
- Tang, Qi Qun, y M. Daniel Lane. 2012. “Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte”. *Annual Review of Biochemistry* 81(1): 715–36.
- Taormina, Giusi et al. 2019. “Longevity: Lesson from Model Organisms”. *Genes* 10(7): 518.

- Tena-Sempere, M., and Barreiro, M.L. 2015. "Leptin in male reproduction: the testis paradigm." *Mol. Cell. Endocrinol.* 188, 9–13.
- Tesarik, J. et al. 2002. "In-Vitro Effects of FSH and Testosterone Withdrawal on Caspase Activation and DNA Fragmentation in Different Cell Types of Human Seminiferous Epithelium". *Human Reproduction* 17(7): 1811–19.
- Tissenbaum, Heidi A., y Leonard Guarente. 2001. "Increased Dosage of a Sir-2 Gene Extends Lifespan in Caenorhabditis Elegans". *Nature* 410(6825): 227–30.
- Tran, Duc et al. 2014. "Insulin-like Growth Factor-1 Regulates the SIRT 1-p53 Pathway in Cellular Senescence". *Aging Cell* 13(4): 669–78.
- Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquín M, Sticker M. et al. 2004. "La ausencia de S6K1 protege contra la obesidad inducida por la edad y la dieta al tiempo que mejora la sensibilidad a la insulina." *Naturaleza*. 9 de septiembre de; 431 :200–205.
- Uriondo, H. Álvarez, S.C. Gil, M.V. Frazer, P. Serna, J. Nodar, F. 2011. "Niveles de correlación entre la externalización de fosfatidilserina y apoptosis espermática en pacientes con infertilidad masculina" *Reproducción*, 26, 3.
- Van Cauter E, Polonsky K, Scheen AJ. 1997. "Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation." *Endocr Rev*; 18(5):716–738.
- van den Beld, Annewieke W et al. 2018. "The Physiology of Endocrine Systems with Ageing". *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 6(8): 647–58.
- van Deursen, Jan M. 2014. "The Role of Senescent Cells in Ageing". *Nature* 509(7501): 439–46.
- Vendramini V, Cedenho A.P, Miraglia S.M, Spaine, D.M. 2014. "Reproductive function of the male obese Zucker rats: Alteration in sperm production and sperm DNA damage." *Reprod. Sci.* 21, 221–229.
- Walker, Lauren et al. 2015. "Neuropathologically Mixed Alzheimer's and Lewy Body Disease: Burden of Pathological Protein Aggregates Differs between Clinical Phenotypes". *Acta Neuropathologica* 129(5): 729–48.
- Wanders D., Plaisance EP., Judd RL. 2010 "Pharmacological effects of lipid-lowering drugs on circulating adipokines." *World J Diabetes* September 15;1(4):116-128.
- Wang, Yijie et al. 2019. "An Overview of Sirtuins as Potential Therapeutic Target: Structure, Function and Modulators". *European Journal of Medicinal Chemistry* 161: 48–77.
- Watson, K. and Baar, K. 2014. "mTOR y los beneficios para la salud del ejercicio." *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36,130–139. 10.1016/j.semcd.2014.08.013.
- Weichhart, Thomas. 2018. "MTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review". *Gerontology* 64(2): 127–34.

- Weindruch R, Walford RL 1988. “The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction Springfield, IL” *Charles C Thomas*: 436.
- Weindruch, Richard, y Rajindar S. Sohal. 1997. “Caloric Intake and Aging” eds. Jeffrey S. Flier y Lisa H. Underhill. *New England Journal of Medicine* 337(14): 986–94.
- Weng, S.-L. 2002. “Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm”. *Molecular Human Reproduction* 8(11): 984–91.
- Wei, Min et al. 2008. “Life Span Extension by Calorie Restriction Depends on Rim15 and Transcription Factors Downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9” ed. Stuart K Kim. *PLoS Genetics* 4(1): e13.
- Wong, Shi Q., Anita V. Kumar, Joslyn Mills, y Louis R. Lapierre. 2020. “Autophagy in Aging and Longevity”. *Human Genetics* 139(3): 277–90.
- Wong, Richard, Matthew D W Piper, Eric Blanc, y Linda Partridge. 2008. “Pitfalls of Measuring Feeding Rate in the Fruit Fly *Drosophila Melanogaster*”. *Nature Methods* 5(3): 214–15.
- Wood, R. 1998. “Integration of chemosensory and hormonal input in the male Syrian hamster brain.” *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol 855, olfaction and taste xii: an international symposium p. 362–372, November 1998.
- Wu D, Gore AC. 2009. “Sexual experience changes sex hormones but not hypothalamic steroid hormone receptor expression in young and middleaged male rats.” *Horm Behav*; 56:299–308.
- Wu D, Gore AC. 2010. “Changes in androgen receptor, Estrogen Receptor Alpha, and Sexual Behavior with Aging and Testosterone in Male Rats.” *Horm. Behav* 58:306-316.
- Xiang L. and He G. 2011. Caloric Restriction and Antiaging effects. *Ann Nutr Metab*; 58: 42-48.
- Xu C. Bai B. Fan P. Cai Y. Huang B. Law I. K. Liu L. Xu A. Tung C. Li X. Siu F. M. Che C. M. Vanhoutte P. M. and Wang Y. 2013. “Selective overexpression of human SIRT1 in adipose tissue enhances energy homeostasis and prevents the deterioration of insulin sensitivity with ageing in mice.” *American journal of translational research*, 5(4), 412–426.
- Yang J. Zong X. Wu G. Lin S. Feng Y. Hu J. 2015. “Taurine increases testicular function in aged rats by inhibiting oxidative stress and apoptosis.” *Amino Acids*, 47, 1549–1558.
- Yang L. Licastro D. Cava E. Veronese N. Spelta F. Rizza W. Fontana L. 2016. “La restricción calórica a largo plazo mejora los procesos de control de calidad celular en el músculo esquelético humano.” *Informes de celda*, 14 (3), 422– 428. 10.1016/j.celrep.2015.12.042.
- Yao C. Zhao C. Zhang S. Liu S. 2019. “Effect of Moxibustion on Testosterone Secretion and Apoptosis of Spermatogenic Cells in Aging Rats.” *Evid. -Based Complement. Altern. Med.*, 24, 5186408.
- Yeap, B.B. 2009. “Testosterone and ill-health in aging men.” *Nat. Clin. Pract. Endocrinol Metab.* 5, 113–121.
- Yu, Mengdi et al. 2021. “Key Signaling Pathways in Aging and Potential Interventions for Healthy

Aging”. *Cells* 10(3): 660.

Zeigerer, Anja et al. 2021. “Glucagon’s Metabolic Action in Health and Disease”. *En Comprehensive Physiology* ed. Ronald Terjung. Wiley, 1759–83.

Zhang, Xiaojie et al. 2019. “Verapamil Ameliorates Motor Neuron Degeneration and Improves Lifespan in the SOD1G93A Mouse Model of ALS by Enhancing Autophagic Flux”. *Aging and disease* 10(6): 1159.

Zhang, Yiyang, y Streamson Chua. 2017. “Leptin Function and Regulation”. *En Comprehensive Physiology*, ed. Ronald Terjung. Wiley, 351–69.

Zhao, Xia et al. 2020. “Protective Effect of Metformin against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in Human Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells by Enhancing Autophagy through Activation of AMPK Pathway”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020: 1–14.

Zhou XC. Wei P. Hu ZY. Gao F. Zhou RJ. Liu YX. 2001. “Papel de los genes Fas/FasL en la azoospermia u oligozoospermia inducida por undecanoato de testosterona en monos rhesus.” *Acta Pharmacol. Pecado.* 22, 1028–1033.

Ziegler, D. V., Wiley, C. D., & Velarde, M. C. (2015). Mitochondrial effectors of cellular senescence

Zirkin, Barry R., y Haolin Chen. 2000. “Regulation of Leydig Cell Steroidogenic Function During Aging1”. *Biology of Reproduction* 63(4): 977–81.

Zhu, Junxiong et al. 2020. “Short-term Caloric Restriction Induced Bone Loss in Both Axial and Appendicular Bones by Increasing Adiponectin”. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1474(1): 47–60.



Article

Effect of Chronic Moderate Caloric Restriction on the Reproductive Function in Aged Male Wistar Rats

Pablo López de Jesús ¹, Edith Arenas-Ríos ², Mirna Ruíz-Ramos ³, Juan Carlos Flores-Alonso ⁴, Víctor Manuel Mendoza-Núñez ³, Isabel Arrieta-Cruz ⁵ and Marcela Arteaga-Silva ^{2,*}

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México 09340, Mexico; pldj_89@hotmail.com

² Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico; editharenas2000@yahoo.com.mx

³ Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 09230, Mexico; mirna1411@yahoo.com.mx (M.R.-R.); mendovic@unam.mx (V.M.M.-N.)

⁴ Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Hospital General de Zona No. 5, Puebla 74360, Mexico; flores_alonso_jc@hotmail.com

⁵ Departamento de Investigación Básica, Instituto Nacional de Geriátrica, Secretaría de Salud, Ciudad de México 10200, Mexico; iarrieta@inger.gob.mx

* Correspondence: asm@xanum.uam.mx

Abstract: Caloric restriction (CR) has been shown to be an effective nutritional intervention for increasing longevity in some animal species. The objective of this study was to evaluate CR's effects on metabolic and reproductive parameters in 12-month-old male Wistar rats. The rats were distributed in three groups: control, CR at 15%, and CR at 35% for 6 (up to 18 months of age) and 12 months (up to 24 months of age). At the end of CR treatment, we evaluated reproductive (male sexual behavior (MSB), sperm quality) and biochemical parameters (plasma glucose, glucose-regulating hormone, and sex steroid levels), and quantified annexin V in the seminiferous epithelium. Results showed that MSB and sperm quality were improved after 6 months of CR associated with increases in plasma testosterone and decrease annexin V in the seminiferous epithelium of the testicles compared to their control group. The metabolic profile of the CR rats also improved compared to controls. However, these effects of CR on reproductive parameters were not maintained after 12 months of CR. Findings suggest that beginning CR at the age of maturity reestablishes the behavioral sexual response and reproductive function in older animals after 6 months of CR and improves endocrine functioning during aging.

Keywords: calorie restriction; male sexual behavior; seminiferous tubules; testis; testosterone



Citation: Jesús, P.L.d.; Arenas-Ríos, E.; Ruíz-Ramos, M.; Flores-Alonso, J.C.; Mendoza-Núñez, V.M.; Arrieta-Cruz, I.; Arteaga-Silva, M. Effect of Chronic Moderate Caloric Restriction on the Reproductive Function in Aged Male Wistar Rats. *Nutrients* **2022**, *14*, 1256. <https://doi.org/10.3390/nu14061256>

Academic Editors: Marcellino Monda and Clare Marie Reynolds

Received: 3 January 2022

Accepted: 14 March 2022

Published: 16 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Introduction

Several diseases, such as cancer and cardiovascular, metabolic, and neurodegenerative illnesses, have a common risk factor: aging. This process is characterized for molecular and cellular dysfunction on several levels, for example, telomere attrition, cellular senescence, loss of protein homeostasis, accumulation of damaged mitochondria, epigenetic modifications, increase of pro-inflammatory markers, and decrease in hormone activity [1,2]. All these cellular changes during aging lead to progressive decline of physiological functions in species, including the reproductive system. On the other hand, efforts to reduce the negative impact of aging have incorporated nutritional modifications, such as healthy diet, diet enriched in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, or caloric restriction (CR) [3].

CR refers to reducing the ingestion of calories without detriment to nutrition. It involves decreasing all the nutrients that an individual consumes (proteins, lipids, minerals, carbohydrates), so it affects only energy ingestion and does not compromise the organism's

functioning [4,5]. CR is one of the most widely studied and effective gero-protective interventions in diverse animal models, including *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, and mice [6,7]. CR activates several molecular signaling pathways, such as SIRT1 (member of the sirtuin family), mTOR (mammalian Target of Rapamycin), IGF1 (Insulin-like growth factor I), PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), FOXO3 (forkhead Box O3), and AKT (*protein kinase B*), which are capable of modulating aging and prolonging life in these species [8,9].

Growing evidence suggests that CR has advantages for the lengthening of life and health of primates and humans [10–12]. Indeed, studies have demonstrated that CR can enhance physical condition, reduce body mass index, and improve skin condition and hepatic and renal functions while reducing the risk of cardiovascular disease. It may also participate in maintaining endocrine function and reestablishing sexual behavior [3,5,6,10]. In rodents, some observed effects of CR have been in the immune system by improving the lymphocyte viability and proliferation and increasing the release of anti-inflammatory (IL-10) cytokines and in the cardiometabolic system, where the glucose and lipids profile were ameliorated, and oxidative stress was reduced [13,14]. Interestingly, a recent study that used transcriptomic analysis on rat liver with short-term or mild-to-moderate CR showed mainly seven genes (*Nampt*, *Glul*, *Sult1a1*, *Fmo1*, *Cmtm6*, *Hsp90aa1*, and *Actg1*) that could be relevant for the beneficial effects of CR and might be used as sensitive biomarkers to evaluate the impact of nutritional intervention [15].

Ample evidence indicates that CR is an efficacious nutritional intervention to reduce weight through the modification of adipokines, myokines, and cardiokines in the skeletal muscle and adipose tissues. For example, CR increases leptin and adiponectin secretion and mitochondrial function and improves sensitivity to insulin. Recently studied, the apelin hormone is an adipomyokine that has a protective role in fat, heart, and skeletal muscle tissues, and some studies have tested its relationship with the beneficial effects of CR, observing that apelin secretion is diminished in obese subjects and helps to reduce insulin resistance. In the case of sex steroid hormones, CR has modified the testosterone (T)/estradiol (E₂) ratio as well as anti-inflammatory properties in their target tissues. Furthermore, CR helps to improve reproductive health in mammals [16,17]. Adequate levels of hormones, such as T, E₂, and prolactin (PRL), are necessary for the expression of male sexual behavior (MSB) in mammals, which occurs in response to the presence of a potential sex partner [18]. Performance of MSB requires a series of external and internal factors, such as the circadian or seasonal cycle, temperature, and adequate functioning of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis [18,19], as well as a neural substrate that is capable of receiving and processing external stimuli to initiate the sexual interaction that generates motor responses: mounting, intromission, and ejaculation [20–22]. Any alteration of these hormone levels can inhibit MSB [23–25]. Ample evidence demonstrates that MSB decreases with age in male rats [26,27] by altering the parameters of latency to ejaculation and intromission indices in rats aged 24 months [28], and by producing a deficit in testicular functional [29]. In consequence, reports have verified reductions in the number of spermatozooids and germinal cells. This loss could be related to a decrease in the capacity of the Sertoli cells to sustain the survival and differentiation of those cells or possibly a reduction in the availability of T produced by Leydig cells [30]. Studies in aged rats showed a reduction in the sperm quality and MSB [28]; in the human case, aging produces alterations in sexual desire, erectile function, and sexual activity [29]. This evidence suggests that aging may be a determining factor in the progressive reduction of the male reproductive function.

At present, the beneficial effects of CR on the sexual behavior of rodents have not been clarified because effects both positive and negative have been observed depending on the percentage of reduction of nutrients, the time of exposure to CR, and the age at the onset of CR [31]. For example, male rats in reproductive age subjected to CR at 50% for 4–5 weeks had significant reductions in body weight, deficient MSB performance, and reduced sexual preference for females, all associated with lower T concentrations. In

contrast, rats subjected to CR at 25% did not present any of those alterations [32]. Results of this nature indicate the need to inquire more deeply into the effects of chronic, moderate CR on the execution of MSB in diverse stages of the aging process, so the objective of this study was to determine the long-term effect of chronic moderate CR on the reproductive parameters of older Wistar rats.

1. Materials and Methods

1.1. Animals

A total of 27 male rats of the Wistar strain aged 12 months old were utilized. They were housed individually at the animal care center of the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa and maintained under a 12 h light-dark cycle with lights off at 08:00 a.m., a temperature of 24 ± 1 °C, and ad libitum access to water and food. The animals had access to regular chow during fifteen days before starting CR (Bio-Dieta-Lab DDL-7100 ABENE, Mexico). The net energy obtained for regular chow intake was 117–164 Kcal/d (29.47 ± 3.86 food grams). In the CR groups, the net energy was 95–104 Kcal/d (23.33 ± 0.81 food grams) for 15% of CR and 77–87 Kcal/d (19.33 ± 0.81) for 35% of CR (Bro-matological analysis was performed by Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Universidad Nacional Autónoma de México). All handling and experimental procedures complied with international regulations (NIH, 2011) and Mexico's Official Standard (NOM-062-ZOO-1999, reviewed in 2001) for the use and care of laboratory animals.

1.2. Experimental Design

Figure 1 shows the temporal sequence of the experiments conducted. Fifteen days before beginning, the animals were housed individually to allow daily ad libitum quantification of food intake. The animals were then subjected to two CR groups: 15% and 35% CR according to their daily food intake. The animals with CR were fed once a day at 09:00 a.m., and food was available until depletion. The experimental procedure began when the animals reached 12 months old (basal, time 0) with three groups: control (food ad libitum), CR at 15%, and CR at 35% during 6 or 12 months of CR. The study of survival was carried out with all 27 animals; however, due to the death of some animals during the study from age complications, the final number of animals per group was maintained to six animals at the end of the study by adding new rats with similar experimental conditions. The rats that survived to the end of the protocol were subjected to the following reproductive and biochemical tests: MSB, sperm quality, and levels of sex hormones and hormones with metabolic activity. The animals were fasted and sacrificed at the end of the experiment, and blood and tissue samples were obtained and stored for further analysis.

1.3. Body Weight during Caloric Restriction and Survival

The body weight of all rats in the three study groups was recorded daily throughout the nutritional intervention. To determine survival rates, we recorded the number of rats that died each three months [33].

1.4. Assessment of Sexual Behavior and Sperm Quality

For testing, a male was placed in a plexiglass arena (45 cm in diameter) 5 min before a receptive female rat was introduced as a stimulus. Females of the same strain were rendered sexually receptive by subcutaneous injections of 5 µg/50 µL of estradiol benzoate and 1 mg/100 µL of progesterone (both from Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO, USA), administered 48 and 4 h before testing, respectively. Test duration was 30 min after presenting the female. The sexual behavior tests were performed at 7-day intervals under red lights 3 h after onset of the dark phase. The following parameters were recorded: latencies to first mount, first intromission, first ejaculation, and the number of mounts (with pelvic thrusting) and intromissions (mounts with pelvic thrusting and penile insertion) during the first copulatory series. In addition, ejaculation frequency (number of ejaculations during 30 min of recording) and post-ejaculatory intervals (time between ejaculation and

subsequent intromission) were registered. The hit rate was the ratio between the number of intromissions and the number of mounts + intromissions (for a detailed description of the MSB parameters in 14). To evaluate the sperm parameters, spermatozooids were obtained from the cauda of the epididymis by perfusion with 1 mL of PBS, and then, 10- μ L aliquots were taken to determine motility and vitality values. For the parameter of sperm concentration, dilutions corresponding to WHO guidelines were performed and adequately modified for rats [34]. DNA fragmentation analysis was performed following the previously reported methodology [35], adjusting the incubation time in the alkaline lysis buffer to 90 min.

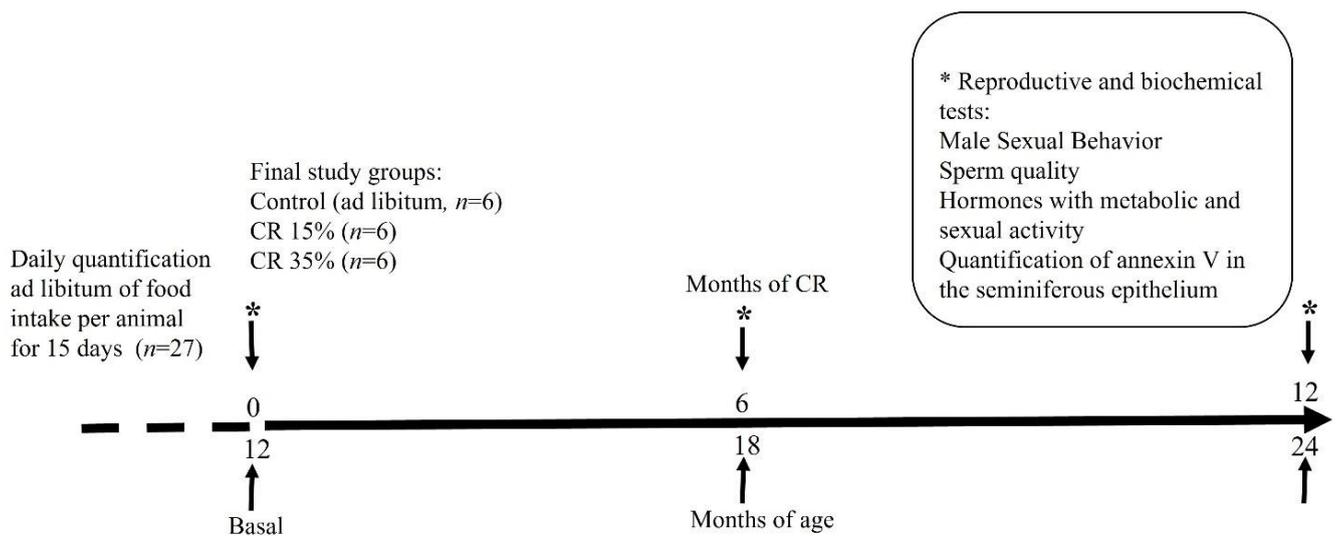


Figure 1. Timeline of the experimental design. Food intake ad libitum per animal was recorded for 15 days before CR (discontinuous line). The experiment began when the rats reached 12 months old (basal 0) with three groups: control (food ad libitum), CR at 15%, and CR at 35% ($n = 6$ for each group, final study). Reproductive and biochemical tests were performed (*) at baseline and 6 and 12 months of CR.

1.5. Determination of Plasma Glucose and Hormone Levels

All the rats were anesthetized with ketamine (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), administered intraperitoneally in order to obtain blood samples by cardiac puncture. Each sample was placed in a tube with serum-separator gel (REF 36815, BD Vacutainer SST, México). Serum was recovered by centrifugation (3000 rpm, 15 min). Glucose levels were measured by the glucose oxidase method in a Merck Vitalab Eclipse autoanalyzer (Merck, Dieren, The Netherlands). The commercial ELISA kit (DRG International Inc., NJ, USA) was utilized to determine the sex hormones: testosterone (EIA-1559), estradiol (EIA-2693), and prolactin (EIA-1291). For the other hormones, namely insulin (80-INSRT-E01), glucagon (48-GLUHU-E01), leptin (22-LEPMS-E01), and adiponectin (22-ADPRT-E01), a different commercial ELISA kit was used (Alpco, Bensheim, Germany). Each serum sample was assayed in duplicate and read at 450 nm in a Multiskan™ GO Thermo Scientific multiplate spectrophotometer (Waltham, MA, USA).

1.6. Testicular Apoptosis Analysis

The rats were infused by intra-cardiac procedure with 4% paraformaldehyde, and the testes processed for embedding in paraffin. Tissue sections were obtained with a Leica RM2155 microtome at a thickness of 5 μ m. Detection of annexin V was performed using an Alexa fluor™ 488 Annexin V/Dead cell Apoptosis kit (Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, USA). Histological analyses were carried out using an epifluorescence microscope equipped with an Axio Observer 2 Apotome V2-coupled structured lighting system (Carl Zeiss, Germany). A total of 20 transverse sections of the seminiferous tubules

were analyzed per animal by the annexin V technique described previously [36]. The area of the seminiferous epithelium was determined by subtracting the internal area from the external area using a ZEN black image-analyzing system (Karl Zeiss, Germany).

1.7. Statistical Analyses

Results are presented as mean \pm SE. The survival analysis was performed with the Kaplan–Meier test. Data on body weight, MSB, sperm quality parameters, T, E₂, prolactin, and serum metabolic markers were analyzed using two-way analysis of variance tests (ANOVA) followed by Tukey's with the GraphPad Prism 8.0 statistical program (La Jolla, CA, USA). The criterion for statistical significance was $p < 0.05$.

2. Results

2.1. Body Weight during Caloric Restriction and Survival

After 6 and 12 months of CR 15% and CR 35%, the rats quickly lost weight, and a significant reduction was shown compared to control groups ($p < 0.01$), and there was also a significant increase in the control group compared to the basal value ($p < 0.05$, Table 1).

Table 1. Effect of CR on body weight in aged male Wistar rats.

	Basal	6 Months after CR			12 Months after CR		
		Control	CR 15%	CR 35%	Control	CR 15%	CR 35%
Body Weight	541.6 \pm 6.7	640.2 \pm 10.6 #	447.0 \pm 19.6 *	437.7 \pm 7.2 *	630.3 \pm 15.3 #	443.2 \pm 15.3 *	446.7 \pm 17.0 *

The values obtained show mean \pm SE body weight in rats with CR at 15% and 35% for 6 and 12 months of CR. * Indicates significant differences between the 15% and 35% CR groups vs. the control group, $p < 0.01$; # Indicates significant differences between the control groups after 6 and 12 months of CR vs. the basal value, $p < 0.05$.

The evaluation of survival showed 100% of the rats in the CR 15% and 35% groups remained alive after 6 months. At 9 months, 50% of the rats in the control group had survived compared to 100% and 80%, respectively, for the CR 15% and 35% groups. After 12 months of CR, survival in the control group remained at 50% and 75% of survival in both CR 15% and 35% groups (Figure 2).

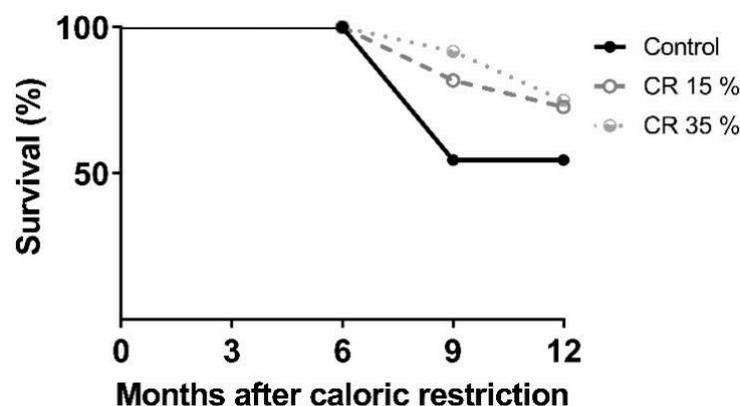


Figure 2. Effect of CR on survival in aged male Wistar rats. The values obtained show percentage of survival of the rats with CR at 15% or 35% for 6 and 12 months of CR.

2.2. Assessment of Sexual Behavior and Sperm Quality

At baseline, all rats displayed MSB. Six months after CR, 100% still performed MSB compared to the CR groups after 12 months, when only 33% showed this behavior (two of six). Interestingly, at 24 months old, none of the rats in the control group performed MSB.

With respect to the parameters of MSB, findings show that the mount latency, number of mounts, and intromission latency decreased significantly at 6 months of CR in the 15% and 35% groups compared to the control group ($p < 0.01$, Table 2). The number of ejaculations and the hit rate are parameters that showed an adequate execution of the MSB; these parameters showed a significant increase compared to control group ($p < 0.01$, Table 2). In the control group, we observed a significant increase in the parameters of MSB recorded when compared to the basal values ($p < 0.01$, Table 2).

Table 2. Effect of CR on MSB in aged male Wistar rats.

	Basal	After 6 Months of CR		
		Control	CR 15%	CR 35%
Mount latency (s)	56.5 ± 7.37	200.0 ± 47.70 #	83.0 ± 55.33 *	40.83 ± 7.50 *
Number of mounts	3.4 ± 0.77	5.5 ± 1.25	4.16 ± 1.35 *	3.16 ± 0.47 *
Intromission latency (s)	73.6 ± 52.5	142.5 ± 62.08 #	78.0 ± 56.5 *	67.5 ± 28.03 *
Number of intromissions	8.5 ± 0.43	14.5 ± 1.89 #	17.8 ± 2.44 #	14.0 ± 1.61 #
Ejaculation latency (s)	521.0 ± 145.0	624.0 ± 235.0	738.0 ± 165 #	638.0 ± 98.0
Post-ejaculatory interval (s)	443.3 ± 103.4	414.8 ± 155.4	670.8 ± 203.6	442.0 ± 48.13
Number of ejaculations	2.3 ± 0.2	1.0 ± 0.0 #	2.0 ± 1.0	3.0 ± 1.0 * 0.82 ± 0.25 *
Hit rate	0.77 ± 0.26	0.67 ± 0.007 #	0.79 ± 0.033 *	

The values obtained show mean ±SE ($n = 6$ per group) for the copulatory parameter of rats with CR at 15% or 35% for 6 months. * Indicates significant differences between the 15% and 35% CR groups vs. the control group, $p < 0.01$; # Indicates significant differences between the control, 15% and 35% CR groups vs. the basal value, $p < 0.01$.

2.3. Sperm Quality

For the parameter of sperm motility, age significantly reduced this parameter in all groups ($p < 0.01$), reaching the lowest values up to 12 months of CR. In the CR 15% and 35% groups after 6 and 12 months of CR, a significant increase was observed when compared to the control group ($p < 0.01$, Table 3). This same fact was observed when compared with the basal value ($p < 0.05$, Table 3).

Table 3. Effect of CR on sperm quality in aged male Wistar rats.

	Basal	After 6 Months of CR			After 12 Months of CR		
		Control	CR 15%	CR 35%	Control	CR 15%	CR 35%
Motility (%)	64.0 ± 0.9	43.8 ± 0.9	50.0 ± 2.0 **	56.6 ± 0.8 **	25.3 ± 2.0 #	40.2 ± 0.4 **	43.0 ± 2.5 **
Viability (%)	89.0 ± 2.1	80.3 ± 0.9	81.1 ± 1.6	86.0 ± 1.6	44.1 ± 4.7 #	50.8 ± 6.9 #	55.0 ± 8.4 #
Sperm count (10^6 /mL)	245.0 ± 16.9	220.0 ± 16.6	257.0 ± 8.3	245.0 ± 12.7	148.2 ± 6.2 #	218.0 ± 15.2 *	178.0 ± 9.0 *
Fragmentation (%)	96.4 ± 0.3	97.0 ± 0.4	97.0 ± 0.3	97.0 ± 0.2	96.0 ± 0.3	96.0 ± 0.2	96.0 ± 0.3

The values obtained show mean ±SE ($n = 6$ per group) for the parameters of sperm quality for rats with CR at 15% and 35% for 6 and 12 months. * Indicates significant differences between the 15% and 35% CR groups vs. the control group, $p < 0.01$; # Indicates significant differences between the 15% and 35% CR groups vs. the basal value, $p < 0.05$.

Regarding vitality and sperm count, after 12 months of CR, a significant decrease was observed in all groups when compared to the basal values ($p < 0.01$, Table 3), and no differences were observed between CR groups 15% and 35% when compared to the control group for vitality but not for sperm count ($p < 0.05$, Table 3). It is important to remark that

the fragmentation was not affected due to age or by CR regarding basal values ($p < 0.05$, Table 3).

2.4. Metabolic Parameters

CR modified the concentrations of the hormones that participate in the metabolism after 6 and 12 months of CR at 15% and 35% and thus yielded a significant reduction of plasma in glucose, leptin, insulin, glucagon, and estradiol levels compared to the control groups ($p < 0.01$, Table 4). Measurements of plasma T levels showed a significant increase in both CR 15% and 35 groups ($p < 0.01$, Table 4). Note that the 6- and 12-month control groups had significant increases of plasma insulin and estradiol levels and decreased plasma testosterone levels compared with the basal values ($p < 0.01$, Table 4).

Table 4. Effect of CR on metabolic parameters in aged male Wistar rats.

	Basal	After 6 Months of CR			After 12 Months of CR		
		Control	CR 15%	CR 35%	Control	CR 15%	CR 35%
Glucose (mmol/L)	8.87 ± 0.52	11.88 ± 0.42	6.17 ± 1.23 *	5.72 ± 1.12 *	11.90 ± 0.92	6.07 ± 1.22 *	5.22 ± 0.99 *
Leptin (pg/mL)	2680.0 ± 398.0	3004.0 ± 341.0	773.0 ± 114.0 *	481.0 ± 87.0 *	1427.0 ± 119	466.0 ± 559.0 *	336.0 ± 67.0 *
Adiponectin (ng/mL)	12.18 ± 0.23	12.60 ± 0.80	13.80 ± 0.69	12.30 ± 0.20	10.80 ± 0.18	12.27 ± 0.75	11.60 ± 1.08
Insulin (ng/mL)	0.719 ± 0.11	1.52 ± 0.16	0.532 ± 0.79 *	0.559 ± 0.075 *	4.371 ± 0.56 #	0.513 ± 0.12 *	0.650 ± 0.58 *
Glucagon (pg/mL)	199.0 ± 22.0	237.0 ± 55.0	56.0 ± 8.9 #	63.0 ± 7.1 #	161.0 ± 16.0	74.0 ± 11.0 #	36.0 ± 6.3 #
Testosterone (ng/mL)	1.95 ± 0.04	0.57 ± 0.03 #	1.75 ± 0.14 *	2.10 ± 0.15 *	0.17 ± 0.02 #	1.47 ± 0.07 *	1.17 ± 0.08 *
Estradiol (pg/mL)	1.68 ± 0.03	1.99 ± 0.05 #	1.80 ± 0.03	1.78 ± 0.04 *	1.96 ± 0.06 #	1.76 ± 0.03 *	0.174 ± 0.04 *
Prolactin (pg/mL)	65.0 ± 1.56	80.0 ± 5.07	69.0 ± 4.60	71.0 ± 6.01	92.0 ± 13.16 #	65.0 ± 3.75	66.0 ± 3.63

The values obtained show mean ± SE ($n = 6$ per group) for the metabolic and sexual hormones of animals with CR at 15% and 35% for 6 and 12 months. * Indicates significant differences between the 15% and 35% CR groups vs. the control group, $p < 0.01$; # Indicates significant differences between the 15% and 35% CR groups vs. the basal value, $p < 0.01$.

Regarding plasma prolactin levels, a significant increase was only observed in the control group after 12 months of experimentation ($p < 0.01$, Table 4).

2.5. Testicular Apoptosis Measured by Annexin V Assay in Seminiferous Tubules

The area of the seminiferous tubules was affected in the control group, but observations showed that after 6 and 12 months of CR, the CR 15% and CR 35% groups conserved this area with respect to the basal value. Interestingly, the area of the seminiferous tubules decreased 1.2-fold at 6 months and 2.3-fold at 12 months in the control group compared to the CR groups ($p < 0.01$, Figure 3A). In the case of annexin V, no changes were seen in the CR 15% or 35% groups after 6 or 12 months of CR with respect to the basal value, but in the control group, the fluorescence intensity of annexin V increased significantly at 6 and 12 months ($p < 0.01$, Figure 3B).

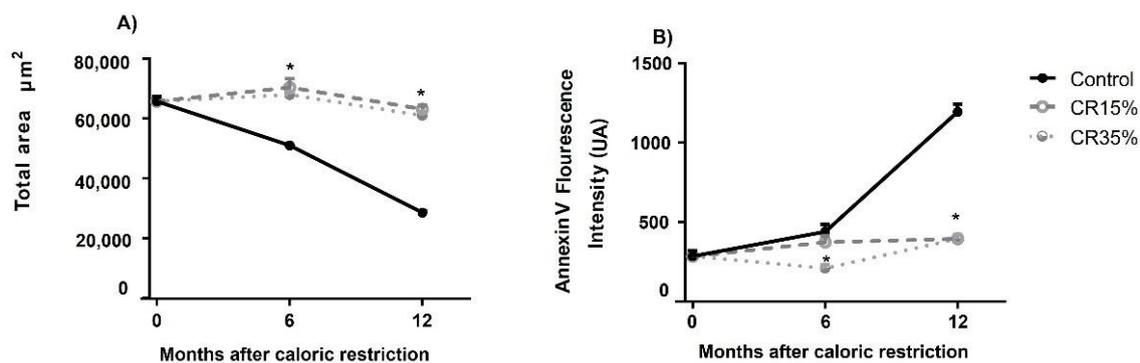


Figure 3. Effect of CR on the total area and apoptosis of testicular tubules in aged male Wistar rats. The values obtained show mean \pm SE of the total area of the seminiferous epithelium tubules (A) and the fluorescence intensity of the protein annexin V as a pre-apoptotic marker in seminiferous epithelium tubules (B) in rats with CR at 15% and 35% for 6 and 12 months of CR. * Indicates significant differences between the CR 15% and 35% vs. the control group, $p < 0.01$.

3. Discussion

Our results reveal the benefits of chronic and moderate CR during the aging process in rodents by (i) increasing life expectancy and (ii) maintaining the body weight of the restricted aged rats. Overall, the metabolic profile of the CR rats provides a broad panorama of the energy activity, expenditure, and storage for the correct functioning of individuals [37]. Our findings showed that glucose, insulin, and leptin levels decreased in aged rats subjected to CR for 6 or 12 months. In contrast, these variables were increased in the control rats. These findings confirm and extend previously published, similar experimental paradigms in rodents showing that long-term CR maintains glucose tolerance, improving the secretion of insulin and leptin to prolong well-being during aging. This finding is important because it has been reported that as animals age, glucose levels remain high due to alterations in insulin and glucagon concentrations since the aging process is marked by a deterioration in α and β pancreatic cells [38], increased visceral adiposity, and reduced physical activity, among other phenomena [37,39]. With respect to adiponectin, plasma levels remained constant up to 12 months of CR, suggesting correct glucose metabolism, similar to previously reported [39].

After 12 months of CR, we observed that T concentrations in the rats were similar to those of young adult animals aged 3 months as has been previously published [40]. This effect could be due to the beneficial effects of CR through improved cellular functioning that activates physiological pathways for hormonal secretion from the HPG axis. Our data are supported by previous report [32], where Wistar rats under CR maintained their T levels. This also occurred in experiments with *Macaca mulata* subjected to CR at 30%, where improved functionality of the HPG axis and stable T levels were found compared to a control group [41]. This indicates that aromatase activity is necessary for the aromatization of T to E_2 , which increases its concentration during the aging process [42]. In contrast, E_2 levels in the control group were increased, likely due to high aromatase activity in animals with greater body weight [42]. In other hand, prolactin has been reported to participate in controlling masculine behavior [20], and also, an increase in its levels can inhibit MSB during aging [23,43]. Our results demonstrate that during aging, the control rats presented a significant increase in prolactin levels as has been previously reported [26].

Based in our understanding in the field, the main contribution of these findings consists in demonstrating that chronic and moderate CR during aging prolongs the reproductive function in aged rats. This fact is support by several studies that have demonstrated the existence of a direct correlation between T concentrations and MSB such that a deficit of T affects MSB even in young adult animals [30,32,44,45]. However, correct performance of MSB requires the synergic activity of T and E_2 because an increase continued may generate feminization of the brain and increase latencies during MSB tests [46]. Our study

found that control rats presented increased E_2 accompanied by extended latencies on MSB tests. These results demonstrate a partial inactivation of MSB during aging in control rats. Significantly, CR can prevent this process because reduced E_2 concentrations and improved some parameters of MSB after 6 months of CR in aged rats.

Studies with rats have shown that latencies in mount, intromission, ejaculation, and post-ejaculatory interval are increased after 11 months old, and these latencies are more prolonged at 24 months, when ejaculations decrease [26,28]. Our study found that at 18 months old, the control rats presented an increase in ejaculation latency. These observations allow us to affirm that MSB during aging could be improved after 6 months of CR at 15% and 35%. These observations are supported by a previous report [32], which found that young rats with CR at 25% had enhanced MSB due to reduced intromission and ejaculation latencies.

We observed that sperm motility decreased in the control group after 18 months old, but it was observed in the CR animals. This suggests better cellular functioning that may result from the concentrations of T. Studies with *Macaca mulata* using CR at 30% showed that sperm motility and vitality remained stable as well as T levels [41,47]. These results strengthen our data on sperm motility and vitality, which remained optimal for the CR groups up to 18 months old. However, aging leads to a decrease in sperm vitality even with CR at 24 months old.

Analyses of DNA fragmentation in the sperm are still in an exploratory stage, so the specific mechanism involved has not been clarified [48]. However, it is well known that obesity and aging potentiate this process due to an increase of reactive oxygen species (ROS) [49,50]. In the present study, we did not observe DNA fragmentation in the sperm even under CR treatment.

In another aspect, the increase in apoptosis associated with aging is responsible for the deterioration of testicular functions [51,52]. In this study, we found that the aged rats in the control group showed reduced T levels in the area of the seminiferous tubules with an increase in testicular apoptosis after 18 months old. These data concur with the report earlier [53]; this study found an increase in testicular apoptosis between 12 and 24 months old in rats. The correlation of the expression of annexin V with apoptotic markers in the sperm of men aged over 40 years old has been previously reported [54]. Furthermore, the increase in those markers was found to be directly proportional to the age of the patients [55–57]. Another study analyzed sperm apoptosis based on the externalization of serine phosphatidyl, quantified by annexin V, which was increased in men aged over 40 years old [58]. Our CR rats at 15% and 35% did not show changes in testicular apoptosis; however, in the control group, an increase in annexin V was observed.

4. Conclusions

The present study demonstrates the beneficial effects of chronic and moderate CR for 6 months on MSB in aged rats. This benefit is dependent on maintaining the animals' metabolic and hormonal profile. We can, therefore, affirm that CR is an efficacious strategy to prolong certain processes related to reproductive health.

Author Contributions: Study design and conceptualization, P.L.d.J., E.A.-R., J.C.F.-A., I.A.-C. and M.A.-S.; methodology, P.L.d.J., E.A.-R., M.R.-R., V.M.M.-N., J.C.F.-A., I.A.-C. and M.A.-S.; data analysis, P.L.d.J., E.A.-R., J.C.F.-A., I.A.-C. and M.A.-S.; writing—original draft preparation, P.L.d.J., E.A.-R., I.A.-C. and M.A.-S.; writing—review and editing, P.L.d.J., E.A.-R., M.R.-R., V.M.M.-N., J.C.F.-A., I.A.-C. and M.A.-S.; project administration, M.A.-S.; funding acquisition, M.R.-R., V.M.M.-N., J.C.F.-A., I.A.-C. and M.A.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa to project number: CD.CBS.535.2018 and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) on behalf of Pablo López de Jesús for his graduate studies (Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, CVU number: 718777).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of the NIH, Mexico's Official Standard (NOM-062-ZOO-1999, reviewed in 2001) for the use and care of laboratory animals, and the Academics Ethics Commission, DCBS. UAM-Iztapalapa (project number: CD.CBS.535.2018, approved on 31 January 2019).

Acknowledgments: We acknowledge to UMADI, DCBS, UAM-Iztapalapa, and BIOINVERT for providing the animals and food for this study. Thanks to Zavala-Arteaga J.M. for his help to improve the English in this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Sierra, F.; Caspi, A.; Fortinsky, R.H.; Haynes, L.; Lithgow, G.J.; Moffitt, T.E.; Olshansky, S.J.; Perry, D.; Verdin, E.; Kuchel, G.A. Moving geroscience from the bench to clinical care and health policy. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2021**, *69*, 2455–2463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- López-Otín, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **2013**, *153*, 1194–1217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ribarič, S. Diet and aging. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2012**, *2012*, 741468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- McCay, C.M.; Maynard, L.A.; Sperling, G.; Barnes, L.L. Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories. *J. Nutr.* **1939**, *18*, 1–13. [[CrossRef](#)]
- Pifferi, F.; Aujard, F. Caloric restriction, longevity and aging: Recent contributions from human and non-human primate studies. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2019**, *95*, 109702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Weindruch, R.; Sohal, R.S. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N. Engl. J. Med.* **1997**, *337*, 986–994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Belsky, D.W.; Huffman, K.M.; Pieper, C.F.; Shalev, I.; Kraus, W.E.; Anderson, R. Change in the rate of biological aging in response to caloric restriction: Calorie biobank analysis. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2018**, *73*, 4–10. [[CrossRef](#)]
- Fontana, L.; Partridge, L. Promoting health and longevity through diet: From model organisms to humans. *Cell* **2015**, *161*, 106–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Niedernhofer, L.J.; Kirkland, J.L.; Ladiges, W. Molecular pathology endpoints useful for aging studies. *Ageing Res. Rev.* **2017**, *35*, 241–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kemnitz, J.W. Calorie restriction and aging in nonhuman primates. *ILAR J.* **2011**, *52*, 66–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Marchal, J.; Perret, M.; Aujard, F. La restriction calorique chez les primates. Caloric restriction in primates: How efficient as an anti-aging approach? *Med. Sci.* **2012**, *28*, 1081–1086. [[CrossRef](#)]
- Le Bourg, E. Does Calorie Restriction in Primates Increase Lifespan? Revisiting Studies on Macaques (*Macaca mulatta*) and Mouse Lemurs (*Microcebus murinus*). *Bioessays* **2018**, *40*, e1800111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hajializadeh, Z.; Khaksari, M.; Najafipour, H.; Sanjari, M.; Mahani, F.D.; Raji-Amirhasani, A. Substitution of calorie restriction for protective effects of estrogen on cardiometabolic risk factors and oxidative stress in obese postmenopausal rat model. *Life Sci.* **2022**, *294*, 120367. [[CrossRef](#)]
- Chakraborty, A.; Banerjee, S.; Mukherjee, B.; Poddar, M.K.; Ali, N. Calorie restriction modulates neuro-immune system differently in young and aged rats. *Int. Immunopharmacol.* **2021**, *100*, 108141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Saito, K.; Ito, M.; Chiba, T.; Jia, H.; Kato, H. A Comparison of Gene Expression Profiles of Rat Tissues after Mild and Short-Term Calorie Restrictions. *Nutrients* **2021**, *13*, 2277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Senesi, P.; Luzi, L.; Terruzzi, I. Adipokines, Myokines, and Cardiokines: The Role of Nutritional Interventions. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8372. [[CrossRef](#)]
- Vasancelos, A.R.; Cabral-Costa, J.V.; Mazucanti, C.H.; Scavone, C.; Kawamoto, E.M. The Role of Steroid Hormones in the Modulation of Neuroinflammation by Dietary Interventions. *Front. Endocrinol.* **2016**, *7*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jennings, K.J.; de Lecea, L. Neural and Hormonal Control of Sexual Behavior. *Endocrinology* **2020**, *161*, bqaa150. [[CrossRef](#)]
- Hull, E.M.; Dominguez, J.M. Sexual behavior in male rodents. *Horm. Behav.* **2007**, *52*, 45–55. [[CrossRef](#)]
- Pascual-Mathey, L.I.; Rodríguez Romero, S.; Becerra Lara, P.; Manzo, J.; Hernández, M.E. Effect of the induction of moderate hyperprolactinemia on sexual behavior in Wistar male rats. *J. Behav. Health Soc. Issues* **2015**, *7*, 9–17. [[CrossRef](#)]
- Moralí, G.; Asunción Pía Soto, M.; Luis Contreras, J.; Arteaga, M.; González-Vidal, M.D.; Beyer, C. Detailed analysis of the male copulatory motor pattern in mammals: Hormonal bases. *Scand. J. Psychol.* **2003**, *44*, 279–288. [[CrossRef](#)]
- Bonilla-Jaime, H.; Vázquez-Palacios, G.; Arteaga-Silva, M.; Retana-Márquez, S. Hormonal responses to different sexually related conditions in male rats. *Horm. Behav.* **2006**, *49*, 376–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Corona, G.; Isidori, A.M.; Aversa, A.; Burnett, A.L.; Maggi, M. Endocrinologic Control of Men's Sexual Desire and Arousal/Erection. *J. Sex. Med.* **2016**, *13*, 317–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kahn, B.E.; Brannigan, R.E. Obesity and male infertility. *Curr. Opin. Urol.* **2017**, *27*, 441–445. [[CrossRef](#)]
- Khodamoradi, K.; Parmar, M.; Khosravizadeh, Z.; Kuchakulla, M.; Manoharan, M.; Arora, H. The role of leptin and obesity on male infertility. *Curr. Opin. Urol.* **2020**, *30*, 334–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Smith, E.R.; Stefanick, M.L.; Clark, J.T.; Davidson, J.M. Hormones and sexual behavior in relationship to aging in male rats. *Horm. Behav.* **1992**, *26*, 110–135. [[CrossRef](#)]

27. Wu, D.; Gore, A.C. Changes in androgen receptor, estrogen receptor alpha, and sexual behavior with aging and testosterone in male rats. *Horm. Behav.* **2010**, *58*, 306–316. [[CrossRef](#)]
28. Lucio, R.A.; Tlachi-López, J.L.; Eguibar, J.R.; Ágmo, A. Sperm count and sperm motility decrease in old rats. *Physiol. Behav.* **2013**, *110*, 73–79. [[CrossRef](#)]
29. Bhasin, S.; Valderrábano, R.J.; Gagliano-Jucá, T. Age-Related Changes in the Male Reproductive System. In *Endotext*. [Internet]; Feing, K.R., Anwalt, B., Boyce, A., Chrousos, J., de Herder, W.W., Dhatariya, K., Dungan, K., Hershman, J.M., Hofland, J., Kalra, S., et al., Eds.; MDText.com, Inc.: Hanover, MA, USA, 2022. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278998> (accessed on 10 December 2021).
30. Chen, H.; Hardy, M.P.; Zirkin, B.R. Age-Related Decreases in Leydig Cell Testosterone Production Are Not Restored by Exposure to LH in Vitro. *Endocrinology* **2004**, *143*, 1637–1642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Anderson, R.M.; Shanmuganayagam, D.; Weindruch, R. Caloric restriction and aging: Studies in mice and monkeys. *Toxicol. Pathol.* **2009**, *37*, 47–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Govic, A.; Levay, E.A.; Hazi, A.; Penman, J.; Kent, S.; Paolini, A.G. Alterations in male sexual behaviour, attractiveness and testosterone levels induced by an adult-onset calorie restriction regimen. *Behav. Brain Res.* **2008**, *190*, 140–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Quirós Cognuck, S.; Reis, W.L.; Silva, M.; Debarba, L.K.; Mecawi, A.S.; de Paula, F.; Rodrigues Franci, C.; Elias, L.; Antunes-Rodrigues, J. Sex differences in body composition, metabolism-related hormones, and energy homeostasis during aging in Wistar rats. *Physiol. Rep.* **2020**, *8*, e14597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hernández-Rodríguez, J.; Arenas-Ríos, E.; Jiménez-Morales, I.; Cortés-Barberena, E.; Montes, S.; Viguera-Villaseñor, R.M.; Arteaga-Silva, M. Postnatal cadmium administration affects the presence and distribution of carbohydrates in the sperm membrane during maturation in the epididymis in adult Wistar rats. *Reprod. Fertil. Dev.* **2021**, *33*, 349–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Simon, L.; Carrell, D.T. Sperm DNA damage measured by comet assay. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *927*, 137–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Moghadam, M.T.; Hosseini, G.; Absalan, F.; Tabar, M.H.; Nikbakht, R. Effects of Vitamin D on Apoptosis and Quality of Sperm in Asthenozoospermia. *JBRA Assist. Reprod.* **2020**, *24*, 316–323. [[CrossRef](#)]
37. Azzu, V.; Valencak, T.G. Energy Metabolism and Ageing in the Mouse: A Mini-Review. *Gerontology* **2017**, *63*, 327–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Chang, A.M.; Halter, J.B. Aging and insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2003**, *284*, E7–E12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Gulcelik, N.E.; Halil, M.; Ariogul, S.; Usman, A. Adipocytokines and aging: Adiponectin and leptin. *Minerva Endocrinol.* **2013**, *38*, 203–210.
40. Shortliffe, L.M.; Ye, Y.; Behr, B.; Wang, B. Testosterone changes bladder and kidney structure in juvenile male rats. *J. Urol.* **2014**, *191*, 1913–1919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sitzmann, B.D.; Brown, D.I.; Garyfallou, V.T.; Kohama, S.G.; Mattison, J.A.; Ingram, D.K.; Roth, G.S.; Ottinger, M.A.; Urbanski, H.F. Impact of moderate calorie restriction on testicular morphology and endocrine function in adult rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Age* **2014**, *36*, 183–197. [[CrossRef](#)]
42. Brooks, D.C.; Coon, V.J.S.; Ercan, C.M.; Xu, X.; Dong, H.; Levine, J.E.; Bulun, S.E.; Zhao, H. Brain Aromatase and the Regulation of Sexual Activity in Male Mice. *Endocrinology* **2020**, *161*, bqaa137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Salas-López, H.; Agustín-Pavón, C.; Lanuza, E.; Martínez-García, F. The maternal hormone in the male brain: Sexually dimorphic distribution of prolactin signalling in the mouse brain. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0208960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Yeap, B.B. Testosterone and ill-health in aging men. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2009**, *5*, 113–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Rana, M.M.; Shiozawa, K.; Mukai, K.; Takayanagi, K.; Eguchi, K.; Sultana, H.; Ohsaki, Y.; Komai, M.; Shirakawa, H. S-allyl Cysteine Enhances Testosterone Production in Mice and Mouse Testis-Derived I-10. *Molecules* **2021**, *26*, 1697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Oliveira, E.C.; Leonelli, C.; Pereira, O.; Bittencourt, J.C.; Carvalho, H.F. Estrogen imprinting compromises male sexual behavior and affects the number of androgen-receptor-expressing hypothalamic neurons†. *Biol. Reprod.* **2019**, *100*, 737–744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Sitzmann, B.D.; Leone, E.H.; Mattison, J.A.; Ingram, D.K.; Roth, G.S.; Urbanski, H.F.; Zelinski, M.B.; Ottinger, M.A. Effects of moderate calorie restriction on testosterone production and semen characteristics in young rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Biol. Reprod.* **2010**, *83*, 635–640. [[CrossRef](#)]
48. Qiu, Y.; Yang, H.; Li, C.; Xu, C. Progress in Research on Sperm DNA Fragmentation. *Med. Sci. Monit.* **2020**, *26*, e918746. [[CrossRef](#)]
49. Vendramini, V.; Cedenho, A.P.; Miraglia, S.M.; Spaine, D.M. Reproductive function of the male obese Zucker rats: Alteration in sperm production and sperm DNA damage. *Reprod. Sci.* **2014**, *21*, 221–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Esteves, S.C.; Agarwal, A.; Cho CLMajzoub, A. A Strengths-Weaknesses-Opportunities-Threats (SWOT) analysis on the clinical utility of sperm DNA fragmentation testing in specific male infertility scenarios. *Transl. Androl. Urol.* **2017**, *6*, S734–S760. [[CrossRef](#)]
51. Yang, J.; Zong, X.; Wu, G.; Lin, S.; Feng, Y.; Hu, J. Taurine increases testicular function in aged rats by inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Amino Acids* **2015**, *47*, 1549–1558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Jeremy, M.; Gurusubramanian, G.; Roy, V.K. Vitamin D3 regulates apoptosis and proliferation in the testis of D-galactose-induced aged rat model. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Yao, C.; Zhao, C.; Zhang, S.; Liu, S. Effect of Moxibustion on Testosterone Secretion and Apoptosis of Spermatogenic Cells in Aging Rats. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2019**, *24*, 5186408. [[CrossRef](#)]
54. Uriondo, H.; Álvarez, S.C.; Gil, M.V.; Frazer, P.; Serna, J.; Nodar, F. Niveles de correlación entre la externalización de fosfatidilserina y apoptosis espermática en pacientes con infertilidad masculina. *Reproducción* **2011**, *26*, 3.
55. Mueller, A.; Hermo, L.; Robaire, B. The effects of aging on the expression of glutathione S-transferases in the testis and epididymis of the Brown Norway rat. *J. Androl.* **1998**, *19*, 450–465. [[PubMed](#)]
56. Sastre, J.; Pallardó, F.V.; García de la Asunción, J.; Viña, J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic. Res.* **2000**, *32*, 189–198. [[CrossRef](#)]
57. Luo, L.; Chen, H.; Trush, M.A.; Show, M.D.; Anway, M.D.; Zirkin, B.R. Aging and the brown Norway rat leydig cell antioxidant defense system. *J. Androl.* **2006**, *27*, 240–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Colin-Valenzuela, A.; Gómez López, N.; Avila Lombardo, R.; Barroso Villa, G. Impacto del envejecimiento masculino en la capacidad funcional del espermatozoide a través de la expresión de fosfatidil serina y oligonucleomas. *Ginecol. Obstet. México* **2010**, *78*, 669–676.