

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**EFFECTO DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO EN EL ESTADO ANTIOXIDANTE  
DEL TESTÍCULO Y EN LA CALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES  
EPIDIDIMARIOS DE LA RATA ADULTA**

## **T E S I S**

Que para obtener el grado de  
**Doctora en Biología Experimental**

**P R E S E N T A**

**Maestra en Biología Experimental Erika Cecilia García Díaz**

**CO-DIRECTORES**

Dra. María del Socorro I. Retana Márquez

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

**ASESORA**

Dra. Edith Arenas Ríos

México, D.F., Octubre de 2015

## COMITÉ TUTORAL

### **Co-directora**

Dra. María del Socorro I. Retana Márquez  
Profesor-Investigador Titular "C"  
Laboratorio de Neuropsicoendocrinología.  
Departamento de Biología de la Reproducción.  
División Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

### **Co-director**

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz  
Profesor-Investigador Titular "C"  
Laboratorio de Fisiología Celular.  
Departamento de Ciencias de la Salud.  
División Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

### **Asesora**

Dra. Edith Arenas Ríos  
Profesor-Investigador Titular "C"  
Laboratorio de Reproducción Animal Asistida.  
Departamento de Biología de la Reproducción.  
División Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I: 308-1) pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT PIFOP-CONACYT-SEP y cuenta con el apoyo del mismo Consejo a través del convenio 309-0, con la clave C/PFPN-2002-35-32.

Para la realización de los estudios de Doctorado la alumna Erika Cecilia García Díaz contó con el apoyo proporcionado por el CONACyT a través de la beca con número de registro 212815.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó la Tesis titulada: "Efecto del estrés agudo y crónico en el estado antioxidante del testículo y en la calidad de los espermatozoides epididimarios de la rata adulta" que presentó Erika Cecilia García Díaz el día 21 de Octubre de 2015.

**Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz**  
Profesor Titular "C"  
Departamento de Ciencias de la Salud  
División Ciencias Biológicas y de la Salud  
Coordinadora Divisional de Posgrado  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Presidenta

**Dra. Gisela Fuentes Mascorro**  
Profesor Titular del Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal  
Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca



Secretaria

**Dra. Edith Arenas Ríos**  
Profesor Titular "C"  
Laboratorio de Reproducción Animal Asistida.  
Departamento de Biología de la Reproducción.  
División Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal

**Dra. Verónica Souza Arroyo**  
Profesor Titular "C"  
Laboratorio de Fisiología Celular  
Departamento de Ciencias de la Salud  
División Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal

EN MEMORIA DE UNA MUJER EXTRAORDINARIA

**MARGARITA DÍAZ MARTÍNEZ**

## RESUMEN

Numerosos informes sugieren que la capacidad reproductiva masculina se ha deteriorado en las últimas seis décadas. Este deterioro puede ser atribuido, en parte, a diversos estresores que pueden causar disminución de la calidad y la cuenta espermática, así como *la libido*, afectando así la salud reproductiva.

Entre las consecuencias del estrés en el sistema reproductor masculino está el aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), que en altas concentraciones se relacionan con la baja calidad de los espermatozoides y con la infertilidad masculina. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar los efectos del estrés agudo y crónico en la respuesta antioxidante del testículo de la rata adulta, así como en la calidad de los espermatozoides de la cauda del epidídimo.

En este estudio se utilizó el modelo de estrés por inmersión en agua fría en ratas, ya que ha mostrado ser un activador eficaz del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) capaz de causar un incremento en las concentraciones plasmáticas de corticosterona, así como un decremento en las de testosterona. Para investigar el efecto del estrés crónico se evaluó el peso corporal y el peso testicular; se estudiaron las concentraciones de la corticosterona y testosterona. Asimismo, se evaluó la producción de ERO, la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx), así como el contenido de las enzimas SOD1, catalasa y GPx-4 y el daño a los lípidos en el testículo. Por último, se evaluó la movilidad, la viabilidad, la cuenta y la morfología espermática.

Los resultados obtenidos muestran que en las ratas sometidas a estrés agudo la corticosterona fue mayor en el tiempo 0 y fue menor a las 6 y 12 horas. La testosterona no se modificó en ninguno de los tiempos estudiados. La producción de ERO fue mayor únicamente a las 6 horas posteriores a la exposición al estresor, mientras que las actividades de las enzimas SOD, catalasa y GPx no se modificaron, tampoco el contenido de las enzimas SOD1, catalasa y GPx-4. La peroxidación lipídica y los parámetros de la calidad espermática no se modificaron.

El estrés crónico causó menor aumento de peso corporal a partir del día 14 y hasta los 50 días de estrés. El peso testicular absoluto fue menor en las ratas estresadas durante 50 días. Las concentraciones de corticosterona fueron elevadas en los días de estrés evaluados, mientras que las concentraciones de testosterona se redujeron. La producción de ERO fue mayor con la exposición al estrés crónico. El contenido de la SOD1 no se modificó, pero la actividad total de la enzima fue menor. El contenido de la catalasa se mantuvo sin cambios durante el estrés crónico y su actividad presentó fluctuaciones, ya que fue mayor a los 20 días de estrés y menor en los animales estresados por 40 y 50 días. Respecto al contenido de la GPx-4, éste fue menor a los 20 días de estrés crónico y la actividad total de la GPx fue menor en los tiempos estudiados de estrés crónico. Por otro lado, las concentraciones de hidroperóxidos lipídicos fueron elevadas con el estrés crónico. En cuanto a la calidad de los espermatozoides, la movilidad total, la viabilidad de los espermatozoides y la cuenta espermática fueron menores, mientras que el porcentaje de los espermatozoides anormales fue mayor en todos los grupos de estrés.

El aumento en la concentración plasmática de corticosterona se correlacionó negativamente con la disminución de la testosterona, con las actividades de la SOD y GPx, y de manera positiva con la generación de ERO y con el daño a los lípidos en los tres tiempos estudiados. Asimismo, la actividad de la catalasa aumentó a los 20 días de estrés y disminuyó a los 50 días. A su vez, la reducción en la concentración sérica de la testosterona se correlacionó negativamente con las anomalías morfológicas y positivamente con la movilidad total, la viabilidad y la cuenta espermática.

Estos resultados indican que durante el estrés agudo existe una regulación del estado redox en los testículos, ya que no se observa ningún efecto perjudicial. Por el contrario, durante el estrés crónico el equilibrio redox se pierde por la disminución de la actividad enzimática, aunque su contenido no haya sido modificado. Es probable que el cambio en las concentraciones hormonales influya en la pérdida del equilibrio del estado redox y repercuta en la calidad espermática.

## **ABSTRACT**

Several reports suggest that male reproductive capacity has steadily deteriorated over the last six decades. This deterioration can be attributed in part to several stressors that cause decrease on count and quality sperm as well as libido, which affects reproductive health.

Among consequences by stress in male reproductive system is the increase of the reactive oxygen species (ROS) production, since high ROS levels are related to low sperm quality and male infertility. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effects of acute and chronic stress on the antioxidant response of the adult rat testis, as well as the quality of sperm obtained from cauda epididymis.

In this study the stress model by cold-water immersion in male rats was used, since it has been proved as an effective activator of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which can cause a significant increase in plasma levels of corticosterone and decrease in testosterone. To investigate the effect of chronic stress, body and testicular weight were assessed; serum levels of testosterone and corticosterone were evaluated. ROS production, superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase (GPx) activities were estimated. SOD1, catalase and GPx-4 content, as well as damage to lipids were measured in testis. Finally, motility, viability, count and morphology sperm were assessed.

The results show that acute stress caused an immediate increase in serum corticosterone levels and decreased at 6 and 12 h. Testosterone levels did not change in any of times studied. ROS production increased 6 h after the exposure to

the stressor, while the activity of the antioxidant enzymes SOD, catalase and GPx did not change, nor the content of SOD1, catalase and GPx-4. Lipid peroxidation did not change and the sperm quality was not affected.

Chronic stress caused less body weight gain from day 14 until day 50 of stress. Absolute testicular weight was lower in stressed rats by 50 days. Corticosterone levels were higher, while testosterone levels reduced. ROS production was higher in chronically stressed males. SOD1 content remained unchanged, but SOD total activity was lower compared with controls. Catalase content did not modify during chronic stress and its activity was greater at day 20 and lower at days 40 and 50. Regarding GPx-4 content, it was less at day 20 of chronic stress and GPx total activity was lower than in controls. Also, the levels of lipid hydroperoxides were elevated with chronic stress. Sperm quality, total motility, viability, and count sperm were lower, while the percentage of sperm abnormalities was higher in all stressed groups.

Corticosterone levels correlated negatively with low testosterone and with SOD and GPx activities. Conversely, corticosterone correlated positively with ROS generation and lipid damage in all periods of chronic stress. Catalase activity had an initial increase at day 20 and then decreased at day 50 of stress. Testosterone levels correlated negatively with the morphological abnormalities in sperm, and positively with total motility, viability and count sperm.

These results show a regulatory mechanism of redox state in testis, which turns on during acute stress, as no adverse effects were observed. Conversely, during chronic stress the redox balance is lost due to the reduction in enzymatic

activity, although its content does not modify. Possibly, changes in hormone levels influence redox state balance, disrupting sperm quality.

## ABREVIATURAS

·OH	Radical hidroxilo
17β-HSD	17 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa
3β-HSD	3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa
A1, A2, A3, A4	Tipos de espermatogonias A
ACTH	Adrenocorticotropina
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
AVP	Arginina-vasopresina
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
CRH	Hormona liberadora de corticotropinas
Cu/Zn o SOD1	Superóxido dismutasa 1
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diclorofluorescina
DE	Desviación estándar
DTT	Ditiotreitol
E	Epinefrina
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
ERO	Especies reactivas del oxígeno
Fe/Mn o SOD 2	Superóxido dismutasa 2
FSH	Hormona estimulante de los folículos
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HHA	Hipotálamo-hipófisis-adrenal
HHT	Hipotálamo-hipófisis-testículo
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
INT	Cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5- fenil tetrazolio
KMnO <sub>4</sub>	Permanganato de potasio
LH	Hormona luteinizante
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
NaCl	Cloruro de sodio
NaCl 0.9%	Solución Salina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NADPH oxidasa/NOX	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidasa
NE	Norepinefrina
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO•	Óxido nítrico
NO• <sub>2</sub>	Radical dióxido de nitrógeno
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Radical superóxido
OONO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Difloruro de polivinilideno
PVN	Núcleo paraventricular

R <sup>•</sup>	Radical lipídico
RO <sup>•</sup>	Radical alcoxilo
ROH	Hidroperoxido lipídico reducido a alcohol
ROO <sup>•</sup>	Radical peroxilo
ROOH	Hidroperóxido lipídico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa
SOD-Ex	Superóxido dismutasa 3
SSA	Sistema simpato-adenomedular
StAR	Proteína de regulación de la esteroidogénesis aguda del transporte del colesterol
TBS	Solución salina tamponada con Tris
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilediamina
XOD	Xantina oxidasa

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1	CONCEPTO DE ESTRÉS .....	3
1.2	RESPUESTA NEUROFISIOLÓGICA DEL ESTRÉS .....	5
1.2.1	<i>Componentes del circuito neuroendocrino de la respuesta de estrés</i> .....	6
1.3	CLASIFICACIÓN DE LOS ESTRESORES .....	8
1.4	SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO .....	10
1.4.1	<i>Esteroidogénesis testicular</i> .....	10
1.4.2	<i>Espermatogénesis</i> .....	12
1.4.3	<i>Eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT). Regulación neuroendocrina de la función testicular</i> .....	15
1.4.4	<i>Maduración espermática en el epidídimo</i> .....	17
1.5	RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDANTE.....	19
1.5.1	<i>Efecto de las especies reactivas del oxígeno en los lípidos</i> .....	22
1.6	EFEECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA GENERACIÓN DE ESTRÉS OXIDANTE	23
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>24</b>
2.1	SISTEMA ANTIOXIDANTE EN LOS TESTÍCULOS, EL EPIDÍDIMO Y EN LOS ESPERMATOZOIDES.....	24
2.1.1	<i>Superóxido dismutasa (SOD)</i> .....	26
2.1.2	<i>Catalasa</i> .....	28
2.1.3	<i>Glutación peroxidasa (GPx)</i> .....	29
2.2	EFEECTO DEL ESTRÉS OXIDANTE EN EL TESTÍCULO, EL EPIDÍDIMO Y EN LOS ESPERMATOZOIDES.....	33
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>

4.1	OBJETIVO GENERAL.....	38
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
4.2.1	<i>Estudiar los efectos del estrés físico/psicológico agudo y crónico en el estado oxidante y en el sistema antioxidante del testículo.....</i>	<i>38</i>
4.2.2	<i>Evaluar el daño oxidante que el estrés genera en el testículo.....</i>	<i>38</i>
4.2.3	<i>Evaluar la activación del eje HHA y su efecto en el eje HHT durante el estrés agudo y crónico.....</i>	<i>38</i>
4.2.4	<i>Determinar la relación entre los efectos del estrés agudo y crónico en el testículo y la calidad de los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo.....</i>	<i>38</i>
4.2.5	<i>Establecer la correlación entre la corticosterona con los diferentes parámetros relacionados con el estrés oxidante.....</i>	<i>38</i>
<b>5</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
6.1	MODELO BIOLÓGICO .....	39
6.2	DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL.....	40
6.3	INDUCCIÓN DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO POR INMERSIÓN EN AGUA FRÍA	
	41	
6.4	REGISTRO DEL PESO CORPORAL.....	42
6.5	OBTENCIÓN DE LOS TESTÍCULOS DE LOS GRUPOS DE TRABAJO.....	42
6.6	DETERMINACIÓN DE CORTICOSTERONA Y TESTOSTERONA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	44
6.6.1	<i>Obtención de las muestras de sangre .....</i>	<i>45</i>
6.6.2	<i>Extracción de las hormonas.....</i>	<i>45</i>
6.6.3	<i>Cuantificación de la corticosterona y la testosterona.....</i>	<i>45</i>
6.7	PRODUCCIÓN DE PERÓXIDOS .....	46
6.8	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	47
6.8.1	<i>Preparación del homogeneizado testicular.....</i>	<i>47</i>
6.8.2	<i>Actividad total de la superóxido dismutasa.....</i>	<i>48</i>

6.8.3	<i>Actividad de la catalasa</i> .....	48
6.8.4	<i>Actividad total de la glutatión peroxidasa</i> .....	49
6.9	INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS SOD1, CATALASA Y GPx-4 POR WESTERN BLOT .....	50
6.9.1	<i>Extracción de las proteínas totales</i> .....	50
6.9.2	<i>Electroforesis de las proteínas totales en geles SDS-PAGE</i> .....	51
6.9.3	<i>Transferencia de las proteínas totales a la membrana de PVDF</i> .....	51
6.9.4	<i>Anticuerpos primarios, secundarios y revelado</i> .....	52
6.10	DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDANTE .....	53
6.10.1	<i>Evaluación de la peroxidación lipídica</i> .....	53
6.11	ANÁLISIS DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.....	54
6.11.1	<i>Obtención de los espermatozoides de la cauda del epidídimo</i> .....	54
6.11.2	<i>Determinación de la movilidad total espermática</i> .....	55
6.11.3	<i>Determinación de la viabilidad espermática</i> .....	55
6.11.4	<i>Determinación de la concentración espermática</i> .....	56
6.11.5	<i>Determinación de la morfología espermática</i> .....	58
6.12	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS TOTALES.....	58
6.13	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	59
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
7.1	SEGUIMIENTO SEMANAL DEL PESO CORPORAL A PARTIR DEL INICIO DEL ESTRÉS CRÓNICO.....	60
7.2	PESO TESTICULAR DESPUÉS DEL ESTRÉS CRÓNICO .....	61
7.3	INFLUENCIA DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO EN LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LA CORTICOSTERONA .....	62
7.4	INFLUENCIA DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO EN LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LA TESTOSTERONA .....	63
7.5	PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN EL TESTÍCULO DESPUÉS DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO .....	64

7.6	ACTIVIDAD TOTAL DE LA SOD Y CONTENIDO DE LA ENZIMA SOD1 EN EL TESTÍCULO DESPUÉS DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO .....	66
7.7	ACTIVIDAD Y CONTENIDO DE LA ENZIMA CATALASA EN EL TESTÍCULO POR EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO .....	67
7.8	ACTIVIDAD TOTAL DE LA GPx Y CONTENIDO DE LA ENZIMA GPx-4 EN EL TESTÍCULO POR EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO .....	68
7.9	GENERACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS POR EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO EN EL TESTÍCULO .....	69
7.10	CALIDAD ESPERMÁTICA DESPUÉS DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO.....	70
7.11	CORRELACIÓN DE LA CORTICOSTERONA CON LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDANTE Y LA TESTOSTERONA.....	71
7.12	CORRELACIÓN ENTRE LA TESTOSTERONA Y LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS.....	72
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>93</b>
<b>10</b>	<b>APÉNDICE I. DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>94</b>
<b>11</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>106</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

Durante la evolución, los organismos desarrollaron una estrategia eficaz para afrontar las situaciones adversas a las que estuvieron sometidos constantemente. A esta estrategia se le conoce como respuesta de estrés, en donde las situaciones desfavorables originan cambios en el sistema neuroendocrino, en la conducta y en el sistema reproductivo, entre otros.

La respuesta de estrés se produce ante una amenaza, real o imaginaria, como un mecanismo que permite al organismo restablecer la homeostasis. Esta respuesta es necesaria y crucial para la supervivencia de los individuos; sin embargo, las situaciones adversas, también conocidas como estresores, pueden comprometer el estado de salud de los mismos. Las consecuencias patológicas que se producen por los estresores en los humanos, así como los mecanismos implicados en la aparición de dichas patologías, no se han determinado con precisión. Por lo tanto, la investigación científica utiliza modelos animales como una herramienta imprescindible para ayudar a dilucidar distintos parámetros conductuales, biológicos, físicos, químicos, bioquímicos, proteómicos y moleculares, relacionados con las alteraciones producidas por los estresores.

A menudo, los estresores aplicados suelen ser físicos, como los choques eléctricos en las patas [Bhattacharya et al. 2001; Uysal et al. 2005], el nado forzado [Mingoti et al. 2003; Saki et al. 2009], la exposición al frío o al calor extremos [Sahin y Gumuslu 2007b; Tsopanakis y Tesserommatis 1991] y la inmovilización [Dong et al.

2004; Nadeem et al. 2006; Sahin y Gumuslu 2007a; Sarumathi y Saravanan 2012]. Sin embargo, es importante considerar que algunas de estas situaciones no siempre se presentan en los humanos, ya que en las sociedades la mayoría de las situaciones estresantes son de origen psicosocial o psicológico. Ya sea que los estresores sean físicos y/o psicológicos, otro factor a considerar es el tiempo de exposición al estresor en relación a los efectos desfavorables que producen. La periodicidad del estresor es una condición elemental al momento de promover una sintomatología propia de cada enfermedad. Considerando estos aspectos, se han desarrollado modelos de estrés físico y/o psicológico en animales [Campos et al. 2013; Caso et al. 2008; Foa et al. 1992], que tratan de imitar estresores que posean validez y mimeticen signos conductuales y biológicos que surgen en las enfermedades relacionadas con el estrés en los humanos.

En esta línea, se utilizó el modelo de inmersión en agua fría en ratas macho, en el que los animales se sometieron a estrés colocándolos en agua a 15 °C durante 15 minutos [Retana-Marquez et al. 2003a; Retana-Marquez et al. 2003b]. En este contexto, existen datos que señalan la importancia de la combinación de estresores de origen físico, como es la temperatura baja del agua y estresores psicológicos, que se relacionan con la imposibilidad de poder escapar. Por lo tanto, la exposición continua de los sujetos al agua fría en este modelo constituye una fuente de estrés crónico, inescapable e incontrolable [Koolhaas et al. 2011].

El trabajo que aquí se presenta, aporta datos que se consideran de interés en la comprensión de los mecanismos biológicos implicados en la respuesta de estrés y

sus consecuencias sobre la fisiología reproductiva de los machos. Este conocimiento podría ser útil para desarrollar estrategias eficaces para reducir el impacto de los efectos del estrés en la salud reproductiva masculina.

## 1.1 CONCEPTO DE ESTRÉS

En el estudio de la fisiología del estrés, Walter Cannon y Hans Selye aportaron ideas y datos clave sobre el concepto y la fisiología de la respuesta de estrés. Cannon se centró en los mecanismos adaptativos del organismo, introduciendo el término “homeostasis” para referirse a los procesos fisiológicos coordinados que operan para mantener constantes la mayoría de los estados del organismo. Para Cannon, existe un equilibrio entre los distintos componentes fisiológicos del individuo y ante las desviaciones del mismo, el organismo pone en marcha una serie de mecanismos homeostáticos compensatorios para restaurar dicho equilibrio y proteger al organismo ante diversas circunstancias adversas. Así, el concepto de estrés fue descrito por vez primera como una reacción de emergencia que ayuda al organismo a movilizar energía para preparar una respuesta de lucha o huida ante una situación de peligro [Cannon 1929]. Cannon enfatizó la importancia del sistema simpático y descubrió que ante un evento estresante la médula adrenal secreta epinefrina (E) y norepinefrina (NE).

Hans Selye se interesó por la problemática del estrés, considerándolo no solo como un proceso fisiológico de adaptación, sino también como un estado que, al prolongarse en el tiempo, puede acabar produciendo enfermedades. Selye con sus experimentos descubrió que ante una situación de estrés la corteza adrenal libera

glucocorticoides a la circulación sanguínea [Selye 1936]. A partir de las contribuciones de Selye, se atribuyó un papel clave a las glándulas adrenales en la respuesta de estrés.

Selye desarrolló el concepto denominado “síndrome general de adaptación”, que dividió en 3 fases. En la primera fase o de reacción de alarma se da una respuesta fisiológica rápida y enérgica ante la amenaza, liberándose E y NE a la circulación sanguínea. En la segunda fase, también llamada de resistencia, si la situación amenazante persiste, el objetivo del organismo es asegurarse de la distribución paulatina de los recursos para que éstos no se agoten y poder seguir haciendo frente a la situación amenazante. En esta fase, la respuesta fisiológica predominante es la liberación de los glucocorticoides al flujo sanguíneo, a la vez que el organismo inhibe los procesos que no son inmediatamente necesarios para la supervivencia. En la tercera fase o estado de agotamiento, se produce cuando el estresor tiene cierta magnitud y se prolonga en el tiempo, perdiéndose la capacidad de adaptación del organismo. Ésta conllevaría a la aparición de enfermedades que Selye denominó como “enfermedades de la adaptación” [Selye 1952].

El estrés se definió originalmente como una respuesta no específica del organismo a cualquier estímulo nocivo. Por lo general, el término estrés suele utilizarse para referirse a la situación en la cual los estímulos estresantes provocan una respuesta del organismo frente a éstos [Sapolsky et al. 2000]. Un estresor es un estímulo que amenaza la homeostasis, es decir, que ejerce un desajuste en el organismo; y la respuesta de estrés, que se produce ante una amenaza como un

mecanismo que permite al organismo restablecer su equilibrio fisiológico [Johnson et al. 1992].

Actualmente, el término estrés se considera como una percepción cognitiva de incontrolabilidad y/o impredecibilidad que se expresa en una respuesta fisiológica y de comportamiento [Koolhaas et al. 2011]. Así, los términos de "estrés" y "estresor" deben limitarse a las condiciones y estímulos donde la previsibilidad y/o la controlabilidad están en juego. La imprevisibilidad se caracteriza por la ausencia de una respuesta anticipada y la pérdida del control se refleja por un retraso en la recuperación de la respuesta y, por la presencia de un perfil típico neuroendocrino. Por lo tanto, es importante no considerar de manera aislada la naturaleza de un estímulo aversivo que pueda llevar a desencadenar una patología; se debe considerar la intensidad del estímulo así como el grado en el que éste puede predecirse y controlarse [Koolhaas et al. 2011; Weiss 1972a; b].

## 1.2 RESPUESTA NEUROFISIOLÓGICA DEL ESTRÉS

En términos generales, cuando el cerebro de un animal percibe un evento como potencialmente peligroso, comienza una serie de cambios, tanto conductuales como neurofisiológicos [Tsigos y Chrousos 1994]. La respuesta neurofisiológica del estrés está enfocada en cubrir las necesidades de un organismo que debe hacer frente a un evento estresante y el principal requerimiento es el energético [McEwen y Stellar 1993]. Cuando un animal ve su vida amenazada, su prioridad es la supervivencia inmediata. Una vez que el cerebro ha recibido la información sensorial, si ésta es evaluada como una situación amenazante o estresante se desencadena

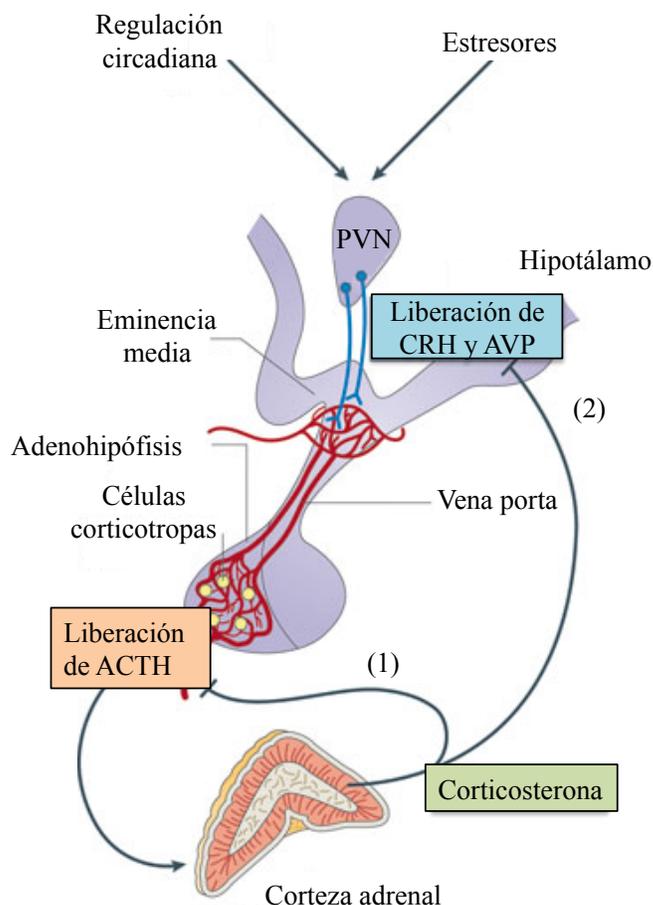
una respuesta neuroquímica, fisiológica y conductual que es modulada por el sistema límbico. La activación de los sistemas noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico cerebrales es crucial en la respuesta de estrés.

### *1.2.1 Componentes del circuito neuroendocrino de la respuesta de estrés*

La respuesta de estrés implica la activación de diversos mecanismos en el sistema nervioso central y en el sistema nervioso periférico. Los componentes centrales se localizan en el hipotálamo y en el tronco del encéfalo e incluyen neuronas parvocelulares, neuronas productoras de arginina vasopresina (AVP) del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, neuronas productoras de la hormona liberadora de corticotropinas (CRH), el locus coeruleus y otros grupos celulares localizados en el bulbo raquídeo y la protuberancia, en su mayoría noradrenérgicos. Los componentes periféricos que participan en la respuesta de estrés incluyen los elementos periféricos del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), las vías eferentes del sistema simpático-adrenomedular y los componentes del sistema parasimpático.

El eje HHA es vital para el desarrollo de la respuesta de estrés a nivel central. Este eje está regulado por la CRH y la AVP. Estos neuropéptidos se secretan hacia los vasos portales donde son transportados hacia la adenohipófisis y promueven la síntesis de proopiomelanocortina para liberar a la circulación los péptidos que de ella se originan, entre ellos la adrenocorticotropina (ACTH) [Feldman 1997]. La AVP no estimula la síntesis de ACTH por sí misma, pero sí presenta una débil actividad sobre su liberación, ya que interacciona con la CRH para potenciar la secreción de ACTH [Antoni 1993]. A pesar de que las neuronas productoras de la CRH expresan también

AVP, la cantidad de AVP que se sintetiza es generalmente baja. Una vez que la ACTH se libera a la circulación periférica, activa la corteza suprarrenal provocando un aumento transitorio de las concentraciones circulantes de glucocorticoides [Andreis et al. 1992], fundamentalmente cortisol en los seres humanos y otros primates o corticosterona en ratas y ratones [Eacker et al. 2008; Vale et al. 1981]; estos corticosteroides llegan a todos los tejidos facilitando la coordinación entre el cerebro y sus efectos a nivel periférico [de Kloet 2005]. La retroalimentación negativa mediada por los glucocorticoides se ejerce a nivel de la hipófisis y del hipotálamo (Figura 1).



**Figura 1.** Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Los principales sitios para el control de realimentación negativa por la corticosterona en plasma son la glándula hipófisis (1) y el centro de liberación de corticotropina hipotalámica (2). ACTH, hormona adrenocorticotrópica; AVP, vasopresina; CRH, hormona liberadora de corticotropinas; PVN, núcleo paraventricular. (Tomada y modificada de [Lightman y Conway-Campbell 2010]).

La activación del eje HHA por períodos cortos es esencial para las funciones vitales de un organismo; sin embargo, la hiperactivación constante de este circuito es desfavorable para el individuo y puede causar diversas patologías [Sapolsky et al. 2000]. Cambios en el estado fisiológico junto con las respuestas del comportamiento, tales como la inhibición de actividad reproductiva, el aumento de la ansiedad y los cambios en la alimentación caracterizan el estado de emergencia [Wingfield et al. 2001]. Cuando un organismo entra en esta etapa, se encienden mecanismos para promover estrategias de supervivencia [McEwen y Stellar 1993]. Por esta razón, los niveles circulantes de glucocorticoides son utilizados como indicadores de estrés [Romero 2004].

### 1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS ESTRESORES

La respuesta de estrés depende de la calidad del estímulo, de la intensidad y la duración, así como de la constitución y el estado del organismo [De wied 1980]. Los estresores pueden ser físicos, psicológicos o metabólicos [Pacak et al. 1998; Tilbrook et al. 2000; Van de Kar y Blair 1999]. Los estresores utilizados en la investigación a menudo son mixtos. El estrés por inmersión en agua fría combina el estrés físico, que causa fatiga muscular, y el estrés psicológico, debido a la pérdida de la esperanza de poder escapar del estresor [Retana-Marquez et al. 2003a; Retana-Marquez et al. 1996].

Los estresores también se clasifican de acuerdo con la duración en agudo y crónico. El estrés agudo produce una respuesta intensa, rápida y a veces violenta. El estrés agudo se limita a los casos en donde existe una exposición única ante una situación estresante y tiene un tiempo de duración desde segundos hasta horas [Pacak et al. 1998]. El estrés crónico se origina por la frecuencia con la que un individuo se expone al estresor. Si la exposición es mayor a seis horas y se extiende a varios días se considera estrés crónico [Retana-Marquez et al. 1998], incluso la exposición al estresor puede ser durante años. La activación crónica del sistema de estrés puede inducir efectos perjudiciales para los organismos, tales como trastornos reproductivos, gastrointestinales, inmunológicos y de conducta [Stratakis y Chrousos 1995].

La respuesta de estrés prolongada representa un estado de estrés crónico causado por el estrés intenso, los individuos estresados se exponen continuamente a los glucocorticoides y E liberados por las glándulas suprarrenales. Así, se considera que la liberación prolongada de glucocorticoides desempeña un papel fundamental en los procesos nocivos para los individuos [Kyrou y Tsigos 2009], ya que se relaciona con el aumento de la susceptibilidad a desarrollar enfermedades cardiovasculares y metabólicas [Bjelakovic et al. 2010; Sapolsky et al. 2000]. El estrés crónico es considerado un factor de riesgo para desarrollar enfermedades crónico-degenerativas [McEwen y Wingfield 2003; Stratakis y Chrousos 1995] e inhibir las funciones reproductivas masculinas de los mamíferos, incluyendo a los humanos [Almeida et al. 2000].

## 1.4 SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO

El sistema reproductor masculino consta de los testículos, el epidídimo, el conducto deferente, las vesículas seminales y la próstata. Los testículos tienen dos funciones bien diferenciadas: (1) en las células de Leydig se sintetizan los andrógenos requeridos para el mantenimiento de las funciones reproductivas masculinas, siendo la testosterona la más importante de estas hormonas [Hu et al. 2008; Payne y Hales 2004] y (2) la producción de espermatozoides en asociación con las células de Sertoli dentro de los túbulos seminíferos [Kerr 1992]. La integración funcional de ambas funciones posibilita la capacidad reproductiva masculina.

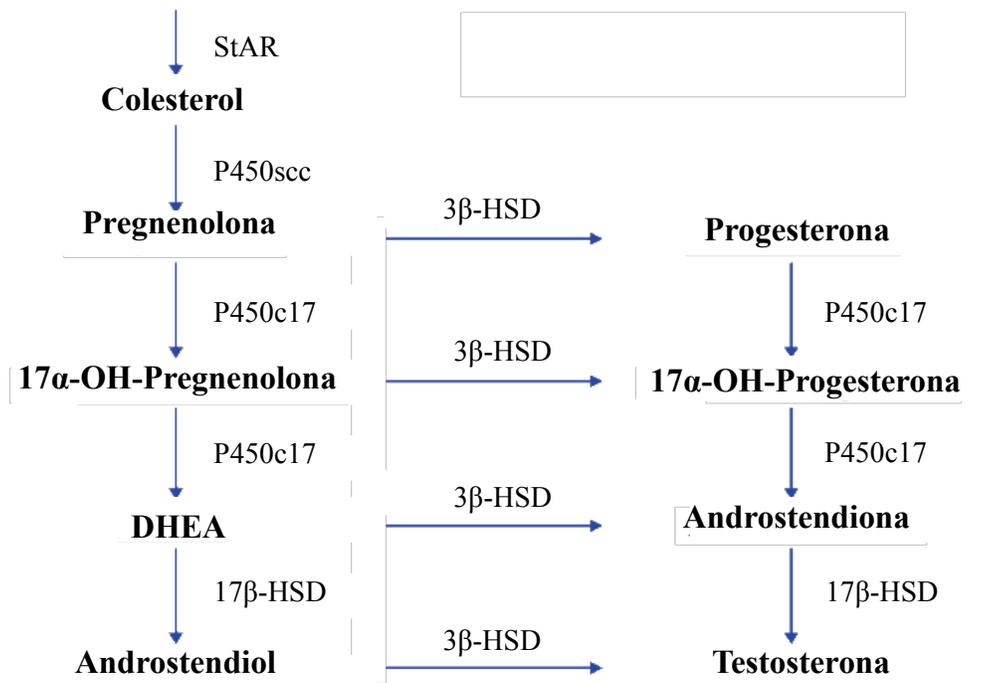
### 1.4.1 Esteroidogénesis testicular

La testosterona y la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona son dos hormonas importantes para el desarrollo del fenotipo masculino, de los caracteres sexuales secundarios y la espermatogénesis, incluyendo la conducta sexual. En el testículo, las células de Leydig sintetizan andrógenos en respuesta a la hormona luteinizante (LH). La síntesis de testosterona se produce a través de dos vías conocidas como  $\Delta^4$  y  $\Delta^5$  [Hu et al. 2010; Sanderson 2006; Wilson 1975] (Figura 2). En los roedores, a diferencia de los humanos, la vía predominante para la síntesis de testosterona es la vía de los  $\Delta^4$ .

La cascada de señalización de la esteroidogénesis se inicia por la unión de la LH a su receptor. Dicha unión activa los receptores acoplados a proteínas G que

estimulan la síntesis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). La acumulación intracelular del AMPc activa la proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila la proteína de regulación de la esteroidogénesis aguda del transporte del colesterol (StAR), que regula la translocación del colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna [Granot et al. 2003; Payne y Hales 2004], donde ocurre la síntesis de pregnenolona por acción de la enzima citocromo P450<sub>scc</sub> (Figura 2).

Esta cascada de transducción de señal no es la única en activarse, ya que el testículo genera una gran variedad de moléculas reguladoras que inducen vías activadoras independientes de AMPc, como es el caso del factor de crecimiento epidermal y el factor de crecimiento similar a la insulina I, que estimulan la expresión de StAR y la síntesis de hormonas esteroideas, a través de vías que involucran a la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y la proteína cinasa C (PKC) [Lin et al. 1998; Manna et al. 2002; Stocco et al. 2005]. Algunas citocinas derivadas de los macrófagos y del ácido araquidónico producen la activación de PKC, y en ciertos casos éstos funcionan en sinergia con la LH para promover la esteroidogénesis testicular [Bornstein et al. 2004; Stocco et al. 2005; Wang et al. 2002]. Estas observaciones sugieren la presencia en el testículo de tres vías de señalización que al activarse y comunicarse entre ellas, modifican la tasa de síntesis hormonal.



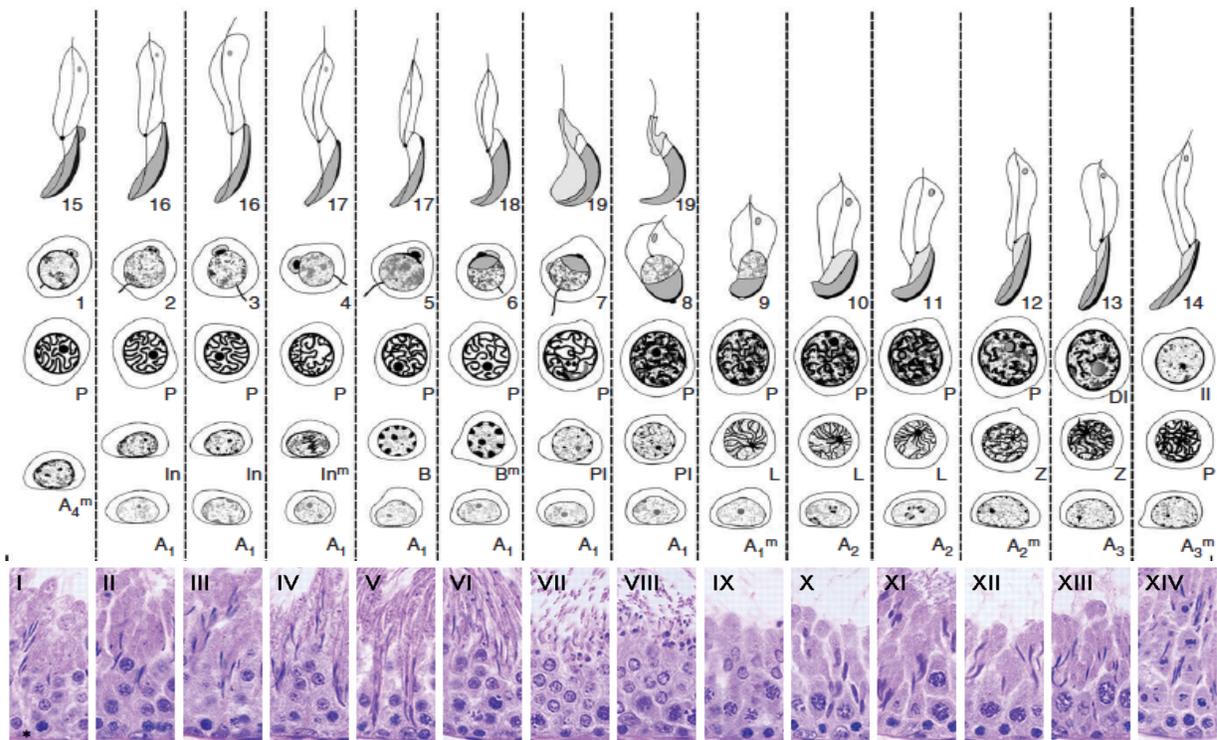
**Figura 2.** Las rutas intracelulares esteroidogénicas para la síntesis de testosterona y las enzimas participantes para la síntesis de la testosterona en las células de Leydig. StAR moviliza el colesterol de los almacenes celulares hacia la mitocondria. La vía 4 está presente en los roedores (derecha) y la vía 5 está presente en los humanos (izquierda). 3β-HSD, 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17β-HSD, 17 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa; DHEA, dehidroepiandrosterona; StAR, proteína de regulación esteroidogénica del transporte del colesterol; P450scc, enzima que escinde la cadena lateral del colesterol dependiente del citocromo P450; P450c17, enzimas que median la 17 alfa-hidroxilasa/C17-C20 liasa dependientes del citocromo P450 (CYP17).

### 1.4.2 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso biológico de la transformación celular, que produce células germinales masculinas diferenciadas haploides (espermatozoides) a partir de células madre (espermatogonias diploides) y se lleva a cabo en el epitelio seminífero, dentro del túbulo seminífero.

El epitelio seminífero se divide en etapas separadas, de acuerdo con las asociaciones celulares observados en cada sección transversal tubular [Leblond y Clermont 1952]. La secuencia completa de estas asociaciones celulares constituyen un ciclo del epitelio seminífero [de Kretser y Kerr 1994] y en la rata lo constituyen XIV

etapas (Figura 3). En la rata, la espermatogénesis se lleva a cabo durante cuatro ciclos completos del epitelio seminífero y tiene una duración de 49 a 52 días [Clermont 1972].



**Figura 3.** Ciclo del epitelio seminífero. Representación esquemática (arriba) y cortes histológicos (abajo). Cada columna vertical muestra la secuencia de generaciones de células germinales que se observan en un corte histológico de los túbulos seminíferos de la rata en esa etapa. I-XIV (las 14 etapas). Esta clasificación se basa en la morfogénesis del acrosoma de las espermatidas de la fase menos diferenciada 1 a la altamente diferenciada en la fase 19. Espermatogonias: A, tipo A1, A2, A3, A4; In, intermedia; B, tipo B; PL, preleptoteno; m, etapas durante el cual se produce la mitosis de las espermatogonias. Espermatoцитos primarios: L, leptoteno; Z, zigoteno; P, paquiteno; Di, diacinesis; II, espermatoцитo secundario. 1-19, fases de diferenciación de las espermatidas. (Tomada y modificada de [Dym y Clermont 1970; Lightman y Conway-Campbell 2010]).

La organización general de la espermatogénesis se divide en tres fases principales, cada una con diferentes tipos de células germinales.

La fase inicial es la proliferativa, las espermatogonias se dividen por mitosis para producir dos tipos de células: células madre adicionales y las espermatogonias, que se dividen y se diferencian en espermatoцитos primarios. En la rata, hay tres tipos

de espermatogonias: las células madre espermatogoniales, las proliferativas y las de diferenciación [A1, A2, A3, A4, In (intermedias) y B].

La fase meiótica forma espermatocitos primarios jóvenes y se dividen en cinco etapas secuenciales (leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis). La fase meiótica implica la síntesis de ADN en los espermatocitos primarios más jóvenes (preleptoteno) [Parvinen et al. 1991], la profase meiótica y la síntesis de ARN en la etapa de diploteno. Después de la profase meiótica larga, los espermatocitos primarios completan rápidamente su primera división meiótica para formar dos espermatocitos secundarios. Estas células se someten a una segunda división de maduración después de una breve interfase sin la síntesis de ADN, para producir cuatro espermátidas, cada una con un número haploide de cromosomas individuales.

La fase de espermiogénesis implica la diferenciación morfológica y funcional de las espermátidas recién formadas a espermatozoides maduros. Al inicio de la transformación, el aparato de Golgi empaqueta su material para la formación del acrosoma. Se forma el flagelo de los centriolos. El núcleo se alarga progresivamente a medida que la cromatina se condensa [de Kretser y Kerr 1994]. El genoma se empaqueta con protaminas en lugar de las histonas para reducir su volumen. Este proceso se produce sin divisiones celulares y se subdivide en 19 pasos. Los espermatozoides recién formados son liberados de la célula de Sertoli a la luz tubular en el proceso llamado espermiación [McLachlan et al. 2002].

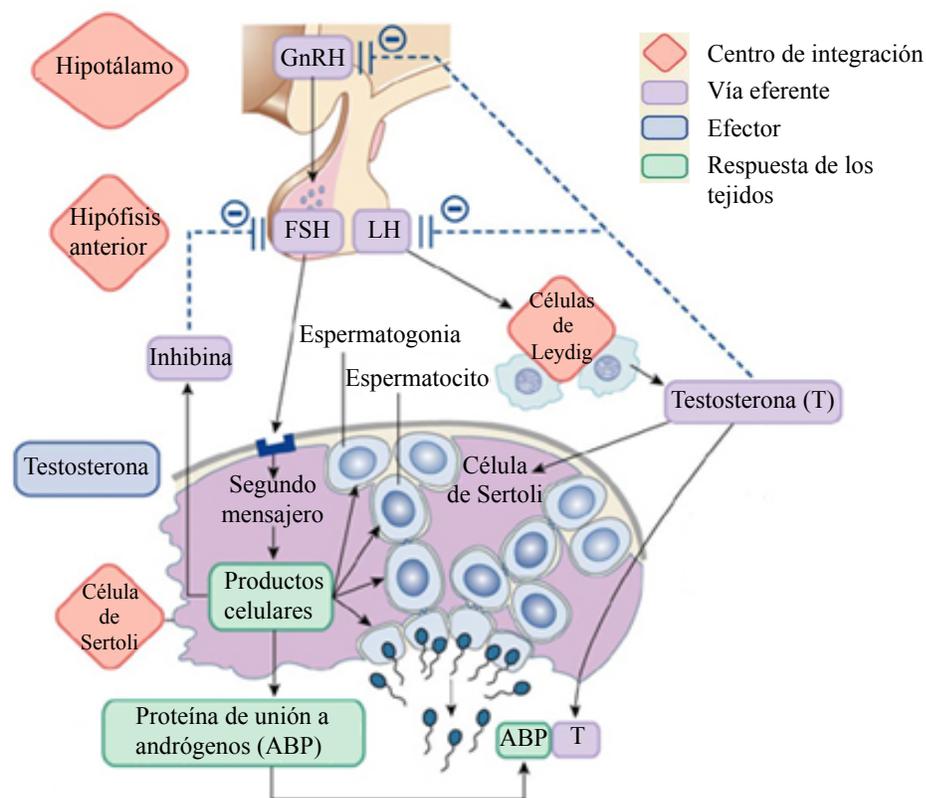
### *1.4.3 Eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT). Regulación neuroendocrina de la función testicular*

La función testicular está bajo el control de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual es producida en neuronas del área preóptica media del hipotálamo medio basal [Silverman et al. 1979]. La GnRH se transporta a través del sistema circulatorio portahipofisiario a las células gonadotropas de la adenohipófisis, en ellas estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas; la LH [Neill et al. 1977] y la hormona estimulante de los folículos (FSH) [Smith 1985] hacia el torrente sanguíneo hasta alcanzar su órgano blanco, el testículo.

En el testículo, la LH se une a su receptor en las células de Leydig para estimular la síntesis de testosterona [Payne y Hales 2004]. Dentro de los túbulos seminíferos, la FSH se une a su receptor en las células de Sertoli para estimular la secreción de nutrientes, minerales y factores de crecimiento, necesarios para la proliferación y diferenciación de las espermatogonias hasta espermátidas alargadas. Cuando la testosterona se secreta en exceso suprime su propia producción por retroalimentación negativa, hacia el hipotálamo, inhibiendo la liberación de GnRH y en la hipófisis, regulando negativamente la producción de la LH (Figura 4) [Mulder 1993].

En respuesta a la FSH, las células de Sertoli secretan inhibina B, activinas A y activina B [Kaipia et al. 1992; Skinner et al. 1989]. Las activinas influyen en el control de la reproducción a nivel del hipotálamo estimulando la secreción de la GnRH y en la hipófisis, estimulando la secreción de las gonadotropinas. La señalización de las

activinas a su vez es modulada por dos mecanismos diferentes, uno mediado a través de la inhibina B y el otro a través de la folistatina [Anderson et al. 1998; Lewis et al. 2000]. La inhibina B se une e inactiva los receptores de activina de manera competitiva. La folistatina se une irreversiblemente a las activinas e impide la unión a sus receptores [de Kretser et al. 2002; Gray et al. 2002]. La inhibina B se produce principalmente por las células de Sertoli, su producción es dependiente de la espermatogénesis [Myers et al. 2009]; por lo que, está íntimamente implicada en la regulación del eje HHT siendo un indicador directo de la fertilidad.



**Figura 4.** Regulación hormonal de las funciones testiculares. La mayoría de las hormonas mostradas pueden tener efectos tanto positivos como negativos, ya sea a nivel de la activación o desensibilización del receptor, o a través de la activación y la represión del tejido blanco corriente abajo. Inhibición por retroalimentación sobre el hipotálamo y la hipófisis resultada por el aumento de las concentraciones de testosterona y por el aumento en la producción de inhibina. GnRH, hormona liberadora de gonadotropinas; FSH, hormona estimulante de los folículos; LH, hormona luteinizante. Tomada y modificada de <http://www.austincc.edu/apreview/NursingPics/ReproPics/Picture13>.

#### 1.4.4 Maduración espermática en el epidídimo

El epidídimo está formado por un conducto altamente complejo que conecta los conductos eferentes con el conducto deferente [Hermo y Robaire 2002; Sullivan et al. 2005]. Éste se divide en 4 regiones anatómicas: el segmento inicial; la cabeza o *caput* (epidídimo proximal); el cuerpo o *corpus* y la cola o *cauda* (epidídimo distal), en él se llevan a cabo las funciones de transporte, protección, maduración, concentración y almacenamiento de los espermatozoides [Hermo y Robaire 2002; Rodriguez et al. 2002]. Estas funciones son favorecidas por un microambiente altamente especializado creado en el interior del conducto del epidídimo [Franca et al. 2005]

Los espermatozoides de los mamíferos, una vez que dejan el testículo, son células funcionalmente inmaduras que requieren un proceso de maduración. La maduración espermática se define como el desarrollo de la capacidad de los espermatozoides para adquirir la movilidad progresiva y la capacidad de reconocer al ovocito para fertilizarlo [Bedford 1975; Hermo y Robaire 2002]. Como parte del proceso de maduración los espermatozoides modifican sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y funcionales [Cooper 1998; Hinton y Palladino 1995; Kirchhoff et al. 1997; Orgebin-Crist 1969; Setchell et al. 1993; Toshimori 1998; Yanagimachi 1994] .

Funcionalmente, los espermatozoides del testículo y del epidídimo proximal son inmóviles e inmaduros (infértiles), mientras que los espermatozoides que llegan al epidídimo distal son móviles y maduros (fértiles), ya que tienen la capacidad de

moverse hacia delante, de reconocer la zona pelúcida y de experimentar la reacción acrosomal [Lakoski et al. 1988]. Por lo tanto, los espermatozoides se vuelven competentes para la fertilización y se almacenan hasta la eyaculación embebidos en fluido luminal.

El fluido luminal contiene electrolitos, enzimas y otras proteínas, que se originan principalmente en las células de Sertoli y en las células epiteliales que recubren el epidídimo. La secreción y la actividad del epitelio del epidídimo son regionalmente distintas y el sitio de la secreción varía para cada proteína particular bajo el control de los andrógenos. El microambiente luminal se aísla de la sangre por las uniones estrechas presentes en la barrera hemato-testicular y la barrera hemato-epididmaria [Klinefelter 2002; Toshimori 2003].

En general, la maduración de las estructuras del espermatozoide van desde modificaciones en el núcleo, el acrosoma, en elementos del citoesqueleto (teca perinuclear, fibras densas externas y vaina fibrosa), hasta la migración distal y la pérdida de la gota citoplasmática a lo largo del flagelo a medida que progresan a través del epidídimo [Cuasnicu 2002; Yanagimachi 1994]. En la rata, estas modificaciones requieren de un período mínimo para llevarse a cabo, es decir, los espermatozoides deben permanecer 2.5 días en la cabeza y 2 días en el cuerpo del epidídimo [Franca et al. 2005; Sommer et al. 1996].

En cuanto al proteoma de los espermatozoides, las proteínas se sintetizan generalmente en los espermatocitos y/o espermátidas, terminando la actividad transcripcional en las espermátidas alargadas, por lo general varios días antes de

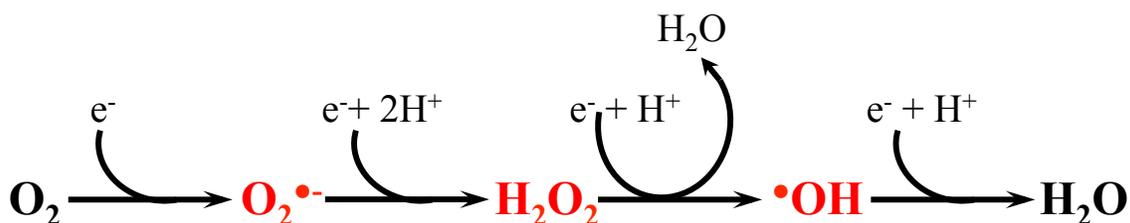
que finalice la espermatogénesis. Por lo tanto, la síntesis de proteínas está altamente regulada a nivel de la transcripción, la traducción y post-traducción [Eddy 1998; Hecht 1998].

## 1.5 RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDANTE

Una de las principales causas de la disfunción del sistema reproductor masculino es el estrés oxidante, que altera la integridad del ADN y daña los lípidos y las proteínas de la membrana plasmática de los diferentes tipos celulares. El origen del estrés oxidante parece implicar las mitocondrias, que tienden a generar altas concentraciones de radicales libres como preludio a entrar en la cascada apoptótica intrínseca [Sinha et al. 2013].

Un radical libre es cualquier especie química que contiene un electrón desapareado en su órbita exterior. Debido a estos electrones desapareados, los radicales libres son muy reactivos y reaccionan prácticamente con todos los componentes celulares (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) en el cuerpo. Estas reacciones se producen a través de una cadena de reacciones oxidantes que causan lesiones en los tejidos [Kohen y Nyska 2002]. En la mayoría de las componentes celulares, el daño por los radicales libres está estrechamente asociado con el daño oxidante, causando lesión celular directa, mediante la inducción de peroxidación de los lípidos y de las proteínas, y el daño a los ácidos nucleicos [Pryor et al. 2006; Slater 1984].

En la mayoría de los sistemas biológicos, los radicales libres de interés se refieren a las especies reactivas del oxígeno (ERO), ya que la importancia biológica de los radicales libres están centrados en el oxígeno. Las ERO producidas en las células incluyen el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Figura 5), aunque éste último no se considera como un radical libre en sí, ya que no contiene electrones desapareados [Pryor et al. 2006; Slater 1984]; sin embargo, el  $H_2O_2$  se considera una ERO por su capacidad de generar radicales libres  $\bullet OH$  altamente reactivos a través de interacciones con metales de transición reactivos como el Fe y el Cu (Reacción de Fenton) [Aruoma et al. 1991; Valko et al. 2005].



**Figura 5.** El  $O_2^{\bullet-}$ , el  $H_2O_2$  y el  $\bullet OH$ , se generan a partir de la reducción parcial del oxígeno molecular.  $O_2^{\bullet-}$ , radical superóxido;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno;  $\bullet OH$ , radical hidroxilo.

Las especies reactivas del nitrógeno (ERN) es otro grupo de radicales libres que pueden alterar la función celular [Kohen y Nyska 2002]. Las ERN se refiere colectivamente a los radicales centrados en el nitrógeno e incluyen el óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), el peroxinitrito ( $OONO^{\bullet}$ ), el radical dióxido de nitrógeno ( $NO^{\bullet}_2$ ), también incluyen otros óxidos de nitrógeno y productos que surgen cuando el  $NO^{\bullet}$  reacciona con el  $O_2^{\bullet-}$  [Beckman 1996].

La toxicidad de las ERO depende de su reactividad, del tiempo de vida y de su naturaleza química. El radical  $\cdot\text{OH}$  es un poderoso oxidante, su tiempo de vida es de  $10^{-9}$  segundos y su difusión dentro de la célula es limitada; sin embargo, puede reaccionar con la mayoría de las biomoléculas inactivando su función [Czapski 1984]. La toxicidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  es menor. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es menos reactivo debido a la estabilidad de su enlace oxígeno-oxígeno, es capaz de atravesar membranas y de dispersarse hasta alcanzar otras biomoléculas [Halliwell 1999]. El  $\text{O}_2^{\cdot-}$  posee una carga negativa que le impide atravesar membranas [Imlay 2003]. La toxicidad también depende de la concentración, del contexto en el que se producen y del tiempo de exposición a las mismas, llegando a ser perjudiciales para las funciones y la supervivencia celular [Bauche et al. 1994].

El estrés oxidante se caracteriza por un desequilibrio entre los compuestos pro-oxidantes y las defensas antioxidantes (enzimas antioxidantes, sistemas de reparación) en favor de los primeros, dando lugar a un aumento de la tasa de generación de daño oxidante [Wang et al. 2003] que conlleva a daños en las macromoléculas biológicas más importantes.

Las ERO tienen una tendencia a reacciones en cadena, es decir, un compuesto que lleva un electrón desapareado va a reaccionar con otro compuesto para generar otro electrón desapareado, de tal forma que "radicales generan radicales" [Aitken 1995; Kodama et al. 1996].

### *1.5.1 Efecto de las especies reactivas del oxígeno en los lípidos*

El efecto principal de las ERO sobre los lípidos es la peroxidación lipídica. El  $\cdot\text{OH}$  puede atacar directamente los lípidos de membrana e iniciar su peroxidación. Las reacciones de peroxidación lipídica se favorecen por la presencia de agentes promotores, como los iones metálicos Cu y Fe, y la luz UV, entre otros. Las ERO y otras especies reactivas son capaces de extraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado generando un radical lipídico ( $\text{R}\cdot$ ), el cual puede reaccionar con el  $\text{O}_2$  dando lugar a un radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ). Los radicales peroxilo contribuyen a la propagación de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica, sustrayendo átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos insaturados cercanos y generando así nuevos  $\text{R}\cdot$  e hidroperóxidos lipídicos ( $\text{ROOH}$ ). Éstos últimos se descomponen en radicales alcoxilo ( $\text{RO}\cdot$ ) y peroxilo, contribuyendo a la propagación del daño oxidante [Mates 2000].

Debido a que las células están continuamente expuestas a las ERO a partir de una variedad de fuentes (Tabla 1) y en ocasiones la producción de ERO ocurre espontáneamente en los organismos aerobios, se hace necesario la presencia de un sistema de defensa que contrarreste los efectos oxidantes de estas especies.

**Tabla 1.** Fuentes potenciales de ERO en las células. (Tomada de [Winterbourn 2003]).

---

Respiración mitocondrial
Oxidaciones catalizadas por metales
Oxidaciones mediadas por peroxidasas
Ciclo redox o auto oxidación de xenobióticos
Radiación $\gamma$ y UV
Oxidorreductasas, por ejemplo: NADPH oxidasas, xantina oxidasa, lipoxigenasa, óxido nítrico sintetasa
Peroxidación lipídica

---

## 1.6 EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA GENERACIÓN DE ESTRÉS OXIDANTE

Las altas concentraciones de glucocorticoides generan una producción mayor de ERO y finalizan con la muerte por apoptosis de diversos tipos celulares [Gao et al. 2003]. Sin embargo, los glucocorticoides además de incrementar el daño oxidante, también pueden iniciar la sobre regulación de las defensas antioxidantes y reducir la producción de radicales libres, por lo tanto, pueden proteger contra la generación del estrés oxidante patológico. El grado del daño dependerá del tiempo de exposición a los glucocorticoides, del tejido, la edad y del sexo [Cohen et al. 2006; Veskoukis et al. 2009]. Los glucocorticoides pueden ser de origen endógeno, como son los liberados durante la respuesta de estrés; o de origen exógeno, que además de ser sintéticos como la dexametasona, buscan mimetizar los efectos del estrés.

El estrés oxidante aumenta levemente con la administración de glucocorticoides a corto plazo, después de unas horas a 4-5 días. Por el contrario, el estrés oxidante aumenta considerablemente con la duración del tratamiento, sobre todo después de 3 semanas de administración de glucocorticoides [Costantini et al.

2011]. Sin embargo, la administración exógena de glucocorticoides para imitar una condición de estrés no refleja la condición real, ya que las concentraciones circulantes de glucocorticoides alcanzan niveles muy por encima de los máximos observados durante la respuesta de estrés [Dhanabalan y Mathur 2009; Lin et al. 2009]. Por el contrario, otros reportes indican que la administración de glucocorticoides incrementa las concentraciones circulantes dentro del rango fisiológico de las especies estudiadas, y éstos podrían tener efectos negativos exacerbados por el estrés oxidante, ya sea en el sistema antioxidante o en el grado del daño oxidante generado [Costantini et al. 2008; Cote et al. 2010; Lin et al. 2004; Stier et al. 2009].

Estudios en modelos animales asocian el aumento de glucocorticoides circulantes durante el estrés crónico con el estrés oxidante en eritrocitos, hígado, riñón, corazón, cerebro, estómago y pulmón [Lucca et al. 2008; Sahin y Gumuslu 2007a].

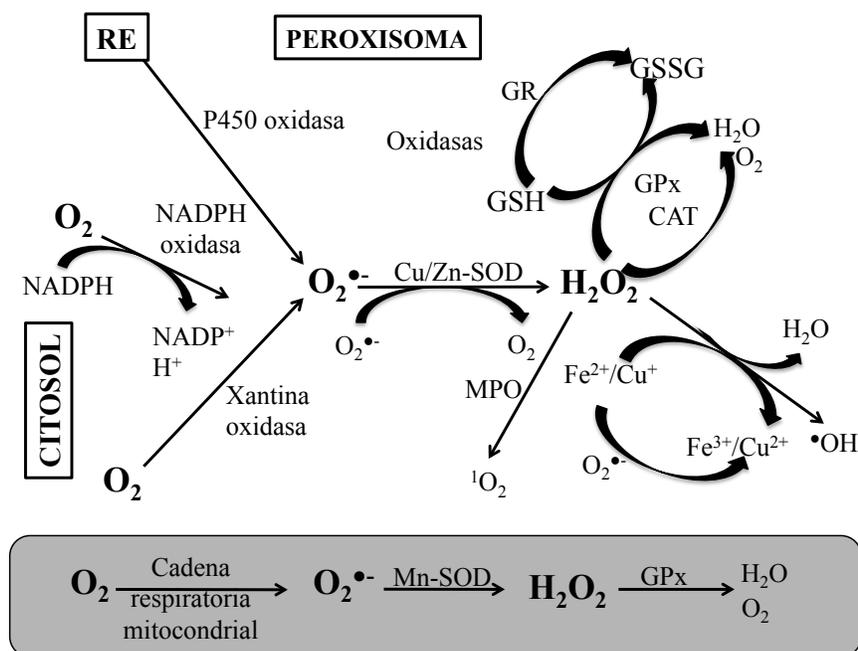
## **2 ANTECEDENTES**

### **2.1 SISTEMA ANTIOXIDANTE EN LOS TESTÍCULOS, EL EPIDÍDIMO Y EN LOS ESPERMATOZOIDES**

Los testículos, el epidídimo y los espermatozoides contienen enzimas antioxidantes que protegen los diferentes tipos celulares del daño oxidante. Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) (Figura 6), glutatión-S-transferasa, glutatión reductasa, hemo oxigenasa 1 [Bauche et al.

1994; Gu y Hecht 1996], y algunas moléculas antioxidantes como el glutatión (GSH), el ácido ascórbico, el alfa-tocoferol, el beta-caroteno, pueden neutralizar al  $O_2^{\cdot-}$  y a otras ERO [Andreyev et al. 2005].

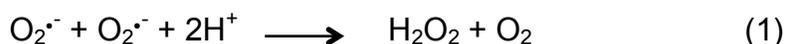
Las enzimas antioxidantes previenen la formación de nuevas ERO, transformándolas en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas. Las enzimas SOD, catalasa y GPx se encuentran distribuidas en los diferentes tipos celulares del sistema reproductor masculino. Estos últimos presentan una sensibilidad muy variable al estrés oxidante, debido a que presentan sistemas antioxidantes diferentes y/o diferentes proporciones de los mismos.



**Figura 6.** Sistemas generadores de ERO y sistemas enzimáticos de defensa antioxidante. Generadores de ERO: NADPH oxidasa, xantina oxidasa, oxidasas, P450 oxidasa, cadena respiratoria mitocondrial, mieloperoxidasa. Antioxidantes: Cu,Zn-SOD, GR, GPx, CAT. CAT, catalasa; Cu/Zn-SOD o SOD1, superóxido dismutasa 1; ERO, especies reactivas del oxígeno; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión; GSSG, glutatión oxidado; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; MPO; mieloperoxidasa; RE, retículo endoplásmico;  $^1O_2$ , oxígeno en singulete;  $O_2^{\cdot-}$ , radical superóxido;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno;  $\cdot OH$ , radical hidroxilo;  $H_2O$ , agua.

### 2.1.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Las enzimas SOD son la primera y una de las líneas más importantes de defensa contra las ERO. La SOD específicamente modula al  $O_2^{\cdot-}$  y lo convierte en  $H_2O_2$  y en oxígeno (Ecuación 1) [Fridovich 1995]. Las células de Sertoli expresan las tres isoformas de la SOD: la citosólica (Cu/Zn o SOD1), la mitocondrial (Fe/Mn o SOD2) y la extracelular (SOD-Ex o SOD3) [Bauche et al. 1994]. Estas células se caracterizan por la actividad relativamente alta de SOD intracelular y poseen el sistema antioxidante más completo, por lo que se pueden proteger de manera más eficiente contra el estrés oxidante.



Las espermatogonias también tienen una gran tolerancia al ataque de las ERO, mientras que en fases más avanzadas de las células germinales, tales como los espermatozoides son mucho más susceptibles, ya que la actividad y la expresión de la SOD1 disminuyen en los espermatocitos y en las espermátidas. Además, los espermatozoides, los espermatocitos y las espermátidas sufren procesos apoptóticos asociados con las ERO, mientras que las espermatogonias no [Celino et al. 2011].

Las células germinales presentan actividad alta de la SOD, mientras que la actividad de la GPx es más baja, lo que sugiere que las células germinales son capaces de convertir el  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ , por lo que podrían tener mayor dificultad para biotransformar el  $H_2O_2$  y peróxidos orgánicos a moléculas no reactivas [Aitken et al. 1989].

El hecho de que las células germinales tengan mayor actividad de la SOD en comparación con la GPx, puede llevar a la saturación de los sistemas de protección de los peróxidos. Como resultado de ello, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado puede estar disponible para su conversión a  $\cdot$ OH por medio de la reacción de Fenton (Ecuación 2), el cual induce daño a los ácidos nucleicos, a las proteínas y a los lípidos celulares. Las consecuencias pueden ser dañinas en el testículo, con el riesgo de la generación de mutaciones heredables en las células germinales. Además, la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas de las células testiculares de los mamíferos, pueden ser muy susceptibles al ataque del  $\cdot$ OH [Aitken et al. 1989].

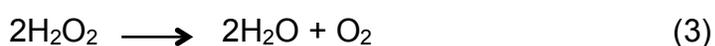


El epidídimo también posee las isoformas SOD1 y SOD3. El ARNm de la SOD1 se expresa en cantidades muy altas a lo largo de todo el epidídimo, y no varía significativamente en las diferentes regiones de este órgano [Jervis y Robaire 2001]. El epitelio de la cauda del epidídimo secreta la SOD1, que se asocia estrechamente con los espermatozoides [Perry et al. 1993]. La presencia de esta enzima en el lumen de la cauda del epidídimo se relaciona con la necesidad de proteger a los espermatozoides del estrés oxidante durante su almacenamiento en esta región, siendo muy importante porque los espermatozoides son ricos en ácidos grasos poliinsaturados y el contenido de sus enzimas antioxidantes es bajo, debido a la pérdida del citoplasma [Tramer et al. 1998].

Una posible función para la SOD3 asociada a la membrana plasmática de los espermatozoides de la cauda del epidídimo sería promover una explosión de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el eyaculado con el fin de estimular la regulación redox, la fosforilación de tirosinas asociadas a eventos relacionados con la capacitación espermática [Lewis y Aitken 2001].

### 2.1.2 Catalasa

Una vez que la SOD ha biotransformado al O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en oxígeno (Ecuación 3), el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a su vez es degradado por la catalasa en oxígeno y en agua en los peroxisomas. La catalasa elimina al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de origen extracelular y el generado durante el metabolismo. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, además de ser un producto secundario del metabolismo que puede resultar tóxico, desempeña un papel importante como modulador de algunos procesos celulares como la proliferación, diferenciación y muerte celular [Fridovich 1978].



La expresión de la catalasa se localiza en las células de Leydig, en las células mioides peritubulares [Zini y Schlegel 1996], en las células de Sertoli [Nenicu et al. 2007] y en las espermatogonias, aunque su expresión disminuye en espermatoцитos y espermátidas durante la espermatogénesis [Dastig et al. 2011; Luers et al. 2006]. La actividad de la catalasa se incrementa durante el periodo de crecimiento rápido [Zini y Schlegel 1996] y, aunque la actividad es muy baja comparada con la actividad

que presenta el hígado, ésta permanece constante en el testículo de las ratas adultas [Peltola et al. 1992].

La catalasa también se expresa en los espermatozoides [Tramer et al. 1998], en el epitelio del epidídimo y en otros tejidos a lo largo del sistema reproductor masculino, excepto en las vesículas seminales de la rata [Zini y Schlegel 1997]; sin embargo, la expresión del ARNm de la catalasa en estos órganos es sumamente baja. La catalasa muestra alta selectividad por su sustrato, su intervención parece importante sólo a concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mayores de  $10^{-6}$  M [Cohen y Hochstein 1963]. Estas concentraciones se alcanzan durante una explosión oxidante o durante la sobre-expresión de SOD [Przedborski et al. 1992], y raramente se lograrían durante condiciones fisiológicas normales.

La actividad baja de la catalasa en el testículo, el epidídimo y los espermatozoides sugiere que estos son vulnerables a factores prooxidantes. Sin embargo, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  también es eliminado por la enzima GPx, para modular el potencial redox. Además, cuentan con antioxidantes no enzimáticos, que son parte esencial en el sistema de defensa contra factores prooxidantes. Así, se considera que la catalasa no parece ser un participante importante en el control del estrés oxidante en el sistema reproductor masculino.

### *2.1.3 Glutación peroxidasa (GPx)*

GPx es el nombre genérico para una familia de múltiples isoenzimas que se caracterizan por su triada catalítica compuesta de selenocisteína, glutamina y

triptófano. La GPx requiere del GSH como fuente de electrones para reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua, produciendo glutatión oxidado (GSSG) (Ecuación 4).



La GPx-1 es la forma celular más importante de la GPx, está presente en el testículo y el epidídimo [Dufaure et al. 1996; Zini y Schlegel 1997] y es responsable de la mayor actividad medida en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o hidroperóxido de terc-butilo, en extractos de epidídimo total.

La GPx-3 se expresa significativamente en el epidídimo [Maser et al. 1994; Schwaab et al. 1995], en la región cefálica del epidídimo su expresión es baja y es secretada hacia el lumen, mientras que en la cauda, el sitio principal de expresión, permanece en el citosol de las células epiteliales. Además, la expresión de la GPx-3 está bajo el control de los andrógenos dentro de la cauda y el cuerpo del epidídimo, mientras que es independiente de andrógenos en la región cefálica [Schwaab et al. 1998].

La GPx de fosfolípidos o GPx-4 tiene mayor actividad en los testículos, comparado con el hígado y con el corazón [Cárdenas-Rodríguez 2008]. Se expresa tanto en las células germinales como en las células de Leydig [Baek et al. 2007]. Esta enzima cataliza la reducción de los ROOH derivados de lípidos insertados en la membrana en alcohol (ROH) (Ecuación 5) [Cárdenas-Rodríguez 2008], de los

hidroperóxidos de colesterol [Thomas et al. 1990] y de las lipoproteínas [Sattler et al. 1994].

La actividad de la GPx-4 es influenciada por la testosterona, ya que en el testículo de la rata se expresa después de la pubertad [Maiorino et al. 1998] y es necesaria para una correcta diferenciación de las células germinales, por lo tanto su actividad después de la pubertad apoya la idea de que la GPx-4 participa en el proceso de la espermatogénesis. La GPx-4 se localiza dentro de células espermatogénicas en maduración, especialmente en las espermátidas redondas, mientras que en las células de Sertoli no se expresa [Roveri et al. 1992].



Un papel plausible de la GPx-4 en el testículo puede ser la protección del material genético del daño provocado por los hidroperóxidos lipídicos, particularmente cuando el material genético es propenso a daño durante periodos de proliferación rápida y gametogénesis [Roveri et al. 1992].

La GPx-4 no solo lleva a cabo la función antioxidante, sino también en la maduración sexual y en la diferenciación. Esta enzima fue descrita como un factor que previene la peroxidación lipídica [Ursini et al. 1982] y principalmente protege a las biomembranas del estrés oxidante. La sobre expresión de la GPx-4 protege a las células de la apoptosis inducida por varios estímulos, ya que al localizarse en el sitio de contacto donde se encuentra el citocromo c evita su liberación de la mitocondria por la reducción de hidroperóxidos de cardiolipina [Imai y Nakagawa 2003].

La GPx-1, 3, 4 y 5 se encuentran en los espermatozoides, en las células epiteliales del epidídimo y en el fluido luminal [Alvarez y Storey 1984; Li 1975]. En los espermatozoides del epidídimo de la rata, la GPx-4 está presente en el citosol, en las mitocondrias y en el núcleo. La GPx-4 se considerada un componente estructural de la cápsula mitocondrial [Ursini et al. 1999], su supresión causa infertilidad masculina asociada con el deterioro de la calidad espermática y con anomalías estructurales en la pieza media de los espermatozoides [Schneider et al. 2009].

La GPx-4 ejerce actividad tiol-oxidasa en protaminas de la cabeza de los espermatozoides epididimarios. La actividad es mayor en las protaminas de la región cefálica que en las protaminas de la cauda, lo que podría contribuir de manera significativa a la condensación nuclear. Por tanto, la GPx participa en la maduración de los espermatozoides, a través del metabolismo de los hidroperóxidos y la oxidación de los tioles de las protaminas, además de su función como un protector antioxidante [Godeas et al. 1997].

La GPx-5 es secretada hacia el lumen en la cabeza del epidídimo y está estrictamente bajo el control de los andrógenos [Faure et al. 1991]. La enzima se asocia con la membrana plasmática de los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo [Jimenez et al. 1992; Vernet et al. 1997]. La GPx-5 se encuentra libre en el fluido de la cauda del epidídimo, débilmente unida a las membranas de los espermatozoides o asociada con estructuras que contienen lípidos. Dentro de la cauda del epidídimo, la unión de la GPx-5 es más fuerte que en la región cefálica [Rejraji et al. 2002].

## 2.2 EFECTO DEL ESTRÉS OXIDANTE EN EL TESTÍCULO, EL EPIDÍDIMO Y EN LOS ESPERMATOZOIDES

El estrés oxidante puede afectar el proceso de espermatogénesis provocando infertilidad masculina. Esto implica un daño en la membrana de los espermatozoides de las células de Leydig y las células germinales del testículo, y la fragmentación del ADN nuclear y mitocondrial que llevan a la apoptosis. Los componentes celulares, como los lípidos, proteínas, ADN son objetivos potenciales del estrés oxidante [Agarwal et al. 2008].

Las ERO que atacan los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana celular, dan lugar a una cascada de reacciones químicas llamadas peroxidación lipídica, ésta es utilizada para determinar el grado de daño peroxidante sufrido en la membrana de los espermatozoides [Aitken y Fisher 1994; Aitken et al. 1989]. El aumento en la peroxidación lipídica se correlaciona con la función espermática alterada, discutido en términos de movilidad y la capacidad de la fusión entre los espermatozoides con el ovocito [Aitken et al. 1993].

De las diversas causas que dan origen a la infertilidad masculina, el estrés oxidante ha sido identificado como un factor que afecta el estado de la fertilidad. Sustancias tóxicas del medio ambiente pueden causar estrés oxidante en el testículo, con la consecuente alteración de la espermatogénesis. En las ratas expuestas al pesticida hexaclorociclohexano se genera estrés oxidante testicular y aumenta el daño a las células germinales [Samanta y Chainy 1997]; además, el estrés oxidante induce eventos de señalización en la muerte celular por apoptosis, lo que sugiere

que es una de las principales causas de la pérdida de células germinales en el testículo [Ohta et al. 2003].

La exposición a concentraciones altas de hierro [Wellejus et al. 2000] y cadmio [Koizumi y Li 1992; Oteiza et al. 1999] aumentan el daño oxidante y acaban con los antioxidantes en los testículos de las ratas. Por otra parte, ingerir alcohol o fumar en exceso aumenta la producción de ERO y en ocasiones se han asociado con la infertilidad masculina [Peltola et al. 1994; Wu y Cederbaum 2003].

Durante el estrés oxidante el ADN de los espermatozoides se oxida y se fragmenta. La base oxidada más estudiada es la guanina, dando como producto el aducto 8OHdG, utilizado en estudios para demostrar el daño oxidante del ADN. Las concentraciones de 8OHdG se correlacionan altamente con la medición del daño en el ADN en los espermatozoides, medidas por el marcaje *in situ* del ADN fragmentado o también conocida como técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) [Aitken et al. 2014]. Además, se ha observado la inducción de peroxidación lipídica durante la esteroidogénesis en el testículo de ratas [Peltola et al. 1996].

Recientemente se reportó que el estrés psicosocial crónico afecta negativamente la estructura testicular, el conteo de los espermatozoides y la función reproductiva en humanos [Gollenberg et al. 2010; Lampiao 2009].

En animales de experimentación, el estrés por inmovilización durante 60 días en ratas genera estrés oxidante, como consecuencia se reduce el peso de los testículos y del epidídimo [Dhanabalan et al. 2011; Nirupama et al. 2013], y altera la

espermatogénesis, ya que disminuye el conteo de espermatozoides testiculares. Además, se reduce el número de espermatogonias A, espermatocitos en paquiteno, espermatidas alargadas [Nirupama et al. 2013] y el número de espermatozoides móviles [Dhanabalan et al. 2011; Dhanabalan y Mathur 2009].

### 3 JUSTIFICACIÓN

La investigación actual ha implicado al estrés oxidante en la disfunción reproductiva masculina, con alteraciones en la espermatogénesis y en los espermatozoides como las causas más comunes de la infertilidad masculina. La producción normal de espermatozoides y la calidad espermática, que incluyen la movilidad, la capacitación, la reacción acrosomal, la penetración del ovocito y la descondensación del ADN del espermatozoide, son procesos esenciales para lograr la fertilización. Así, diversos estudios en modelos animales han mostrado mecanismos relacionados con el estrés oxidante que se relacionan con el deterioro de estos procesos. Estos modelos incluyen la exposición a factores endógenos tales como la criptorquidia, la torsión testicular y el varicocele, que generan un estado de estrés oxidante o bien la exposición a factores exógenos como son los xenobióticos y las infecciones.

Por el contrario, el efecto que tiene el estrés en la salud reproductiva masculina no se ha estudiado mucho, siendo limitadas las investigaciones enfocadas en buscar una relación directa entre la exposición a concentraciones elevadas de glucocorticoides durante la respuesta de estrés en el testículo y la inducción de estrés oxidante, los cuales pueden alterar el proceso de la espermatogénesis. Por lo anterior, es importante estudiar los efectos de los glucocorticoides liberados durante el estrés agudo y crónico a diferentes tiempos, en la generación de estrés oxidante en el testículo. Además, es importante conocer el daño que podrían sufrir los espermatozoides almacenados en la cauda del epidídimo, justo antes de ser

eyaculados. La información obtenida permitirá conocer los procesos tempranos que pudieran estar alterando a los espermatozoides por efecto del estrés, mismos que posteriormente podrían causar una pobre calidad espermática.

En el presente trabajo, no se pretende evaluar de forma directa la fertilidad de los machos por efecto del estrés. Sin embargo, es de nuestro interés estudiar el efecto del estrés físico/psicológico sobre las concentraciones plasmáticas de corticosterona y testosterona, su relación con los cambios producidos en la actividad y el contenido de las enzimas antioxidantes durante el estrés agudo y crónico, así como su posible relación con los cambios en los parámetros microscópicos de los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo. Evaluar los cambios en diferentes días de exposición al estrés crónico permitirá conocer las posibles alteraciones en el testículo que incidan en la espermatogénesis y que, eventualmente, pudieran afectar la fertilidad en los machos tratados. De esta manera, los resultados obtenidos proporcionarían información que ayude a identificar una de las posibles causas de la infertilidad masculina, dada por la calidad de los espermatozoides y, por qué no, darle más importancia al fenómeno de estrés y su relación con la salud reproductiva masculina.

## 4 OBJETIVOS

El interés de este trabajo se centra en aportar un conjunto de datos que permitan aumentar el conocimiento de los elementos implicados en los efectos del estrés y su posible relación con alteraciones en la fisiología testicular y espermática.

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del estrés agudo y del estrés crónico en la respuesta antioxidante del testículo de la rata adulta, así como en la calidad de los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

4.2.1 *Estudiar los efectos del estrés físico/psicológico agudo y crónico en el estado oxidante y en el sistema antioxidante del testículo.*

4.2.2 *Evaluar el daño oxidante que el estrés genera en el testículo.*

4.2.3 *Evaluar la activación del eje HHA y su efecto en el eje HHT durante el estrés agudo y crónico.*

4.2.4 *Determinar la relación entre los efectos del estrés agudo y crónico en el testículo y la calidad de los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo.*

4.2.5 *Establecer la correlación entre la corticosterona con los diferentes parámetros relacionados con el estrés oxidante.*

## **5 HIPÓTESIS**

La respuesta de estrés inducirá efectos dañinos en el testículo a través del incremento de especies reactivas del oxígeno, lo que provocará daño oxidante, el cual se verá reflejado en la disminución del contenido y la actividad de enzimas antioxidantes, así como en el daño provocado directamente en los lípidos de las células testiculares. Asimismo, se observará disminución en la calidad de los espermatozoides frente a situaciones estresantes.

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Neuropsicoendocrinología del Departamento de Biología de la Reproducción. Se trabajó en conjunto con los laboratorios de Fisiología Celular del departamento de Ciencias de la Salud y Reproducción Animal Asistida, del departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I).

### **6.1 MODELO BIOLÓGICO**

Se utilizaron 55 ratas macho albinas de la cepa Wistar de 3 meses de edad, con pesos corporales de 300 a 320 g. Se colocaron cinco animales por caja (50 X 30 X 20 cm) y se mantuvieron en el bioterio de la UAM-I.

Los animales se aclimataron en su caja durante 1 semana. Se mantuvieron en condiciones estables, temperatura ambiente constante de  $24 \pm 1$  °C, humedad relativa de 60%, ciclos de luz-oscuridad invertidos de 12 horas. La luz se prendió a

las 21:00 horas y se apagó a las 9:00 horas. El ciclo de luz-oscuridad se invirtió para llevar a cabo los experimentos en la fase activa (nocturna) de las ratas. El consumo de alimento y agua fue *ad libitum* para todos los animales. Se tomaron las medidas adecuadas para minimizar el dolor o el malestar en los animales de experimentación. Todos los procedimientos de la manipulación de los animales, así como el método de eutanasia, se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

## 6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL

Se realizaron dos experimentos utilizando el mismo modelo de estrés. Después del periodo de aclimatación, los animales (n=55) se asignaron aleatoriamente a los dos grupos de trabajo. El primer grupo de ratas (n=25) se dividió en 5 subgrupos (n=5 en cada uno, Tabla 2). Un subgrupo sirvió como grupo control, el cual se mantuvo inalterado durante el experimento, los 4 subgrupos restantes se utilizaron como animales de experimentación y se sometieron a estrés agudo. Este consistió en estresar a los machos a las 9:00 horas en una sola sesión de 15 minutos. Después del estrés, los machos se sacrificaron inmediatamente (n=5), posterior a 6 horas (n=5), 12 horas (n=5) y 24 horas (n=5).

El segundo grupo de ratas (n=30) se dividió en 3 subgrupos (n=10 en cada uno, Tabla 2). Cada subgrupo se subdividió en grupo control (n=5) y grupo experimental (n=5). Los machos de los grupos control permanecieron en sus cajas y su manipulación fue exclusivamente para el registro semanal del peso corporal sin causarles ninguna perturbación. Los animales de los grupos de experimentación se

sometieron a estrés crónico, éstos se estresaron una vez al día por 15 minutos durante 20, 40 y 50 días consecutivos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Distribución de los animales en los distintos grupos de trabajo

	<b>Estrés agudo. Día 1</b>				<b>Estrés crónico. Días consecutivos</b>		
	<b>Horas posteriores al estrés</b>						
	0	6	12	24	20	40	50
Grupos control	n=5				n=5	n=5	n=5
Grupos de estrés	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5

### 6.3 INDUCCIÓN DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO POR INMERSIÓN EN AGUA FRÍA

Los machos de los grupos experimentales se colocaron individualmente en un tanque de agua a 15 °C, con profundidad de 15.5 cm durante 15 minutos, durante 1, 20, 40 y 50 días consecutivos. Las ratas permanecieron en posición vertical de pie sobre sus patas traseras, con la cabeza por encima del nivel del agua (Figura 7). El estresor se aplicó al inicio de la fase oscura entre las 9:00 y las 10:00 horas.



**Figura 7.** Rata macho sometida a estrés por inmersión en agua fría.

#### 6.4 REGISTRO DEL PESO CORPORAL

Los machos del grupo control del estrés agudo se pesaron para asegurar que el peso corporal estuviera dentro del intervalo previsto de 300 a 320 g. Los machos de los grupos control y de los grupos experimentales del estrés crónico se pesaron semanalmente desde el inicio del experimento, hasta el final del mismo.

#### 6.5 OBTENCIÓN DE LOS TESTÍCULOS DE LOS GRUPOS DE TRABAJO

Al final de cada tratamiento, los animales se anestesiaron con una dosis de pentobarbital sódico de 25 mg/kg de peso corporal administrado por vía intraperitoneal. Los machos estresados agudamente se anestesiaron a las 0, 6, 12 y 24 horas después de una sola exposición al estresor. Los machos estresados crónicamente se anestesiaron a los 20, 40 y 50 días de estrés consecutivo. El mismo procedimiento se llevó a cabo con los animales de los grupos control.

Bajo el efecto de la anestesia, se realizó una incisión en la línea media del abdomen inferior y se retiraron del escroto el testículo izquierdo y la cauda del epidídimo. De la cauda del epidídimo se obtuvieron los espermatozoides para evaluar su calidad. El testículo se extrajo y se lavó con solución salina (NaCl 0.9%) a 37 °C. Inmediatamente después se pesó, se le retiró la cápsula y los túbulos seminíferos obtenidos se dividieron en fragmentos para evaluar la producción de ERO, la actividad de las enzimas antioxidantes y el daño por peroxidación lipídica. El resto del tejido se congeló en N<sub>2</sub> líquido (-190 °C) por inmersión y se conservó a -80 °C hasta el día de los ensayos. A partir de estas muestras se evaluó el contenido de las enzimas antioxidantes por Western blot. Se obtuvieron muestras de sangre para

evaluar las concentraciones de corticosterona y testosterona. Los animales se sacrificaron por exanguinación inmediatamente después de la disección del testículo y de la recolección de los espermatozoides. La representación esquemática del diseño experimental se representa en las figuras 8 y 9.

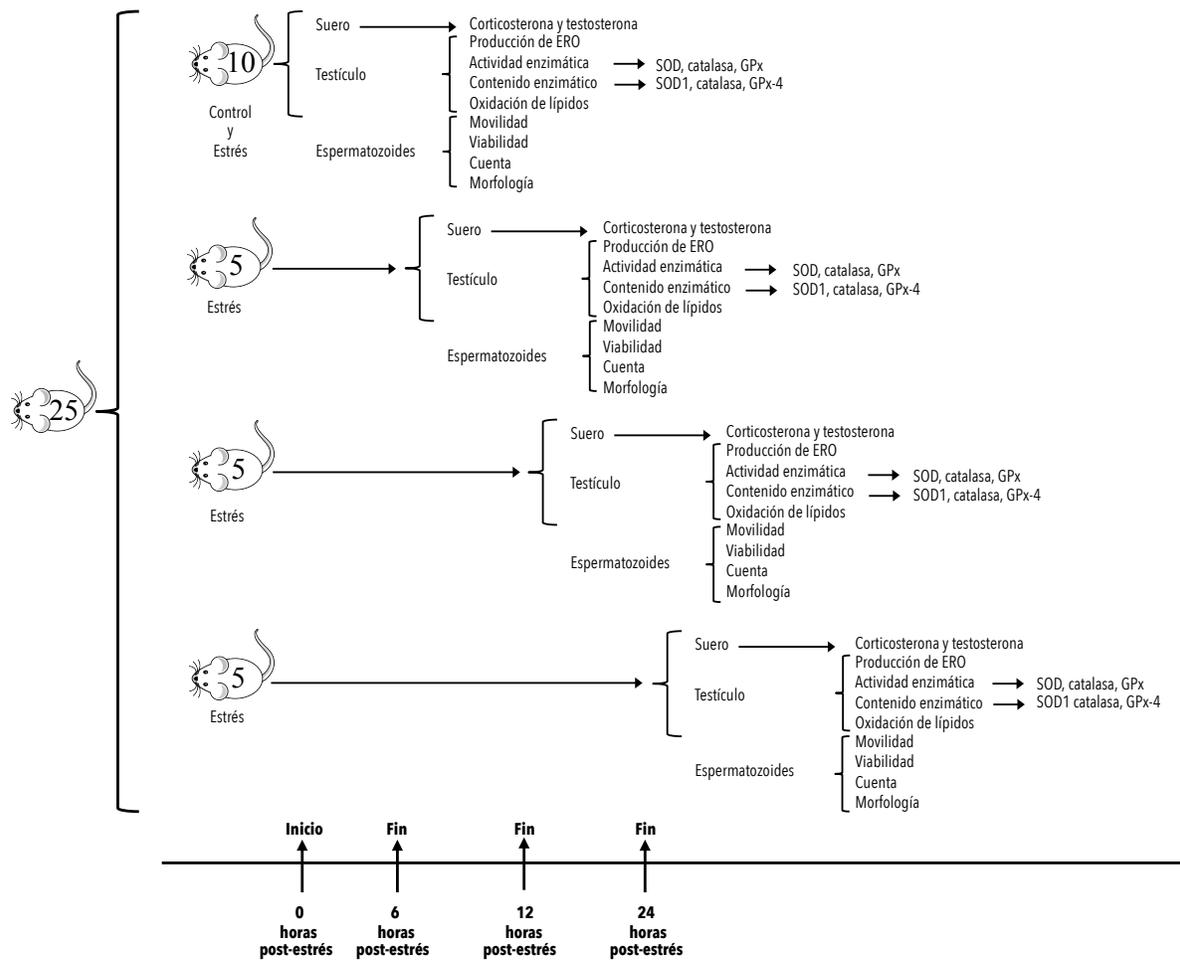
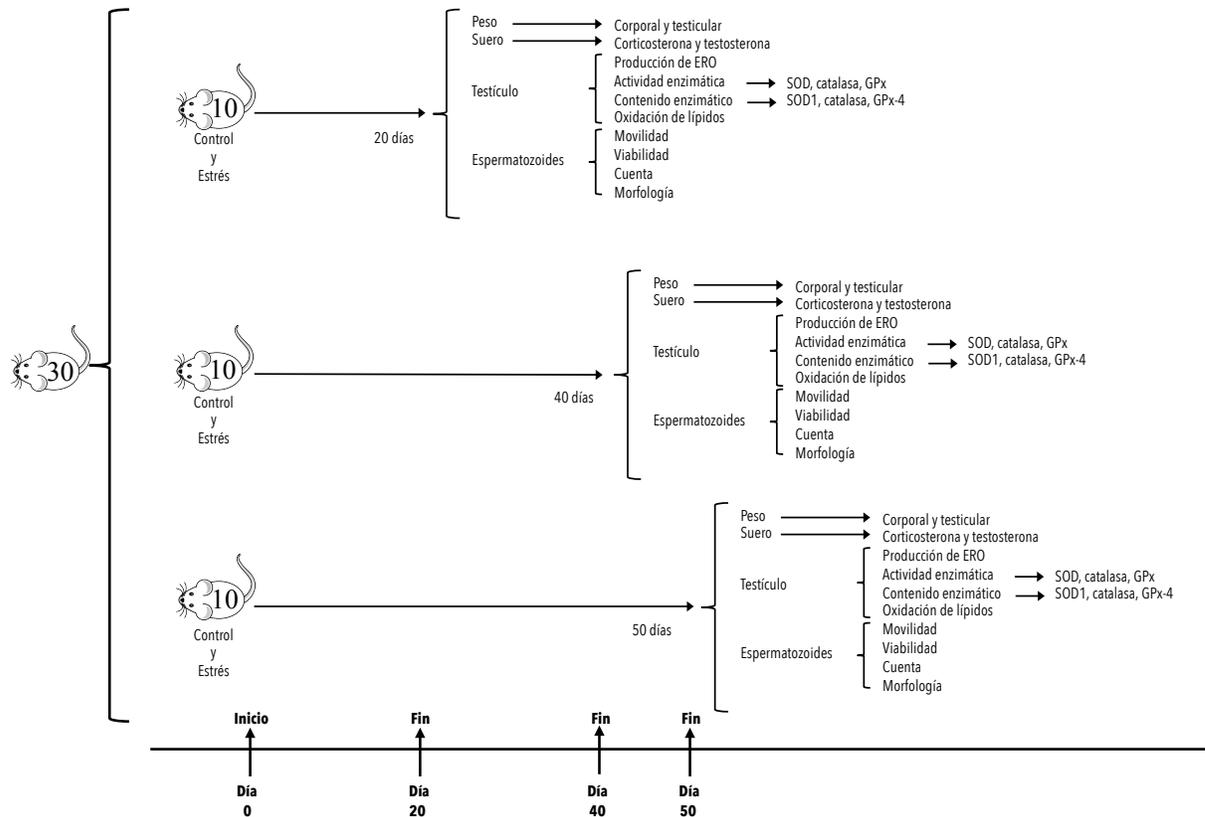


Figura 8. Representación esquemática del diseño experimental del estrés agudo



**Figura 9.** Representación esquemática del diseño experimental del estrés crónico.

## 6.6 DETERMINACIÓN DE CORTICOSTERONA Y TESTOSTERONA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Para determinar las concentraciones de corticosterona y testosterona se usó la técnica de HPLC. En la cromatografía líquida, un líquido en movimiento (fase móvil) lleva la muestra a través de una fase estacionaria (el soporte sólido encontrado dentro de una columna de la cromatografía líquida). Las hormonas inmersas en las muestras se separaron en base a sus diferencias de afinidad con la fase estacionaria.

### *6.6.1 Obtención de las muestras de sangre*

Para la extracción sérica de corticosterona y testosterona se colectaron de 3 a 4 ml de sangre en tubos de vidrio por punción cardiaca. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y se centrifugó (2000 x *g* durante 15 minutos) para separar el suero. Las muestras de suero se almacenaron a -20 °C hasta el día del ensayo. A partir de estas muestras se determinaron las concentraciones de corticosterona y testosterona por HPLC.

### *6.6.2 Extracción de las hormonas*

La extracción de corticosterona y testosterona se realizó de acuerdo con una modificación del método reportado por Woodward y Emery [Woodward y Emery 1987]. A 1 ml de suero se le adicionaron 100 µl de hidróxido de sodio 0.03 M y 5 ml de éter-dietílico-diclorometano (60:40 v/v), se homogeneizaron y centrifugaron (1050 x *g* a 4 °C durante 5 minutos). La fase orgánica obtenida se mezcló con 1 ml de agua grado HPLC. Después de una segunda centrifugación, se separaron 3 ml de fase orgánica y se dejaron evaporar a temperatura ambiente. Finalmente, los residuos se re-disolvieron en 100 µl de una mezcla de metanol:agua (60:40 v/v).

### *6.6.3 Cuantificación de la corticosterona y la testosterona*

La pre-columna (Symmetry C18; tamaño de la partícula de 3.5 µm, tamaño de la pre-columna 2.1 X 10 mm; Waters Corp., Milford, Massachussets, USA) y la columna (Symmetry C18; tamaño de la partícula de 5 µm; tamaño de la columna 2.0 X 150 mm; Waters Corp., Milford, Massachussets, USA) se equilibraron con

acetonitrilo–agua grado HPLC (65:35 v/v) a una velocidad de flujo de 0.4 ml/min. Las separaciones se realizaron en la columna a 40 °C.

Se utilizó un sistema controlador Waters 600–MS para separar la fase móvil. Las hormonas se evaluaron con un detector UV (486 Waters UV absorbance detector) a una absorbancia de 245 nm. Los resultados se analizaron con el software Millennium 32 (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA). Se utilizaron estándares que cubrieron el rango de 0–50 µg/dl para la corticosterona y 0–34 ng/ml para la testosterona. Se usó la ecuación de la regresión lineal entre la altura de los picos y la concentración de corticosterona y testosterona para determinar las concentraciones desconocidas. La regresión lineal de la altura del pico de las concentraciones conocidas de corticosterona y testosterona se utilizaron para determinar las concentraciones desconocidas de las muestras. La regresión lineal para la corticosterona fue:  $y = 0.6464 + 0.01655x$  ( $r^2 = 0,99986$ ). Para la testosterona, la línea de regresión fue:  $y = 0.774x + 0.2181x$  ( $r^2 = 0,99893$ ). El límite de detección del ensayo para la corticosterona fue de 0.05 µg/dl y 0.05 ng/ml para la testosterona.

## 6.7 PRODUCCIÓN DE PERÓXIDOS

La producción de las ERO se determinó indirectamente por la fluorescencia de la diclorofluoresceína (DCF). La técnica se basa en la oxidación de la sonda 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA, SIGMA) [Kumar y Muralidhara 2007; LeBel et al. 1992], la cual no es fluorescente y en presencia de peróxidos en el interior de las células se convierte en DCF (producto verde fluorescente).

Se pesó 0.1 g de testículo y se homogeneizó en 600 µl de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Se colocaron 200 µl del homogeneizado en una micro placa y se pre-incubaron con DCFH-DA 10 µM a 37 °C en la oscuridad. Después de 30 minutos de incubación, la fluorescencia de la DCF se registró en un espectrofotómetro DTX 880 detector multimodal fluorescente (Beckman Coulter) a 480 nm de excitación y 520 nm de emisión. Las muestras de cada pocillo se recuperaron y se determinó la cantidad de proteínas totales contenidas en cada muestra por el método del ácido bicinconínico (BCA). Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia.

## 6.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para la determinación de las actividades enzimáticas de las proteínas SOD, catalasa y GPx, se utilizó como herramienta principal el espectrofotómetro. Las determinaciones por espectrofotometría requirieron que se llevara a cabo previamente una reacción química específica que varió según el analito a determinar. Los productos finales de esta reacción se cuantificaron utilizando la lectura de la absorbancia de la muestra, así como la de los estándares conocidos. Se calculó el delta de la absorbancia para establecer la relación entre dos puntos de absorbancia, es decir, la absorbancia final menos la absorbancia inicial.

### 6.8.1 *Preparación del homogeneizado testicular*

El tejido testicular se homogeneizó en buffer HEPES 0.1 M, pH 7.4 y se centrifugó (5000 x g a 4 °C durante 10 minutos) [Arenas-Rios et al. 2007]. Se

recuperó el sobrenadante y se utilizó para la determinación de las actividades enzimáticas, tal como se describe.

### *6.8.2 Actividad total de la superóxido dismutasa*

Este ensayo mide la actividad de las isoformas de la SOD presentes en organismos vivos: Cu/Zn-SOD, Fe/Mn-SOD y SOD-Ex. La actividad total de la SOD [EC 1.15.1.1] se midió por la disminución en la formación del cromógeno debido a la eliminación del  $O_2^{\cdot -}$  por acción de la SOD [Arthur y Boyne 1985]. En la determinación de la actividad de la SOD se empleó xantina y xantina oxidasa (XOD) para la formación de  $O_2^{\cdot -}$ , y su posterior reacción con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (INT), con lo que se formó el colorante rojo formazán. El cromógeno formado se cuantificó espectrofotométricamente a 505 nm a 37 °C.

El sistema de reacción consistió de 25  $\mu$ l de sobrenadante como fuente de la enzima, 850  $\mu$ l de substrato mixto (xantina 0.05 mmol/l; INT 0.025 mmol/l) y 125  $\mu$ l de XOD (80 U/l). Las muestras se homogeneizaron después de adicionar cada uno de los reactivos, y posteriormente se registró la absorbancia de cada muestra. Previo a cada determinación se realizó una curva de calibración a partir de una solución estándar de SOD. La actividad de la SOD total se expresó como U/mg de proteína (U=cantidad de enzima que inhibe el 50% de formazán).

### *6.8.3 Actividad de la catalasa*

La actividad de la catalasa [EC 1.11.1.6] se determinó en un sistema de reacción que contuvo permanganato de potasio ( $KMnO_4$ ) cuya coloración intensa se

registró a 480 nm. La técnica consiste en la disminución del color debido a la reacción de peroxidación provocada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hacia el KMnO<sub>4</sub>, y el mantenimiento del color en presencia de la catalasa [Cohen et al. 1970]. La enzima contenida en el sobrenadante se solubilizó, se activó tratándola en frío con 1 µl de etanol (96%) durante 30 minutos y con tritón X-100 durante 5 minutos. Posteriormente, las soluciones se diluyeron 1:5 con buffer HEPES 0.1 M, pH 7.4.

El sistema de reacción consistió de 100 µl de solución como fuente de la enzima en 500 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se agitó y se permitió la reacción por 3 minutos a temperatura ambiente (22 ± 2 °C). La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 6 N, se agregaron 700 µl de KMnO<sub>4</sub> 0.01 N y se leyó en el espectrofotómetro a 480 nm a 37 °C. La actividad de la catalasa se expresó como k/mg de proteína (k=constante de velocidad de la reacción de primer orden).

#### *6.8.4 Actividad total de la glutatión peroxidasa*

Este ensayo mide la actividad de las isoformas de la GPx presentes en organismos vivos: GPx-1, GPx-2, GPx-3, GPx-4 y GPx-5. La actividad total de la GPx [EC 1.11.1.9] se midió indirectamente por una reacción acoplada a la glutatión reductasa [Paglia y Valentine 1967]. El glutatión oxidado, producido por la reacción del hidroperóxido de cumeno con la GPx, se recicló a su forma reducida por la glutatión reductasa y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) como donador de protones. La oxidación del NADPH a NADP<sup>+</sup> se acompaña por una disminución en la absorbancia a 340 nm a 37 °C. La actividad de la enzima se

expresó como U/mg de proteína (U=cantidad de enzima que oxida 1.0 nmol de NADPH hacia NADP<sup>+</sup>/minuto).

## 6.9 INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS SOD1, CATALASA y GPx-4 POR WESTERN BLOT

En este trabajo se utilizó la técnica analítica de Western blot para el estudio del contenido de las enzimas SOD1, catalasa y GPx-4. Este método, descrito por primera vez por Towbin y colaboradores [Towbin et al. 1979], permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad de Western blot se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés.

### 6.9.1 *Extracción de las proteínas totales*

Las muestras del tejido testicular se homogeneizaron con 250 µl de buffer de lisis [10 ml de M-PER Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific; 1 pastilla de inhibidor de proteasas, Complete Mini; 100 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.1 M y 100 µl de ditioneitol (DTT) 1 M] durante 15-20 segundos. Posteriormente, se incubaron en frío durante 15 minutos y se centrifugaron (13000 x g a 4 °C durante 10 minutos). El sobrenadante se recuperó y se almacenó a -80 °C. Previo a la electroforesis, se tomó una alícuota de cada muestra para cuantificar la concentración de proteínas totales por el método del ácido bicinonínico.

### *6.9.2 Electroforesis de las proteínas totales en geles SDS-PAGE*

Para el apilamiento de las proteínas totales se prepararon 5 ml del gel concentrador al 4% con 3.05 ml de agua destilada, 1.25 ml de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 50  $\mu$ l de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%, 650  $\mu$ l de acrilamida-bis al 30%, 10  $\mu$ l de N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina (TEMED) y 25  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10%. Para la separación de las proteínas totales se prepararon 10 ml del gel de corrida al 10 % con 4.02 ml de agua destilada, 2.5 ml de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 100  $\mu$ l de SDS al 10%, 3.33 ml de acrilamida-bis al 30%, 10  $\mu$ l de TEMED y 50  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10%.

En tubos Eppendorf se colocaron 30  $\mu$ g de las proteínas totales de cada muestra, en un volumen final de 40  $\mu$ l con buffer para muestras 4X (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 2-mercaptoetanol, SDS al 10%, azul de bromofenol 0.05%, glicerol y agua destilada). Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente, el marcador de peso molecular (SeeBlue Plus2, Invitrogen) y las muestras de las proteínas totales se colocaron en los carriles del gel. Para el corrimiento electroforético se utilizó un buffer de corrida (Tris Base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1%, pH 8.3). El corrimiento se realizó a 120 voltios durante 90 minutos en una cámara de electroforesis vertical (BIO RAD, USA).

### *6.9.3 Transferencia de las proteínas totales a la membrana de PVDF*

Transcurrido el tiempo de corrimiento, se identificó la posición de las proteínas de interés: SOD1 23 KDa, catalasa 60 KDa, GPx-4 21 KDa y  $\beta$ -actina 42 KDa como

control interno. Se utilizó únicamente el gel de corrida, el cual contenía las proteínas de interés. El gel se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, GE Healthcare). La transferencia se llevó a cabo con Towbin buffer frío (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% v/v, pH 8.3) a un voltaje de 120 voltios a 4 °C durante 120 minutos, en agitación constante.

#### 6.9.4 Anticuerpos primarios, secundarios y revelado

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó durante 60 minutos a temperatura ambiente con solución salina tamponada con Tris (TBS) y Tween 20 (NaCl 137 mM, Tris-HCl 20 mM, Tween 20 0.1%, pH 7.5) más 5% de leche descremada. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó dos veces con TBS-Tween 20. La membrana se colocó en una solución que contenía TBS-Tween 20 y el anticuerpo primario de la proteína que se deseó visualizar de acuerdo a la Tabla 3. La incubación se realizó durante toda la noche en agitación ligera a 4 °C. La membrana se lavó tres veces durante 15 minutos con TBS-Tween 20. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 3) a temperatura ambiente durante 120 minutos en agitación suave. Se lavó la membrana dos veces durante 15 minutos con TBS-Tween 20 y una vez con TBS solo.

**Tabla 3.** Anticuerpos utilizados para el Western blot

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Anticuerpos secundarios</b>
SOD1. Dilución 1:3000	Goat-antirabbit. Dilución 1:10000)
Catalasa. Dilución 1:3000	Goat-antimouse. Dilución 1:10000)
GPx-4. Dilución 1:200	Goat-antirabbit. Dilución 1:10000)
$\beta$ -actina. Dilución 1:3000	

Como sustrato del anticuerpo secundario se agregaron 500 µl de luminol (SuperSignal West Pico) y 500 µl de peróxido (SuperSignal West Pico Stable). La identificación se realizó en un fotodocumentador (KODAK Gel Logic 1500 Imaging System) para observar la luminiscencia generada en la reacción de la peroxidasa de rábano picante, indicando la presencia de la proteína.

## 6.10 DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDANTE

En relación con el daño oxidante, se realizaron estudios específicos que consistieron en la evaluación de indicadores de daño a biomoléculas, como lo fue el daño a los lípidos, a través de la cuantificación de hidroperóxidos lipídicos.

### *6.10.1 Evaluación de la peroxidación lipídica*

El grado de peroxidación lipídica se determinó usando un kit comercial (Calbiochem, USA), el cual midió directamente los hidroperóxidos lipídicos utilizando reacciones redox con iones ferroso [Mihaljevic et al. 1996]. Los hidroperóxidos lipídicos reaccionaron con los iones ferroso para producir iones férrico, éstos se detectados empleando iones tiocianato como cromógeno.

Se pesó 0.1 g de testículo y se homogeneizó en 400 µl de agua grado HPLC. Se colocaron 300 µl del homogeneizado en otro tubo y se adicionaron 600 µl de cloroformo desoxigenado. La solución se mezcló y se centrifugó (1500 x *g* a 0 °C durante 5 minutos) para extraer los hidroperóxidos lipídicos de la capa de cloroformo. Se tomaron 500 µl del extracto de cloroformo, se combinaron con 450 µl de una mezcla de cloroformo:metanol (67:33 v/v) y 50 µl del cromógeno recién preparado

(sulfato ferroso 4.5 mM en HCl 0.2 M y tiocianato de amonio al 3%) en un tubo de vidrio. Después de 5 minutos de incubación se midió la absorbancia a 500 nm. Las concentraciones de hidroperóxidos lipídicos en las muestras se calcularon a partir de una curva estándar. Cada muestra se analizó por duplicado, las concentraciones de hidroperóxidos lipídicos se expresaron como nmol/mg de proteína.

## 6.11 ANÁLISIS DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

Las evaluaciones de los marcadores de la calidad espermática proporcionan información acerca de las propiedades estructurales (contar con cabeza y flagelo normales) y de la integridad de la membrana plasmática, así como de atributos funcionales como la movilidad. En conjunto estos parámetros pretenden valorar las propiedades que permitan identificar a un conjunto de espermatozoides de buena calidad, o bien, emplearse como marcadores de daño.

### *6.11.1 Obtención de los espermatozoides de la cauda del epidídimo*

Inmediatamente después de que los animales se anestesiaran, los testículos se expusieron y se identificó la cauda del epidídimo, se hizo una incisión de la túnica epididimaria con exposición del conducto epididimario. La región caudal se separó y se lavó en solución salina. Después se transfirió a 1 ml de solución salina y se realizaron cortes a la cauda del epidídimo para permitir que los espermatozoides salieran y se dispersaron por agitación suave, a esta mezcla se le llamó suspensión espermática epididimaria. La obtención de los espermatozoides se realizó para el análisis cualitativo y cuantitativo.

### *6.11.2 Determinación de la movilidad total espermática*

Para determinar la movilidad total espermática (movimiento individual de los espermatozoides, clasificada en dos categorías: movilidad progresiva y no progresiva) se colocaron 10 µl de suspensión espermática epididimaria sobre un portaobjetos, previamente etiquetado y atemperado a 37 °C y se cubrieron con un cubreobjetos 50 x 24 mm previamente atemperado a 37 °C.

La preparación con la suspensión espermática epididimaria se colocó en un microscopio de campo claro y se enfocó a 40X. Se contaron 200 espermatozoides con un contador manual. Se registraron los espermatozoides que presentaron movilidad progresiva y no progresiva. El resto de los espermatozoides se contabilizaron como inmóviles. La movilidad de los espermatozoides se expresó como el porcentaje de espermatozoides móviles del total de espermatozoides contados.

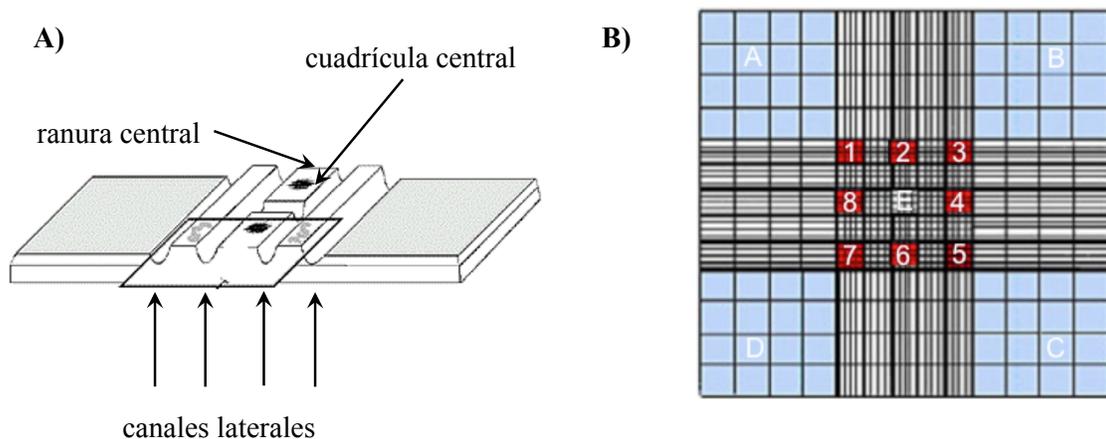
### *6.11.3 Determinación de la viabilidad espermática*

La viabilidad espermática considera el número de espermatozoides vivos, expresado en porcentaje. Se colocaron 10 µl de suspensión espermática epididimaria sobre un portaobjetos, previamente etiquetado y atemperado a 37 °C. Sobre la muestra se colocaron 10 µl del colorante (eosina Y 0.1 M y nigrosina al 10%) y se cubrieron con un cubreobjetos 50 x 24 mm previamente atemperado a 37 °C. La preparación se analizó en un microscopio de campo claro y se enfocó a 40X. En un mismo campo se contaron los espermatozoides que se tiñeron de rosa

(espermatozoides que se consideraron muertos) y los que no se tiñeron (espermatozoides que se consideraron vivos), hasta contar un total de 200 espermatozoides. Se hizo una regla de tres y el resultado se expresó en porcentaje.

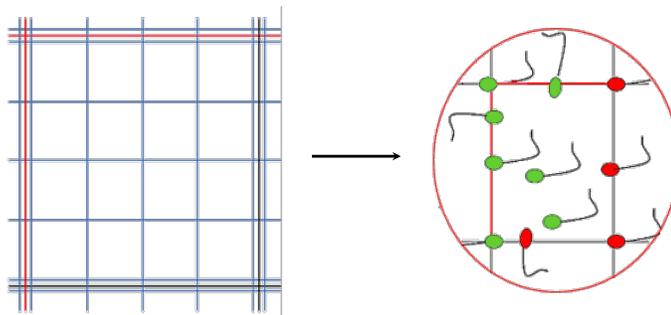
#### 6.11.4 Determinación de la concentración espermática

La concentración espermática se determinó con el número de espermatozoides expresado en  $10^6/\text{ml}$ . Se tomaron 25  $\mu\text{l}$  de la suspensión espermática epididimaria y se colocaron en 500  $\mu\text{l}$  de agua destilada. De esta mezcla se tomaron 10  $\mu\text{l}$ , se colocaron por la ranura central hasta llegar a la cuadrícula central de la cámara de Neubauer. Se colocaron otros 10  $\mu\text{l}$  en la otra cuadrícula central. Se dejaron transcurrir 10 minutos para permitir que los espermatozoides precipitaran en el fondo de la cámara. El conteo espermático se realizó en los subcuadros marcados con rojo con el objetivo 40X (Figura 10). La concentración de espermatozoides se expresó en  $10^6/\text{ml}$ .



**Figura 10.** Esquema de la cámara de Neubauer. (A) vista general de la cámara de Neubauer que muestra las dos cuadrículas y la ranura central. (B) vista detallada de una cuadrícula que muestra los cuadros A, B, C y D que corresponden a las esquinas de la cuadrícula; el cuadro E es central. El cuadro E se divide en 25 subcuadros, de los cuales E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 y E8 corresponden a la periferia del cuadro E.

Cada subcuadro contiene 16 cuadros más pequeños. Se contaron las cabezas de los espermatozoides que se encontraron en los 16 cuadros pequeños, así como las cabezas que se encontraron sobre la línea roja que formaron los límites (superior izquierdo) de cada subcuadro formando una "L invertida" (Figura 11). Se contaron las cabezas que tocaron la línea roja de cada subcuadro y no se contaron las cabezas que tocaron las líneas negras en cada subcuadro.



**Figura 11.** Esquema que muestra un subcuadro, hipotéticamente el E1. Se indican los límites superior e izquierdo con la línea roja formando una "L invertida". Para el conteo se consideraron los cabezas de los espermatozoides que estuvieron en los cuadros y los que tocaron la "L invertida". Los espermatozoides en color verde se tomaron en cuenta para el conteo, mientras que los espermatozoides en color rojo se excluyeron.

La concentración se calculó con la siguiente fórmula:

$n \times 21 \times 10\,000 \times 8 / 2$ , donde:

n, es el número de espermatozoides que se contaron en ambas cuadrículas.

21, es el factor de dilución.

10 000, es la profundidad de la cámara de Neubauer.

8, es el número de subcuadros que se contaron.

2, es el número de cuadrículas que se ocuparon.

### *6.11.5 Determinación de la morfología espermática*

La morfología de los espermatozoides se evaluó en la misma muestra que se observó la viabilidad. Se contaron 500 espermatozoides al azar en diferentes campos. La muestra se observó con el objetivo de 40X. Se tomaron en cuenta las anomalías en la cabeza, el flagelo y la presencia de la gota citoplasmática. La morfología se expresó en porcentaje.

### 6.12 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS TOTALES

El contenido de las proteínas totales de las muestras se determinó utilizando la técnica del BCA usando el kit comercial BCA (Pierce), con la formulación basada en un detergente compatible con el ácido bicinónico para la detección colorimétrica y la cuantificación de proteínas totales en el homogeneizado [Smith et al. 1985]. Las concentraciones desconocidas de las proteínas se determinaron mediante la comparación con diluciones en serie (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000  $\mu\text{g/ml}$ ) de concentraciones conocidas de proteínas estándar de albúmina sérica bovina (BSA). Cada patrón y las muestras se colocaron en una microplaca de 96 pozos. La microplaca se incubó a 37 °C protegida de la luz durante 30 minutos. Se determinó el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm (detector 880 multimodo DTX, Beckman Coulter). Las concentraciones finales de las proteínas desconocidas se determinaron por interpolación de los valores elaborados a partir de una curva estándar de los valores de BSA.

### 6.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

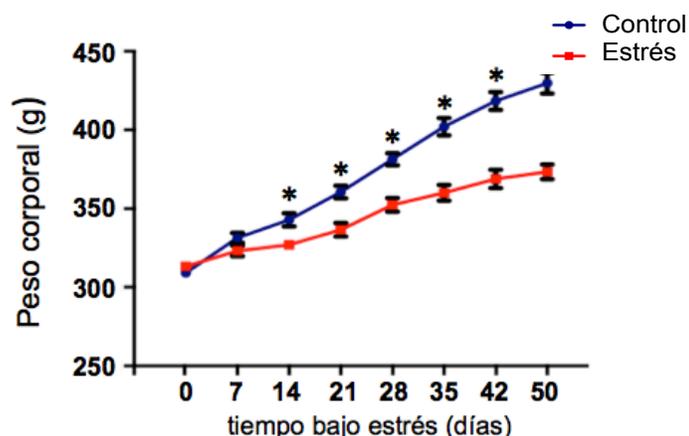
Las bases de datos se crearon en Excel. El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism 6.0. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE). El peso corporal se analizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas. Las concentraciones de la corticosterona y la testosterona, las concentraciones de hidroperóxidos lipídicos, la actividad de las enzimas antioxidantes, los parámetros de la calidad espermática del estrés agudo y la detección de ERO del estrés agudo y crónico se analizaron mediante un ANOVA de una vía. El peso testicular, las concentraciones de la corticosterona y la testosterona, las concentraciones de hidroperóxidos lipídicos, la actividad de enzimas antioxidantes y la calidad espermática del estrés crónico se analizaron por ANOVA de dos vías con la condición experimental y los días como factores. La prueba de Tukey-Kramer se utilizó para hacer las comparaciones múltiples. Las correlaciones entre la corticosterona con los marcadores del estrés oxidante y la testosterona con la calidad espermática se analizaron mediante la correlación de Pearson. El nivel de significancia estadística se fijó en  $p < 0.05$ .

## 7 RESULTADOS

Los resultados que a continuación se presentan muestran el impacto del estrés agudo y crónico en la fisiología testicular. Además, revelan cómo las células testiculares responden ante el reto de la desregulación en el estado redox provocado por una situación estresante.

### 7.1 SEGUIMIENTO SEMANAL DEL PESO CORPORAL A PARTIR DEL INICIO DEL ESTRÉS CRÓNICO

El peso corporal de los grupos control y los grupos de estrés se registró desde el inicio del estudio y cada siete días. El peso corporal de los machos estresados no aumentó de manera similar al grupo control, ya que a partir de los 14 días de tratamiento el grupo de estrés redujo significativamente la ganancia de peso, con la diferencia del 4.8% con respecto al grupo control y dicha disminución continuó hasta el día 50: 21 días 6.6%, 28 días 7.6%, 35 días 10.4%, 42 días 10.7% y 50 días 13.1% ( $p < 0.05$ ; Figura 12). De esta manera se confirmó que la disminución en la ganancia de peso corporal se relaciona con la inducción del estrés crónico.



**Figura 12.** Cambios en el peso corporal en ratas control (línea azul) y ratas sometidas a estrés crónico por inmersión en agua fría (línea roja). Las evaluaciones se hicieron cada siete días. Cada punto representa la media  $\pm$  DE (n=5). En el gráfico se observa el inicio de la disminución en la ganancia de peso a los 14 días de haber comenzado el estrés. ANOVA de medidas repetidas, Tukey-Kramer. \* $p < 0.05$  comparado con el grupo control.

## 7.2 PESO TESTICULAR DESPUÉS DEL ESTRÉS CRÓNICO

El peso absoluto de los testículos se mantuvo sin cambios después de 20 y 40 días de estrés consecutivo, mientras que a los 50 días de estrés el peso testicular fue significativamente menor (11.4%) que en el grupo control ( $p < 0.05$ ; Tabla 3).

**Tabla 3.** Pesos testiculares en machos estresados crónicamente por inmersión en agua fría.

Tiempo bajo estrés (días)	20		40		50	
	Control	Estrés	Control	Estrés	Control	Estrés
Testículo (g)	1.74 $\pm$ 0.09	1.68 $\pm$ 0.13	1.76 $\pm$ 0.07	1.75 $\pm$ 0.10	2.01 $\pm$ 0.06	1.78 $\pm$ 0.08*

Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n=5).

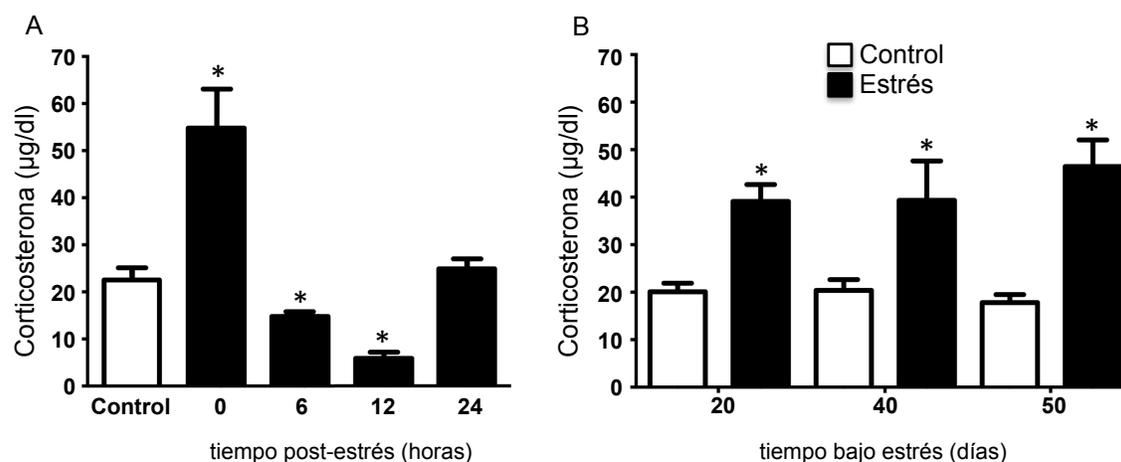
Los datos se analizaron con ANOVA de dos vías, seguida de la prueba de Tukey-Kramer.

\* $p < 0.05$  comparado con el grupo control.

### 7.3 INFLUENCIA DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO EN LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LA CORTICOSTERONA

Las concentraciones séricas de la corticosterona se determinaron a las 0, 6, 12 y 24 horas después de solo una sesión de estrés. Las mediciones también se hicieron a los 20, 40 y 50 días de estrés consecutivo. La concentración de corticosterona en el grupo control del estrés agudo fue de  $22.56 \pm 2.60$   $\mu\text{g/dl}$  y la del grupo de estrés al tiempo 0 fue de  $54.78 \pm 8.42$   $\mu\text{g/dl}$ , por lo que aumentó significativamente 142.8% en el tiempo 0 comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ ; Figura 13A). Las concentraciones de corticosterona a las 6, 12 y 24 horas posteriores al estrés fueron de  $14.76 \pm 1.01$   $\mu\text{g/dl}$ ,  $5.85 \pm 1.22$   $\mu\text{g/dl}$  y  $24.86 \pm 2.03$  respectivamente ( $p < 0.05$ ; Figura 13A). Así que, el aumento observado al tiempo 0 no continuó en los tiempos posteriores, al contrario, al tiempo 6 la corticosterona disminuyó significativamente 34.6% y al tiempo 12 la reducción fue del 74.1% comparados con el grupo control. Si bien, las concentraciones de la corticosterona estuvieron fluctuando a lo largo de los diferentes tiempos, a las 24 horas regresaron a concentraciones similares a las del grupo control.

Por otra parte, durante el estrés crónico las concentraciones de la corticosterona aumentaron de manera general. En el grupo estresado durante 20 días consecutivos la corticosterona aumentó significativamente 94.7% ( $p < 0.05$ ; Figura 13B), en los días 40 y 50 de estrés crónico se incrementó 92.9% ( $p < 0.05$ ; Figura 13B) y 160.9% ( $p < 0.05$ ; Figura 13B), respectivamente.



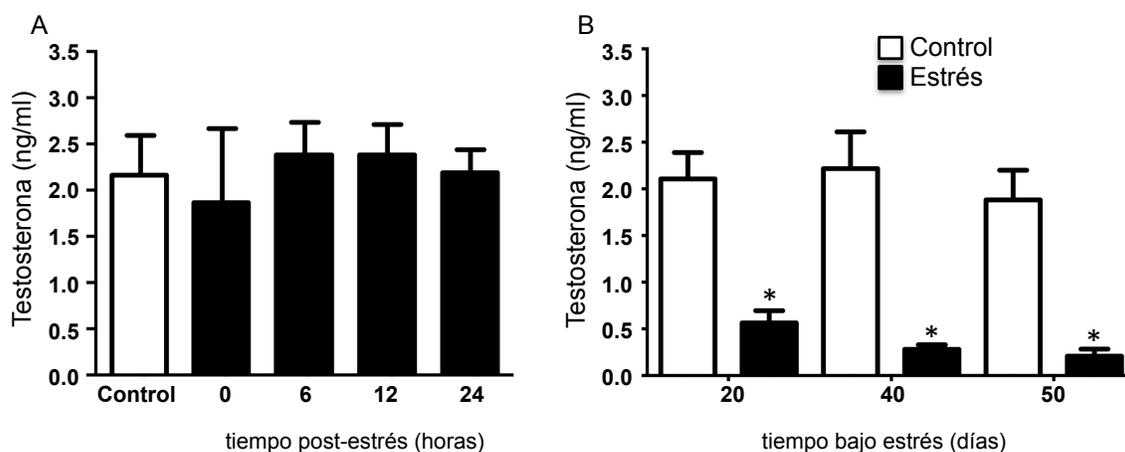
**Figura 13.** Concentraciones séricas de la corticosterona en machos sometidos a estrés. Las concentraciones se obtuvieron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). (A) Los machos se expusieron a una sesión de estrés y las evaluaciones se realizaron a las 0, 6, 12 y 24 horas posteriores al estrés. Se encontró un aumento significativo inmediatamente después de la exposición al estresor y disminuyó a las 6 y 12 horas, regresando a las 24 horas a concentraciones similares a las del grupo control, \* $p < 0.05$  denota diferencias significativas en los grupos de estrés comparados con el grupo control. Los valores del gráfico muestran la media  $\pm$  DE ( $n=5$ ). ANOVA de una vía, Tukey-Kramer. (B) Los machos se estresaron crónicamente durante 20, 40 y 50 días consecutivos. En los tres tiempos estudiados la corticosterona aumentó significativamente por efecto del estrés crónico, \* $p < 0.05$  denota diferencias significativas en los grupos de estrés comparados con su respectivo grupo control. Los valores del gráfico muestran la media  $\pm$  DE ( $n=5$ ). ANOVA de dos vías, Tukey-Kramer.

#### 7.4 INFLUENCIA DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO EN LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LA TESTOSTERONA

Las concentraciones séricas de la testosterona se determinaron a las 0, 6, 12 y 24 horas después de la primera sesión de estrés. También, las mediciones se hicieron a los 20, 40 y 50 días de estrés consecutivo. En ninguno de los grupos experimentales expuestos al estrés agudo se modificaron las concentraciones de la testosterona (Figura 14A).

Durante el estrés crónico, la testosterona disminuyó en los tres tiempos estudiados. En el grupo estresado por 20 días consecutivos la testosterona

disminuyó 73.2% ( $p < 0.05$ ; Figura 14B). En el día 40 la testosterona se redujo significativamente 87.3% ( $p < 0.05$ ; Figura 14B) y en el día 50 la disminución fue del 89% ( $p < 0.05$ ; Figura 14B).



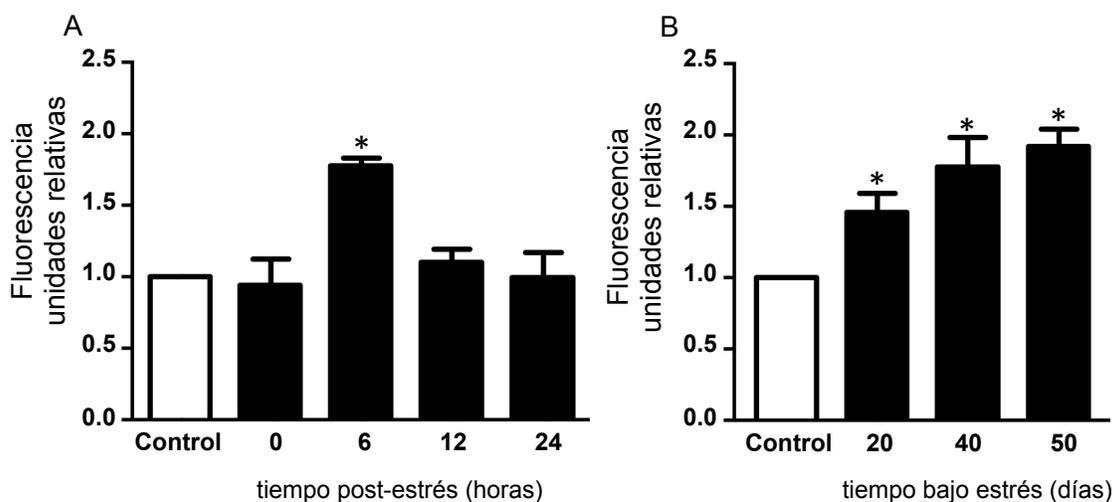
**Figura 14.** Concentraciones séricas de la testosterona en machos sometidos a estrés. Las concentraciones se obtuvieron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). (A) Los machos se expusieron a una sesión de estrés y las evaluaciones se realizaron a las 0, 6, 12 y 24 horas posteriores al estrés, sin encontrarse diferencias significativas en las concentraciones de la hormona. (B) Los machos se estresaron crónicamente durante 20, 40 y 50 días consecutivos. En los tres tiempos estudiados la testosterona disminuyó significativamente por efecto del estrés crónico, \* $p < 0.05$  denota diferencias significativas en los grupos de estrés comparados con su respectivo grupo control. Los valores del gráfico muestran la media  $\pm$  DE ( $n=5$ ). ANOVA de dos vías, Tukey-Kramer.

## 7.5 PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN EL TESTÍCULO DESPUÉS DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO

La evaluación de la fluorescencia generada por la oxidación de la DCF por la presencia de peróxidos fue un parámetro utilizado para determinar de manera indirecta la presencia de ERO en nuestro modelo. Los ensayos realizados por espectrofluorimetría revelan que en las células del testículo de animales estresados de forma aguda no se generan ERO inmediatamente después de que los animales

se expusieron al estresor. Por el contrario, la producción de ERO aumentó significativamente 77.6% a las 6 horas posteriores al estresor con respecto al grupo control y se incrementó 89.0% con respecto al grupo del tiempo 0 ( $p < 0.05$ ; Figura 15A). Este aumento fue momentáneo, ya que a las 12 y 24 horas posteriores a la exposición al estresor, la producción de ERO se mantuvo en concentraciones similares a los grupos control y del tiempo 0.

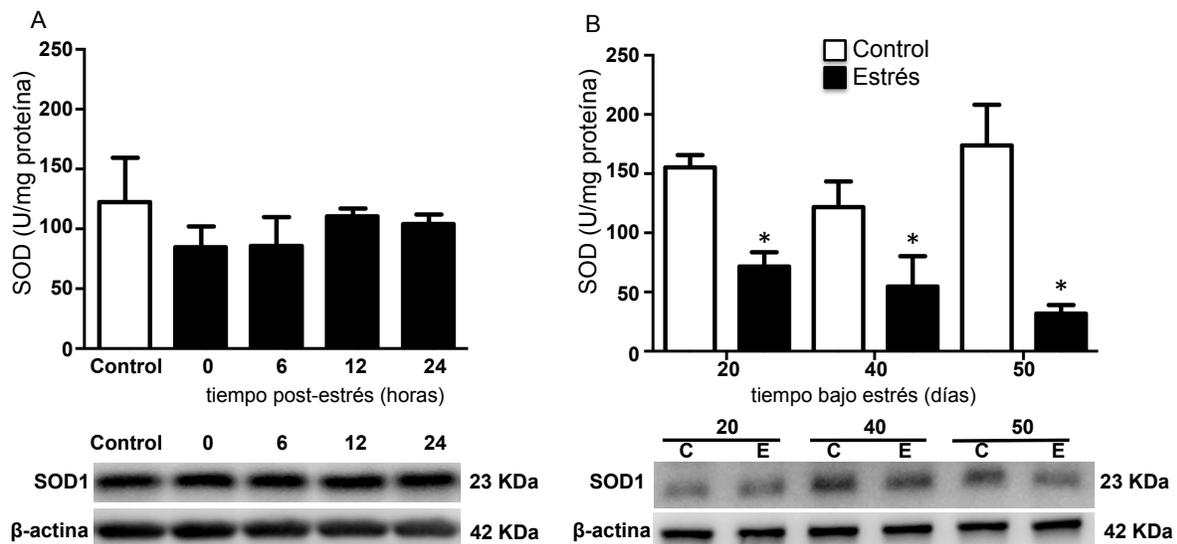
Por el contrario, cuando los animales se estresaron crónicamente, aumentó la generación de ERO en el testículo durante los tres tiempos de exposición al estresor. A partir de los 20 días de estrés crónico la producción de ERO aumentó significativamente 45.8%, a los 40 días el aumento fue de 77.5% y en el día 50 incrementó 92.1% comparados con el grupo control ( $p < 0.05$ ; Figura 15B).



**Figura 15.** Producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en el testículo de animales sometidos a estrés agudo y crónico. La producción de ERO se evaluó por medio de la detección de la fluorescencia de la sonda 2-7 diclorofluoresceína. (A) Los machos se expusieron a una sesión de estrés y las evaluaciones se realizaron a las 0, 6, 12 y 24 horas posteriores al estrés. Únicamente a las 6 horas aumentó significativamente la generación de ERO,  $*p < 0.05$  comparado con los grupos control y tiempo 0. Los valores del gráfico muestran la media  $\pm$  DE ( $n=5$ ). ANOVA de una vía, Tukey-Kramer. (B) Los machos se estresaron crónicamente durante 20, 40 y 50 días consecutivos. En los tres tiempos aumentó significativamente la producción de ERO,  $*p < 0.05$  comparado con el grupo control. Los valores de los tres grupos control se normalizaron a 1 y se representó sólo un grupo control. Los valores del gráfico muestran la media  $\pm$  DE ( $n=5$ ). ANOVA de una vía, Tukey-Kramer.

## 7.6 ACTIVIDAD TOTAL DE LA SOD Y CONTENIDO DE LA ENZIMA SOD1 EN EL TESTÍCULO DESPUÉS DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO

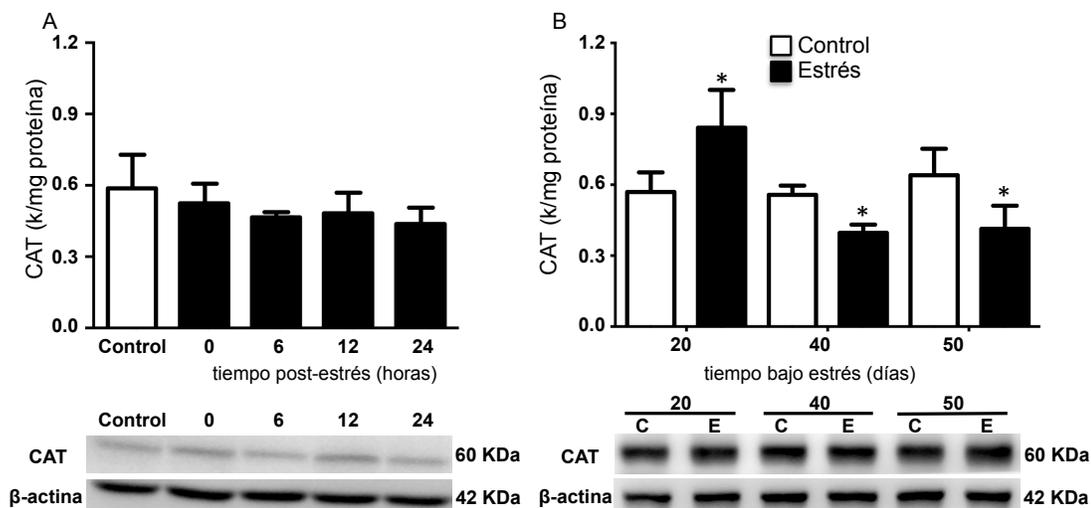
Los efectos perjudiciales del estrés se estudiaron con la medición de la actividad y el contenido de la enzima SOD en el testículo. El estrés agudo no modificó la actividad total de la SOD ni el contenido de la SOD1 (Figura 16A). En los animales estresados crónicamente la actividad total de la SOD disminuyó significativamente 53.9% a los 20 días, 55.1% a los 40 días y 81.7% en el día 50, comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ; Figura 16B). A pesar del descenso en la actividad total de la SOD, el contenido de la SOD1 se mantuvo sin cambios durante el estrés crónico (Figura 16B, panel inferior).



**Figura 16.** Actividad total de la superóxido dismutasa (SOD) y contenido de la SOD1 (panel inferior) en el testículo de ratas estresadas. La actividad total de la SOD se expresó como U/mg de proteína. El contenido de la SOD1 se determinó por Western blot. (A) Los machos se expusieron a una sesión de estrés y las evaluaciones se realizaron a las 0, 6, 12 y 24 horas posteriores al estrés, sin encontrarse diferencias significativas en la actividad y contenido de la enzima. (B) Los machos se estresaron crónicamente durante 20, 40 y 50 días consecutivos. En los tres tiempos estudiados la actividad total de la SOD disminuyó por efecto del estrés crónico, \* $p < 0.05$  denota diferencias significativas en los grupos de estrés comparados con su respectivo grupo control. Los valores del gráfico muestran la media  $\pm$  DE ( $n=5$ ). ANOVA de dos vías, Tukey-Kramer. C, control; E, estrés; U, una unidad de actividad se define como la cantidad de la enzima que inhibe el 50% de formazán.

## 7.7 ACTIVIDAD Y CONTENIDO DE LA ENZIMA CATALASA EN EL TESTÍCULO POR EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO

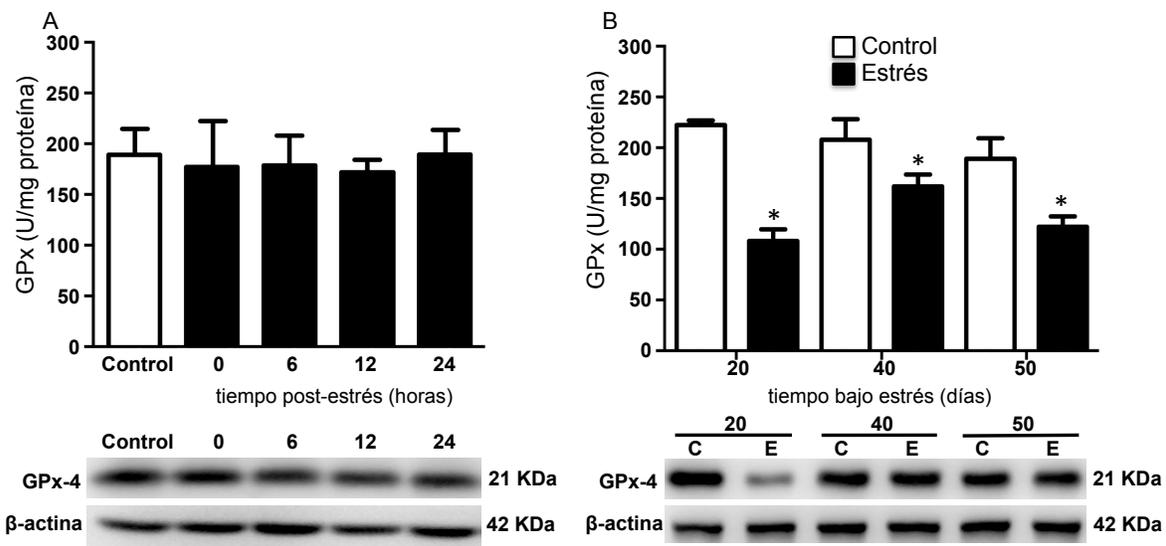
La actividad antioxidante de la catalasa no se modificó y el contenido de la enzima se mantuvo constante en el testículo por efecto del estrés agudo (Figura 17A). En los machos estresados por 20 días la actividad de la catalasa se incrementó 47.6%. Por el contrario, en los animales estresados por 40 días, la actividad de la catalasa disminuyó 28.9%, por lo que, su actividad se mantuvo 71.1% comparado con el grupo control. La actividad de la catalasa continuó baja a los 50 días de estrés, la reducción fue de 35.5% ( $p < 0.05$ ; Figura 17B). A pesar del descenso en la actividad de la catalasa, su contenido se mantuvo sin cambios durante el estrés crónico (Figura 17B, panel inferior).



**Figura 17.** Actividad y contenido de la enzima catalasa (CAT, panel inferior) en el testículo de ratas estresadas. La actividad de la catalasa se expresó como los cambios en k/mg de proteína. El contenido de la catalasa se determinó por Western blot. (A) Los machos se expusieron a una sesión de estrés y las evaluaciones se realizaron a las 0, 6, 12 y 24 horas posteriores al estrés, sin encontrarse diferencias significativas en la actividad y contenido de la enzima. (B) Los machos se estresaron crónicamente durante 20, 40 y 50 días consecutivos. La actividad de la catalasa aumentó a los 20 días de estrés y disminuyó a los 40 y 50 días, \* $p < 0.05$  denota diferencias significativas en los grupos de estrés comparados con su respectivo grupo control. Los valores del gráfico muestran la media  $\pm$  DE ( $n=5$ ). ANOVA de dos vías, Tukey-Kramer. C, control; E, estrés; k, constante de velocidad de la reacción de primer orden.

## 7.8 ACTIVIDAD TOTAL DE LA GPx Y CONTENIDO DE LA ENZIMA GPx-4 EN EL TESTÍCULO POR EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO

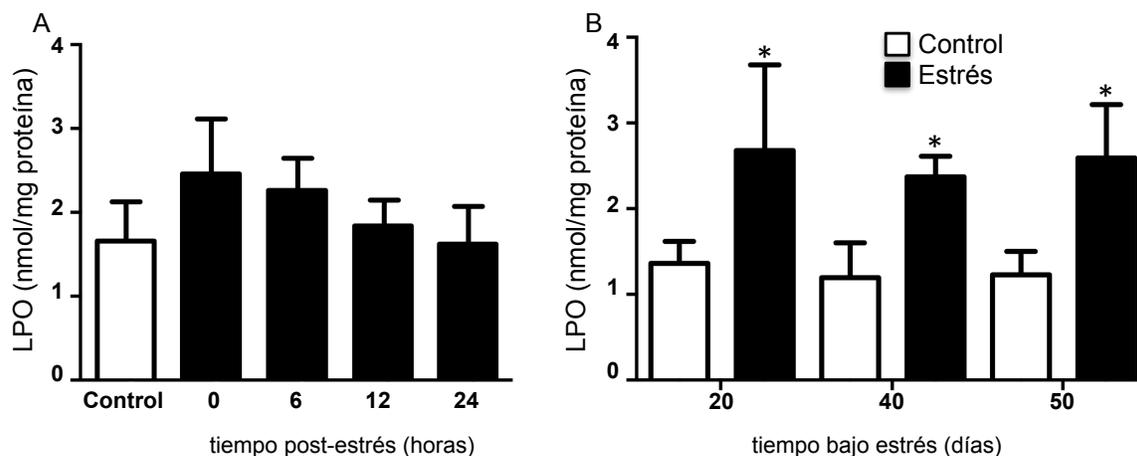
El estrés agudo no modificó la actividad total de la GPx ni el contenido de la GPx-4 en el testículo de los machos tratados (Figura 18A). En los animales estresados por 20 días, la actividad total de la GPx disminuyó 48.7%. La actividad de la GPx se mantuvo abajo a los 40 días de estrés, la reducción fue del 22.1%. De forma similar, a los 50 días de estrés la actividad de la enzima se redujo 64.6%, comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ; Figura 18B). A pesar del descenso en la actividad total de la GPx, la GPx-4 únicamente disminuyó su contenido a los 20 días de estrés crónico (Figura 18B, panel inferior).



**Figura 18.** Actividad total de la glutatión peroxidasa (GPx) y contenido de la GPx-4 (panel inferior) en el testículo de ratas estresadas. La actividad de la GPx se expresó como U/mg de proteína. El contenido de la GPx-4 se determinó por Western blot. (A) Los machos se expusieron a una sesión de estrés y las evaluaciones se realizaron a las 0, 6, 12 y 24 horas posteriores al estrés, sin encontrarse diferencias significativas en la actividad y contenido de la enzima. (B) Los machos se estresaron crónicamente durante 20, 40 y 50 días consecutivos. En los tres tiempos estudiados la actividad total de la GPx disminuyó por efecto del estrés crónico,  $*p < 0.05$  denota las diferencias significativas en los grupos de estrés comparados con su respectivo grupo control. El Western blot mostró que únicamente a los 20 días de estrés el contenido de la GPx-4 disminuyó. Los valores del gráfico muestran la media  $\pm$  DE ( $n=5$ ). ANOVA de dos vías, Tukey-Kramer. C, control; E, estrés; U, cantidad de enzima que oxida 1.0 nmol de NADPH hacia  $NADP^+$ /minuto.

## 7.9 GENERACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS POR EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO EN EL TESTÍCULO

La medición de la peroxidación lipídica en el testículo se realizó para establecer una relación entre la posible generación de estrés oxidante y la oxidación lipídica, como un marcador de daño. Las concentraciones de hidroperóxidos lipídicos en el testículo se mantuvieron sin cambios inmediatamente después de que las ratas se expusieron por primera vez al estresor (Figura 19A). Por el contrario, durante el estrés crónico, las concentraciones de hidroperóxidos lipídicos aumentaron significativamente en los tres tiempos estudiados. Después de 20 días de estrés la concentración de hidroperóxidos lipídicos aumentó significativamente 96.4% ( $p < 0.05$ ; Figura 19B), a los 40 días aumentó 98.7% ( $p < 0.05$ ; Figura 19B) y en el día 50 110.7% ( $p < 0.05$ ; Figura 19B).



**Figura 19.** La peroxidación lipídica (LPO) en el testículo de ratas estresadas aguda y crónicamente. La determinación de la LPO se realizó mediante la medición directa de los hidroperóxidos lipídicos utilizando reacciones redox con el ion ferroso. (A) Los machos se expusieron a una sesión de estrés y las evaluaciones se realizaron a las 0, 6, 12 y 24 horas posteriores al estrés, sin encontrarse diferencias significativas en las concentraciones de hidroperóxidos lipídicos. (B) Los machos se estresaron crónicamente durante 20, 40 y 50 días consecutivos. En los tres tiempos estudiados las concentraciones aumentaron significativamente por efecto del estrés crónico, \* $p < 0.05$  denota diferencias significativas en los grupos de estrés comparados con su respectivo grupo control. Los valores del gráfico muestran la media  $\pm$  DE ( $n=5$ ). ANOVA de dos vías, Tukey-Kramer.

## 7.10 CALIDAD ESPERMÁTICA DESPUÉS DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO

La calidad espermática no se modificó por la exposición al estrés agudo (Tabla 4). Por el contrario, la movilidad total de los espermatozoides disminuyó significativamente en los machos sometidos al estrés crónico. La movilidad de los espermatozoides disminuyó 25.0% a los 20 días, 24.8% a los 40 días y 28.0% a los 50 días de estrés ( $p < 0.05$ ; Tabla 5).

Asimismo, la viabilidad de los espermatozoides se redujo significativamente en los 20, 40 y 50 días consecutivos de estrés, la reducción fue del 21.6%, 22.6% y 15.5% respectivamente ( $p < 0.05$ ; Tabla 5).

La cuenta espermática total de los grupos estresados a los 20, 40 y 50 días fue significativamente menor comparada con los grupos control, la disminución fue del 44.7%, 43.2% y 30.9% respectivamente ( $p < 0.05$ ; Tabla 5).

El porcentaje de espermatozoides anormales aumentó significativamente 36% en el grupo estresado por 20 días. De forma similar, después de 40 y 50 días de estrés las anomalías morfológicas se incrementaron 49.1% y 35.7%, respectivamente ( $p < 0.05$ ; Tabla 5).

**Tabla 4.** Efecto del estrés agudo por inmersión en agua fría en los parámetros de calidad espermática.

Parámetros	Control	Tiempo posterior al estrés (horas)			
		0	6	12	24
Movilidad total (%)	85.20±4.9	83.20±6.5	81.25±2.9	84.60±5.4	84.40±4.2
Viabilidad (%)	84.80±3.9	84.80±1.7	86.25±2.8	83.80±4.8	80.60±5.3
Cuenta espermática (10 <sup>6</sup> /ml)	131.71±11.5	132.92±7.7	125.29±16.9	130.56±12.5	134.58±18.5
Anormalidades morfológicas (%)	7.96±2.3	8.04±2.3	9.6±1.8	8.30±1.4	8.76±0.8

Los datos se expresan como la media ± DE (n=5).

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía.

**Tabla 5.** Efecto del estrés crónico por inmersión en agua fría en los parámetros de la calidad espermática.

Tiempo bajo estrés (días)	20		40		50	
	Control	Estrés	Control	Estrés	Control	Estrés
Movilidad total (%)	83.75±3.0	62.80±12.3*	84.80±5.0	63.80±3.1*	83.60±2.2	60.20±11.2*
Viabilidad (%)	86.45±4.3	67.75±8.2*	82.94±4.0	64.20±7.4*	84.55±5.1	71.45±7.0*
Cuenta espermática (10 <sup>6</sup> /ml)	127.9±29.8	70.77±17.9*	143.42±31.7	81.4±20.1*	123.82±21.1	85.55±28.7*
Anormalidades morfológicas (%)	8.08±0.8	11.0±1.4*	8.80±0.9	13.12±2.4*	9.64±1.2	13.08±1.2*

Los datos se expresan como la media ± DE (n=5).

Los datos se analizaron con ANOVA de dos vías, seguida de la prueba de Tukey-Kramer.

\*p<0.05 comparado con el grupo control.

## 7.11 CORRELACIÓN DE LA CORTICOSTERONA CON LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDANTE Y LA TESTOSTERONA

La correlación entre la corticosterona y los marcadores de estrés oxidante se muestran en la Tabla 6. Cuando se compararon las correlaciones de los parámetros del estrés oxidante, se encontró la relación entre el aumento en la corticosterona sérica durante el estrés crónico con la generación de ERO y con el aumento del daño a los lípidos a los 20, 40 y 50 días de estrés. Por el contrario, el aumento en la corticosterona se relacionó de forma inversa, es decir, cuando la hormona se incrementó, la SOD y la GPx disminuyeron su actividad total en los tres tiempos estudiados. Asimismo, cuando la corticosterona aumentó a los 20 días de estrés, la actividad de la catalasa también aumentó, contrario a lo que sucedió a los 50 días de estrés, ya que en este tiempo la relación fue a la inversa, aumentó la corticosterona y disminuyó la actividad de la catalasa. Sin embargo, a los 40 días de estrés no se encontró relación entre la corticosterona y la actividad de esta enzima.

Por otra parte, con el aumento de la corticosterona durante el estrés crónico se relacionó con la disminución en la testosterona en los tres tiempos estudiados.

**Tabla 6.** Correlación de Pearson entre la corticosterona sérica y los marcadores de estrés oxidante (especies reactivas del oxígeno (ERO), peróxidos lipídicos (LPO), actividad de la superóxido dismutasa total (SOD), actividad de la catalasa, actividad de la glutatión peroxidasa total (GPx)), y las concentraciones séricas de testosterona durante el estrés crónico (20, 40 y 50 días consecutivos de exposición al estresor).

Tiempo bajo estrés (días)	20	40	50
Parámetros			
ERO	0.847 (0.002)	0.750 (0.012)	0.974 (0.000)
LPO	0.773 (0.024)	0.828 (0.006)	0.771 (0.009)
SOD	-0.957 (0.000)	-0.700 (0.024)	-0.925 (0.000)
Catalasa	0.651 (0.041)	-0.644 (0.118)	-0.682 (0.030)
GPx	-0.937 (0.000)	-0.822 (0.004)	-0.893 (0.001)
Testosterona	-0.899 (0.000)	-0.848 (0.002)	-0.938 (0.000)

R (*p*). *p*=nivel de significancia (2-colas)

## 7.12 CORRELACIÓN ENTRE LA TESTOSTERONA Y LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS

La correlación entre la testosterona y los parámetros espermáticos se muestran en la Tabla 7. Cuando se compararon las correlaciones de los parámetros espermáticos, se encontró la relación entre la disminución en la testosterona sérica durante el estrés crónico con las reducciones de la movilidad total, de la viabilidad y de la cuenta espermática a los 20, 40 y 50 días de estrés. Por el contrario, el descenso en la testosterona se relacionó de forma inversa, es decir, cuando la hormona disminuyó, también aumentó en la cuenta de espermatozoides anormales.

**Tabla 7.** Correlación de Pearson entre la testosterona sérica y la calidad espermática (movilidad total, viabilidad, cuenta y morfología espermática) durante el estrés crónico (20, 40 y 50 días consecutivos de exposición al estresor).

Tiempo bajo estrés (días)	20	40	50
Parámetros			
Movilidad total	0.812 (0.008)	0.933 (0.000)	0.835 (0.003)
Viabilidad	0.787 (0.007)	0.956 (0.000)	0.943 (0.000)
Cuenta espermática	0.824 (0.003)	0.918 (0.000)	0.837 (0.003)
Anormalidades morfológicas	-0.834 (0.003)	-0.752 (0.012)	-0.888 (0.001)

R (*p*). *p*=nivel de significancia (2-colas)

## 8 DISCUSIÓN

Varios estudios sugieren que el estrés puede causar infertilidad al afectar las gónadas [Hjollund et al. 2004; Jung et al. 2002; Maric et al. 1996; Sheiner et al. 2003], algunos autores proponen que el estrés induce la formación de ERO que producen estrés oxidante en el testículo [Nirupama et al. 2013; Priya y Reddy 2012], el cual es considerado como una de las principales causas de la infertilidad masculina [Aitken et al. 2014; Makker et al. 2009; Saleh y Agarwal 2002]. Sin embargo, son pocos las investigaciones realizadas para estudiar la formación de ERO por efecto del estrés en los testículos.

En este estudio, se tuvo como objetivo investigar el efecto del estrés agudo y crónico en la respuesta antioxidante del testículo de la rata adulta por medio de pruebas bioquímicas y en parámetros de calidad de los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo.

Como indicadores de que las ratas experimentan estrés, en este estudio se examinó el efecto del estrés crónico por inmersión en agua fría en los pesos corporal y testicular. El uso en la investigación de diferentes estresores demuestra la reducción de la ganancia de peso corporal en animales de experimentación [Bekris et al. 2005; Gamaro et al. 2003; Nirupama et al. 2013; Retana-Marquez et al. 2003a; Zardooz et al. 2006a].

En el presente estudio, la ganancia de peso corporal de las ratas después del estrés crónico, fue significativamente menor desde los primeros 14 días y hasta el

final de la exposición al estresor, esto puede ser debido a la disminución en la ingesta de alimento [Bekris et al. 2005; Harris et al. 1998; Lucca et al. 2009; Rybkin et al. 1997]. Durante el estrés continuo se incrementa la liberación de la CRH, que actúa como un neuropéptido anorexigénico, ya que inhibe la liberación del neuropéptido Y, lo que puede reducir la ingesta de alimento y, en consecuencia, menor aumento de peso en las ratas estresadas [Carrasco y Van de Kar 2003; Zardooz et al. 2006b]. Otra razón de la disminución en la ganancia de peso se explicaría como consecuencia de la disminución de las reservas corporales por el aumento de la actividad metabólica [Herman et al. 1995].

Además, los resultados muestran que el peso absoluto de los testículos disminuyó en los machos estresados durante 50 días consecutivos; esto indica que los testículos son vulnerables al estrés, por lo que su peso es considerado un parámetro importante para evaluar el riesgo de los efectos tóxicos en el sistema reproductor masculino [Clegg et al. 2001; Yavasoglu et al. 2008]. La exposición repetida al estrés induce cambios estructurales en los testículos, como lo son la disminución del diámetro de los túbulos seminíferos y la reducción en el número y tamaño de las células de Leydig, lo que provoca el descenso en la síntesis de testosterona. Como consecuencia, se detiene la maduración de las células germinales en proliferación, aumenta la apoptosis de las células germinales y disminuye así la producción de las espermátidas y aumenta el número de espermatozoides muertos, reduciéndose la función testicular y la espermatogénesis como previamente se ha reportado [Hou et al. 2014; Mingoti et al. 2003; Potemina

2008; Swami et al. 2007]. Por lo tanto, se considera que el peso testicular depende principalmente de la abundancia de las células espermatogénicas diferenciadas y de los espermatozoides [Takahashi y Oishi 2001]. Tomando en cuenta lo anterior, el peso absoluto testicular debe tomarse en consideración y no esperar que la reducción del peso testicular se relacione con la reducción del peso corporal [Clegg et al. 2001].

Otro indicador de estrés es el incremento de las concentraciones circulantes de corticosterona [Romero 2004], este aumento además, puede afectar la fisiología testicular. En los machos sometidos a estrés agudo las concentraciones de corticosterona aumentaron durante los primeros minutos posteriores al estrés, pero no durante las horas siguientes. Esto refleja el patrón típico del ritmo circadiano según la disminución observada a las 6 y 12 horas, y al aumento de la corticosterona similar al grupo control a las 24 horas. Esto ocurre debido a la alteración cíclica de las señales procedentes del hipotálamo cada 24 horas [Atkinson y Waddell 1997; Retana-Marquez et al. 2003a].

Según lo reportado, el aumento de la corticosterona durante la respuesta de estrés podría tener efectos nocivos en la función testicular, más específicamente en la esteroidogénesis. Sin embargo, el incremento de la corticosterona en los primeros minutos posteriores al estrés agudo, no afectó el patrón de secreción de la testosterona en ninguno de los tiempos estudiados. Datos existentes demuestran que en ratones inmovilizados por 15 minutos, las concentraciones de corticosterona aumentan y después de 30 minutos de estrés disminuyen las de la testosterona.

Estos datos se confirmaron *in vitro* después de la administración de corticosterona, demostrando que esta hormona disminuye la formación de AMPc (segundo mensajero involucrado en la regulación de la esteroidogénesis en las células de Leydig) a los 15 minutos de incubación. Además, reduce la síntesis de testosterona después de 30 minutos, lo que indica que la corticosterona actúa a través de mecanismos no genómicos en las células de Leydig [Dong et al. 2004; Hu et al. 2008].

En este estudio, la testosterona se evaluó a las 0, 6, 12 y 24 horas después de solo una exposición al estresor, por lo que no se excluye la posibilidad de que entre los tiempos 0 y 6 las concentraciones de testosterona hayan descendido. Además, se debe tomar en cuenta que los machos estuvieron expuestos a una sola concentración de corticosterona durante una sesión de estrés por 15 minutos y no por tiempos más prolongados. Por este motivo, es posible que la testosterona haya disminuido dentro de la primera hora de la exposición de la corticosterona, ya que esta hormona tiene un tiempo de vida media de 50 minutos [Kitay 1961]. Si bien, los resultados obtenidos demuestran que después de 6 horas posteriores al estrés agudo no se afectan las concentraciones de testosterona, permite sugerir que el estrés agudo no compromete la función esteroidogénica del testículo.

Por el contrario, bajo condiciones de estrés crónico, en los machos estresados por 20, 40 y 50 días la corticosterona aumentó, confirmando la hiperactividad del eje HHA, por lo tanto, es de esperarse la disminución de la síntesis de testosterona [Veldhuis 1997]. Las células de Leydig expresan el receptor de glucocorticoides y son

el principal objetivo de la acción de los glucocorticoides en el testículo [Ortlip et al. 1981]. El complejo receptor-corticosterona entra al núcleo y actúa como regulador de la transcripción génica y puede causar cambios positivos o negativos en el ARNm y en proteínas específicas que modulan la función celular [Landers y Spelsberg 1992; Schmid et al. 1995].

En las células de Leydig, la corticosterona inhibe la transcripción de genes que codifican para enzimas que participan en la biosíntesis de la testosterona, tales como la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450<sub>scc</sub>), la 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD), la 17 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD) [Hales y Payne 1989; Srivastava et al. 1993] y la proteína StAR [Dhanabalan et al. 2011]. Además, la exposición prolongada a corticosterona inicia la apoptosis de las células de Leydig en ratas [Gao et al. 2002; Gao et al. 2003], lo que podría contribuir a disminuir la capacidad esteroideogénica dada por la supresión de la biosíntesis de la testosterona.

El incremento de al menos dos veces las concentraciones de corticosterona en los tres tiempos estudiados durante el estrés crónico se asocian con la disminución de las concentraciones de testosterona durante el estrés por inmersión en agua fría, lo que confirma los hallazgos previamente reportados [Retana-Marquez et al. 2003a]. Una de las funciones que principalmente se altera durante el estrés crónico es la síntesis de testosterona y, en este estudio, quedó demostrado por la correlación negativa encontrada entre el aumento de la corticosterona y la disminución de la testosterona.

Para evaluar otros efectos del estrés, se estudia la liberación de glucocorticoides en la respuesta de estrés y en su administración a diferentes dosis, para mimetizar el efecto del estrés. Los resultados respaldan que los glucocorticoides en ambos casos tienen un impacto significativo en la fisiología redox, con la notable generación de estrés oxidante [Costantini et al. 2011].

Después de la administración de glucocorticoides, se producen diversos efectos rápidos dentro de un periodo de tiempo corto, que no se relacionan con los efectos genómicos de los mismos [Buttgereit y Scheffold 2002; Falkenstein et al. 2000; Stellato 2004]. Estos efectos incluyen la generación de ERO [Greenstein et al. 2002; Wang et al. 2006].

Los glucocorticoides actúan a través de la unión a su receptor, el cual se ha detectado en las mitocondrias de células germinales, células de Sertoli y espermatozoides [Demonacos et al. 1995; Koufali et al. 2003; Psarra et al. 2005; Scheller et al. 2003; Silva et al. 2010]. La translocación rápida del receptor de glucocorticoides a las mitocondrias representa uno de los primeros efectos no genómicos de los glucocorticoides. Por lo tanto, las mitocondrias desempeñan un papel central en la regulación de estos efectos no genómicos, ya que las mitocondrias son fuente importante de la producción de ERO [Jezek y Hlavata 2005].

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que una sola exposición al estresor incrementa la formación de peróxidos como marcador de la producción de ERO en el testículo. El aumento en la producción de ERO ocurrió a las 6 horas posteriores al estrés; sin embargo, el aumento fue temporal y reversible, ya que no

se sostuvo en el tiempo y regresó a concentraciones similares a las del grupo control a las 12 y 24 horas. La generación de ERO a las 6 horas, se podría relacionar con el aumento de la corticosterona liberada inmediatamente después de la exposición al estresor, como se ha reportado previamente [Costantini et al. 2008; Lin et al. 2004; Stier et al. 2009].

El incremento temporal en la generación de ERO podría regular la homeostasis redox en el testículo, ya que durante el envejecimiento, por el ejercicio o por otras condiciones de estrés, las ERO aumentan para restablecer la homeostasis redox [Droge 2002]. Algunos autores señalan que el término "homeostasis redox" debe sustituirse por "alostasis redox", este sistema alostático actuaría como un sistema amortiguador que tiene un nivel basal y cierta capacidad amortiguadora que puede mantener la estabilidad dinámica [Li y He 2009; McEwen 1998].

Hasta la fecha no hay evidencias que sustenten el aumento de ERO como amortiguador de la homeostasis redox en el testículo, aunque sí se ha estudiado para otros tipos celulares. En las células madre de las vías respiratorias, el aumento en las concentraciones de ERO activan el factor de transcripción Nrf2, que activa la vía Notch para estimular la auto-renovación y proliferación celular. Asimismo, activa el sistema antioxidante para neutralizar las ERO intracelulares, volviendo las concentraciones basales de ERO para mantener el equilibrio homeostático por medio de la regulación redox [Paul et al. 2014]. Los resultados obtenidos en este estudio muestran el aumento de ERO, pero sin alterar la actividad y el contenido de las enzimas antioxidantes.

En el presente estudio, la actividad total de la SOD y el contenido de la SOD1 no se modificaron, lo que sugiere que el estrés agudo no incrementó la producción de  $O_2^{\cdot-}$  o tal vez éste fue controlado de manera eficaz sin la necesidad de aumentar la actividad o el contenido de estas enzimas. Del mismo modo, la actividad y el contenido de las enzimas catalasa, GPx y GPx-4 se mantuvieron sin cambios después del estrés agudo. En el caso de la GPx es posible que la relación GSH/GSSG y el equilibrio antioxidante-prooxidante no se alteraran por el estrés agudo. Estos resultados indican que una sola exposición al estresor no es suficiente para causar estrés oxidante en el testículo, en su lugar, el estado redox celular se modificó temporalmente con la finalidad de señalizar y no para causar daño. Por lo que, existe la posibilidad de que la generación de ERO podría provenir de otra fuente como lo es la NADPH oxidasa 5 (NOX5) y participar en procesos de regulación celular [Thannickal y Fanburg 2000]. La producción de ERO por la NOX5 desempeña un papel fisiológico en las primeras etapas de la espermatogénesis, tales como la división celular, la inducción de la apoptosis y en la compactación del ADN [Banfi et al. 2001]. Estas evidencias apoyan la idea de que el aumento de ERO a las 6 horas regulan procesos fisiológicos a través del desequilibrio momentáneo del estado redox, pero sin causar estrés oxidante.

La lipoperoxidación es un marcador de estrés oxidante que respalda la propuesta que el aumento transitorio en la producción de ERO no es suficiente para causar estrés oxidante en el testículo durante el estrés agudo. Ya que concentraciones elevadas de ERO en el testículo *in vivo* inducen lipoperoxidación y

su cuantificación es esencial para evaluar el daño oxidante en trastornos fisiopatológicos.

El aumento de hidroperóxidos lipídicos es indicador de lipoperoxidación que refleja daño en los ácidos grasos poliinsaturados y alteración de la estructura de la membrana plasmática y de sus funciones [Agarwal y Prabakaran 2005; Halliwell y Gutteridge 1999]. En los tiempos estudiados posteriores al estrés agudo no aumentó la formación de hidroperóxidos lipídicos en el testículo, estos resultados son similares a los reportados en otros tejidos. Utilizando choques eléctricos en las patas [Uysal et al. 2005] y estrés psicológico por un periodo de 2 a 16 horas [Matsumoto et al. 1999] se demostró que el estrés agudo no causó lipoperoxidación en el cerebro y en el hígado de rata, a pesar de que estos dos tejidos son demasiado vulnerables al daño oxidante [Costantini et al. 2011].

Si el aumento en la producción de ERO por efecto del estrés agudo no modifica la actividad ni el contenido de las enzimas antioxidantes ni tampoco genera lipoperoxidación, queda una pregunta por resolver ¿qué otro papel desempeña el aumento transitorio en las concentraciones de ERO en el testículo?

Es posible que el aumento temporal de las ERO induzca la muerte por apoptosis de las células germinales, debido que en nuestro grupo de investigación se encontró que el estrés agudo estimuló la muerte celular en las células del epitelio seminífero a las 24 horas posteriores al estrés (datos no mostrados en este trabajo). En este sentido, el aumento de ERO a las 6 horas posteriores al estrés podría estar involucrado con la ruta apoptótica extrínseca, la cual comprende la unión de

receptores de muerte con su ligando (ligando Fas-receptor de Fas, TNF-alfa-receptor 1 de TNF). El complejo receptor-ligando induce la formación de balsas lipídicas, se recluta y activa la NOX que genera ERO y se activa la señal de la esfingomielinasa ácida. Estos procesos constituyen la plataforma de señalización de las balsas lipídicas que activarían la apoptosis mediada por receptores de muerte [Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2006].

En lo que concierne al estrés crónico, éste podría alterar el sistema reproductor masculino a través del daño oxidante ocasionado por el estrés oxidante. Diferentes tipos de estrés pueden promover la formación de ERO y estrés oxidante [Kamper et al. 2009; Nadeem et al. 2006] en diversos órganos [Sahin y Gumuslu 2007a; Zafir y Banu 2009]. El estrés oxidante es el resultado de un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Existen evidencias que apoyan la idea de que el estrés oxidante juega un papel crucial en el inicio y progresión de diferentes condiciones relacionadas con la infertilidad masculina [Ahmad et al. 2012; Depke et al. 2009].

En el testículo, los antioxidantes protegen a las células germinales contra el daño oxidante [Fraga et al. 1991], ya que éste es uno de los principales factores que inducen apoptosis en las células germinales [Kasahara et al. 2002]. Las ERO son neutralizadas por el sistema antioxidante, siendo SOD, catalasa y GPx la primera línea de defensa celular contra el estrés oxidante. En este estudio, en los machos sometidos a estrés crónico aumentó la producción de ERO, lo que sugiere que la corticosterona puede causar la desregulación prolongada del estado redox hacia la

condición de estrés oxidante [Nayanatara 2005] y la generación excesiva de ERO puede disminuir las estrategias de defensas antioxidantes en el testículo [Gil-Guzman et al. 2001].

El desequilibrio en el estado redox induce cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes, lo cual es considerado indicador importante en un determinado tejido *in vivo* [Ong et al. 2002]. El estrés por inmovilización durante 60 días disminuye la actividad de SOD en el testículo [Nirupama et al. 2013]. Los resultados del presente trabajo demuestran que la actividad total de la SOD disminuye desde los primeros 20 días de estrés, dicha disminución continuó hasta los 50 días de estrés crónico. La reducción de la actividad total de la SOD podría deberse a la oxidación de sus cadenas polipeptídicas originada por el aumento de ERO. Las enzimas SOD1 y SOD3 pueden ser inactivadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Goldstone et al. 2006; Hodgson y Fridovich 1975], la SOD2 suele ser nitrada y desactivada por el ONOO<sup>-</sup> [MacMillan-Crow et al. 1998]; sin embargo, se necesitan estudios para determinar los cambios en las enzimas antioxidantes por el estrés crónico por inmersión en agua fría.

Aparentemente, el contenido de la enzima SOD1 se mantiene sin cambios; sin embargo, si su actividad se alteró por el estrés crónico, es probable que mecanismos moleculares lleven a la recuperación de la enzima, en cuanto al contenido de la misma, es decir, se podrían estar activando factores de transcripción tales como el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB), para mantener el contenido constante de la SOD1 [Kaur et al. 2006].

Asimismo, el estrés crónico durante 20 días aumentó la actividad de la catalasa y disminuyó la actividad total de la GPx. En este mismo tiempo, aumentó la producción de ERO y el contenido de la GPx-4 se redujo. Existe la posibilidad de que el  $H_2O_2$  generado por el estrés crónico pudiera ser biotransformado principalmente por la catalasa y no por la GPx [Forstrom et al. 1979], ya que la actividad de la catalasa aumenta con concentraciones altas de  $H_2O_2$ , mientras que la GPx se activa con concentraciones bajas de  $H_2O_2$  [Cohen y Hochstein 1963]. Lo anterior podría explicar las diferencias observadas en las actividades de las enzimas catalasa y GPx.

Después de 40 y 50 días de estrés crónico, continuó la producción de ERO. Este aumento podría deberse a la síntesis de  $H_2O_2$  por la reducción directa del  $O_2$ . Otra fuente importante de  $H_2O_2$  está en los peroxisomas de las células de Leydig, de Sertoli y peritubulares, así como en las espermatogonias, en los espermatoцитos, y en las espermátidas redondas y alargadas en los túbulos seminíferos, ya que todas éstas contienen un gran número de oxidasas, que generan  $H_2O_2$  [Nenicu et al. 2007]. Esto podría explicar el aumento en la producción de ERO a partir de los 20 hasta los 50 días de estrés y no por el  $H_2O_2$  originado por la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$  en presencia de la SOD.

La modificación en las actividades de las enzimas antioxidantes durante la respuesta de estrés es diferente según el tipo de estresor, la duración, la intensidad, el tipo de tejido estudiado y el sexo [Papandreou et al. 2011]. El estrés por choques eléctricos en las patas durante 21 días aumenta significativamente la actividad de la

SOD en el cerebro y reduce la actividad de la catalasa [Bhattacharya et al. 2001]. Además, varios estudios informaron el aumento en las actividades de la SOD y la catalasa [Ahmad et al. 2012; Sahin y Gumuslu 2004; Samson et al. 2007; Uysal et al. 2005], otros afirmaron disminuciones [Sarumathi y Saravanan 2012], mientras que otros no encontraron diferencias significativas en diversos tejidos [Sahin et al. 2006] en respuesta a diferentes modelos de estrés.

La reducción de las actividades de las enzimas antioxidantes en este estudio indica que la exposición al estrés crónico altera sólo su actividad como resultado del desequilibrio del estado redox, ya que el contenido de las enzimas se mantiene sin cambios. El contenido invariante de las enzimas podría reflejar un efecto de compensación de desequilibrio del estado redox.

Hasta la fecha, son limitados los estudios diseñados para estudiar el daño provocado por la generación del estrés oxidante posterior a la respuesta de estrés en el sistema reproductor masculino. Recientemente, se demostró que en el testículo de ratas sometidas a estrés crónico durante 60 días por inmovilización se genera estrés oxidante, ya que aumenta la peroxidación lipídica y disminuye la actividad de la catalasa y la SOD [Priya y Reddy 2012]. Otro estudio similar reportó los efectos de la combinación del estrés por inmovilización y del estrés por nado forzado. En este caso, disminuyó la actividad de las enzimas antioxidantes y aumentó la peroxidación lipídica en los testículos de las ratas estresadas [Nirupama et al. 2013], demostrando que la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes resulta en estrés oxidante y daño celular.

En el presente estudio la peroxidación lipídica se incrementó significativamente en las ratas expuestas desde los 20 hasta los 50 días causando daño celular en los testículos, ya que las membranas celulares son altamente susceptibles a la peroxidación lipídica, como se ha informado anteriormente, lo que sugiere que el daño a los testículos es causado por una desregulación de estado redox en lugar de estrés oxidante.

La correlación positiva entre el aumento de corticosterona con la generación de ERO y la peroxidación de lípidos, así como una correlación negativa con las actividades de SOD, catalasa y GPx, sugieren que el aumento de la corticosterona podría estar relacionada con la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, con la producción de ERO y con el daño a los lípidos en el testículo. Estos hallazgos sugieren que la respuesta de estrés crónico puede causar daños a la membrana lipídica de las células de Leydig testiculares a través del aumento de ERO, lo cual afecta la esteroidogénesis testicular. Por lo tanto, las ERO podrían ser consideradas como parte del mecanismo de toxicidad testicular [Aitken y Roman 2008], ya que las altas concentraciones de ERO pueden dañar los componentes celulares de los testículos [Marchlewicz et al. 2007; Murata y Kawanishi 2000; Peltola et al. 1994; Verma y Nair 2001].

La función del sistema reproductor masculino puede ser afectada por diversos factores, éstos incluyen los estudiados en este trabajo: la desregulación del estado redox y la disminución de la testosterona por efecto del estrés. Cuando las concentraciones de testosterona no son las adecuadas, los espermatozoides pierden

la movilidad, la capacidad para fertilizar al ovocito y mueren [Dyson y Orgebin-Crist 1973]. La acción de la testosterona esta mediada por la unión con su receptor [Benten et al. 1999; Kampa et al. 2002]; el receptor de andrógenos se encuentran a lo largo de todo el epidídimo de diferentes especies, incluyendo la rata [Goyal et al. 1997]; se encuentra esencialmente en las células principales, aunque también se encuentra en las células basales y apicales [Zhou et al. 2002; Zhu et al. 2000]. Las células principales son las más sensibles a la privación de testosterona [Moore y Bedford 1979], y debido a que las células principales se relacionan con el transporte de sodio a su interior desde el lumen; sintetizan un gran número de proteínas que son retenidas en la misma célula o secretadas al lumen, por lo que desempeñan un papel muy importante en la maduración de los espermatozoides [Hermo 1995; Hermo y Robaire 2002].

Lo anterior explicaría por qué los parámetros de la calidad espermática posteriores al estrés agudo no presentaron diferencias en ninguno de los tiempos estudiados; ya que tampoco disminuyeron significativamente las concentraciones de testosterona. Sin embargo, los parámetros espermáticos estudiados sí se afectaron con el estrés crónico. Disminuyó la movilidad, la viabilidad y la cuenta de espermatozoides de la cauda del epidídimo, y aumentó el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales. Evidencias sugieren que el estrés crónico variable daña los espermatozoides, después de 32 días de estrés, en este caso el porcentaje de la movilidad progresiva de los espermatozoides del epidídimo disminuyó [Suarez et al. 1996]; en otro estudio, el estrés por nado forzado durante 50

días redujo el número y la movilidad de los espermatozoides en ratas [Saki et al. 2009].

La alteración de la calidad espermática en este estudio podría deberse a eventos ocurridos durante la respuesta de estrés, uno de ellos dado por la hiperactivación del eje HHA, el cual suprime al eje HHT a través de diferentes vías e interfiere con la función gonadal [Ferin 2006; Rivier y Rivest 1991], alterando principalmente la síntesis de testosterona. La testosterona es necesaria para mantener tanto la espermatogénesis [Singh et al. 1995] como la funcionalidad del epidídimo debido a su dependencia a los andrógenos [Vreeburg 1975].

La reducción de la testosterona por el estrés podría acelerar el tiempo del tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo, contribuyendo a alterar los parámetros espermáticos, ya que el tiempo del tránsito es importante en la maduración de los espermatozoides [Fernandez et al. 2008]. Como parte del proceso de maduración durante el tránsito por el epidídimo, los espermatozoides son modificados morfológica y fisiológicamente [Orgebin-Crist 1969]. Las modificaciones incluyen la migración distal y pérdida de la gota citoplasmática [Cuasnicu 2002; Yanagimachi 1994], además de la adquisición de la movilidad progresiva. Los espermatozoides necesitan un período mínimo en la cabeza y en el cuerpo del epidídimo para que el proceso de maduración se pueda llevar a cabo [Franca et al. 2005].

En este estudio, se correlacionó positivamente la reducción de la testosterona con la disminución de la movilidad, la viabilidad y el conteo de los espermatozoides,

así como negativamente con el aumento en el número de espermatozoides anormales. La disminución de la cuenta espermática, en machos crónicamente estresados observados en este trabajo, podría deberse a la aceleración del tiempo del tránsito de los espermatozoides en el epidídimo, como ya se ha sugerido en otros estudios por efecto de disminución de la testosterona [Klinefelter 2002; Klinefelter y Suarez 1997].

Durante el tránsito a través del epidídimo, el metabolismo de los espermatozoides se incrementa, hecho que se asocia con el peligro de experimentar estrés oxidante. Algunos estresores también pueden contribuir a la generación de estrés oxidante en el epidídimo, el cual podría causar daño a los espermatozoides en este órgano. El estrés por inmovilización durante 15 días aumenta la producción de ERO y la peroxidación lipídica, así como la disminución de la actividad de la SOD y la catalasa en el epidídimo de las ratas tratadas [Dhanabalan et al. 2011]. Estas enzimas son parte del sistema antioxidante del epidídimo para evitar los efectos perjudiciales de las ERO [Dacheux et al. 2003; Robaire 2006]. Aunque en el presente estudio no se midió la actividad de las enzimas antioxidantes en el epidídimo, no se descarta la posibilidad que éste sea un órgano afectado por el estrés oxidante durante el estrés crónico.

La evidencia experimental apoya que los espermatozoides pueden producir ERO en los complejos I o III, por la interrupción del flujo del transporte de electrones mitocondrial [Koppers et al. 2008] y por la NADPH oxidasa anclada a la membrana plasmática [Vernet et al. 2001]. El aumento de ERO oxida la membrana de los

espermatozoides [Aitken y Clarkson 1987; Aitken et al. 1989; Baumber et al. 2000; Guthrie y Welch 2012] debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que los hace susceptibles a la peroxidación. La generación de ERO por el complejo I provoca daño peroxidante a la pieza media de los espermatozoides [Koppers et al. 2008]. Adicional al daño oxidante de los lípidos, el aumento de ERO causa la depleción de ATP en el axonema y produce pérdida de la movilidad de los espermatozoides [de Lamirande y Gagnon 1992; El-Taieb et al. 2009; Guthrie y Welch 2012]. Esto podría explicar la disminución de la movilidad observada en los espermatozoides de los machos crónicamente estresados.

Por otro lado, en los machos estresados crónicamente aumentaron las anomalías flagelares y la presencia de la gota citoplasmática [Cooper 2011]. La detección de anomalías morfológicas espermáticas y su evaluación, permite inferir acerca de los cambios en la funcionalidad de los testículos, que podría afectar el proceso de la espermatogénesis y/o en la función del epidídimo, en este último caso en particular con respecto al proceso de la maduración de los espermatozoides.

Las alteraciones en la pieza de conexión pueden dar lugar a la separación de la cabeza y el flagelo. Esta alteración morfológica tiene un origen testicular y se debe a un error durante la migración de los centriolos hacia la posición caudal de las espermátidas [Chemes et al. 1999; Chemes y Rawe 2010]. En este estudio, se observaron sólo flagelos; probablemente las cabezas ya han sido fagocitadas por las células de Sertoli o por los macrófagos del epidídimo [Baccetti et al. 1989; Chemes et al. 1999]. Las gotas citoplasmáticas en los espermatozoides pueden inducir la

angulación del flagelo e inhibir la movilidad progresiva, la cual se asocia con la infertilidad [Cooper et al. 2004].

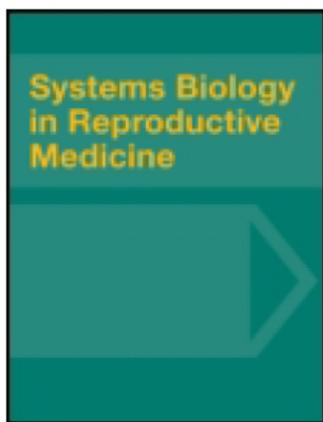
Las alteraciones morfológicas en los espermatozoides se pueden producir debido al estrés oxidante [Aitken et al. 1989], según Gómez et al., 1998 [Gomez et al. 1998], la producción de ERO en el epidídimo se correlaciona con el aumento de anomalías morfológicas, con la disminución de la movilidad y de la concentración total de los espermatozoides. Los resultados mostrados anteriormente de los parámetros espermáticos indican que el estrés crónico altera el proceso de maduración de los espermatozoides durante su tránsito a través del epidídimo, además, la presencia de espermatozoides defectuosos proporciona información importante sobre la calidad subyacente del proceso de espermatogénesis [Gil-Guzman et al. 2001]. Sin embargo, se necesita de más investigación en el desarrollo del estrés oxidante en los espermatozoides y en el epidídimo de ratas estresadas crónicamente.

## 9 CONCLUSIONES

Este trabajo muestra que una sola exposición al estresor no afecta el estado antioxidante en el testículo, mientras que el estrés crónico por inmersión en agua fría disminuye la actividad de las enzimas antioxidantes, pero sin modificar su expresión, a pesar de que aumentaron los hidroperóxidos lipídicos. Lo anterior indica que no se genera estrés oxidante por efecto del estrés crónico; en su lugar, existe un desequilibrio en el estado redox, sugiriendo una pobre adaptación de los testículos a los retos constantes o sostenidos en las ratas adultas.

El desequilibrio en el estado redox por la exposición crónica al estresor se observa desde los primeros 20 días, se mantiene hasta los 50 días de estrés y se correlaciona con el incremento de la corticosterona, lo que sugiere que esta hormona podría estar mediando los efectos del estrés en la alteración del estado redox. Este desequilibrio causado en los testículos representa una posible causa de la alteración de las funciones reproductivas, ya que los parámetros espermáticos también se modificaron con el estrés crónico, posiblemente como resultado de la disminución de la testosterona y aumento de la corticosterona.

## 10 APÉNDICE I. DIFUSIÓN DE RESULTADOS



[Click for updates](#)

### Systems Biology in Reproductive Medicine

Publication details, including instructions for authors and subscription information:  
<http://www.tandfonline.com/loi/iaan20>

### Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat

Erika Cecilia García-Díaz<sup>a</sup>, Luis Enrique Gómez-Quiroz<sup>b</sup>, Edith Arenas-Ríos<sup>c</sup>, Andrés Aragón-Martínez<sup>d</sup>, Juan Antonio Ibarra-Arias<sup>e</sup> & María del Socorro I. Retana-Márquez<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,

<sup>b</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,

<sup>c</sup> Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, DF, México,

<sup>d</sup> Laboratorio de Biología de la Reproducción, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México, and

<sup>e</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac-Norte, México, DF, México

Published online: 29 Jul 2015.

To cite this article: Erika Cecilia García-Díaz, Luis Enrique Gómez-Quiroz, Edith Arenas-Ríos, Andrés Aragón-Martínez, Juan Antonio Ibarra-Arias & María del Socorro I. Retana-Márquez (2015) Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61:3, 150-160, DOI: [10.3109/19396368.2015.1008071](https://doi.org/10.3109/19396368.2015.1008071)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/19396368.2015.1008071>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

RESEARCH ARTICLE

## Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat

Erika Cecilia García-Díaz<sup>1</sup>, Luis Enrique Gómez-Quiroz<sup>2</sup>, Edith Arenas-Ríos<sup>3</sup>, Andrés Aragón-Martínez<sup>4</sup>, Juan Antonio Ibarra-Arias<sup>5</sup>, and María del Socorro I. Retana-Márquez<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, <sup>3</sup>Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, DF, México, <sup>4</sup>Laboratorio de Biología de la Reproducción, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México, and <sup>5</sup>Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac-Norte, México, DF, México

### Abstract

Stress is associated with detrimental effects on male reproductive function. It is known that stress increases reactive oxygen species (ROS) generation in the male reproductive tract. High ROS levels may be linked to low sperm quality and male infertility. However, it is still not clear if ROS are generated by stress in the testis. The objective of this study was to characterize the role of oxidative stress induced by cold-water immersion stress in the testis of adult male rats and its relation with alterations in cauda epididymal sperm. Adult male rats were exposed to acute stress or chronic stress by cold-water immersion. Rats were sacrificed at 0, 6, 12, and 24 hours immediately following acute stress exposure, and after 20, 40, and 50 days of chronic stress. ROS production increased only at 6 hours post-stress, while the activity and expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation (LPO), and sperm parameters were not modified in the testis. Corticosterone increased immediately after acute stress, whereas testosterone was not modified. After chronic stress, testicular absolute weight decreased; in addition, ROS production and LPO increased at 20, 40, and 50 days. The activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) decreased throughout the duration of chronic stress and the activity of catalase (CAT) decreased at 40 and 50 days, and increased at 20 days. The expression of copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) and CAT were not modified, but the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx-4) decreased at 20 days. Motility, viability, and sperm count decreased, while abnormal sperm increased with chronic stress. These results suggest that during acute stress there is a redox state regulation in the testis since no deleterious effect was observed. In contrast, equilibrium redox is lost during chronic stress, with low enzyme activity but without modifying their expression. In addition, corticosterone increased while testosterone decreased, this decrease is related to the negative effects seen in sperm.

**Abbreviations:** ROS: reactive oxygen species; LPO: lipid peroxidation; SOD: superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: superoxide anion radical; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hydrogen peroxide; HO<sup>•</sup>: hydroxyl radical; Cu/Zn-SOD or SOD1: copper/zinc superoxide dismutase; Fe/Mn-SOD or SOD2: mitochondrial SOD; SOD-Ex or SOD3: extracellular SOD; PHGPx or GPx-4: phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase; GSH: reduced glutathione; DCFH-DA: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCF: 2',7'-dichlorofluorescein; INT: chloride 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium; HPLC: high-performance liquid chromatography; SD: standard deviation; ANOVA: analysis of variance

### Introduction

Stress is defined as physical and psychological modifications that disrupt homeostasis and balance in organisms

[Rivier and Rivest 1991]; and the stimuli that challenge homeostasis are designated as stressors. The response to stress depends on the intensity of the stressor, its unpredictability, and uncontrollability [Koolhaas et al. 2011]. Stress is subdivided based on duration: acute (single, intermittent, and time-limited exposures) and chronic (intermittent-and-prolonged or continuous exposures) [Pacak et al. 1998]. The secretion of glucocorticoids is a classic endocrine response to stress [Sapolsky et al. 2000]. Several studies have suggested

\*Address correspondence to M.S. Retana-Márquez, Laboratorio de Neuropsicoendocrinología, Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, 09340. México D.F., México. Tel: +52 55 5804 4701. E-mail: rems@xanum.uam.mx

### Keywords

Antioxidant enzymes, lipid peroxidation, oxidative stress, redox state, sperm parameters, stress

### History

Received 11 July 2014  
Revised 12 November 2014  
Accepted 16 November 2014  
Published online 2 February 2015

that stress may cause infertility by affecting the gonads [Al-Joudi and Jamil 2012; Chidrawar et al. 2011; Kirby et al. 2009; McGrady 1984]. Both acute and chronic stress cause an increase in glucocorticoid levels, which precedes a decrease in testosterone levels in males [Dhanabalan et al. 2011; Dong et al. 2004; Srivastava et al. 1993]. It has been suggested that glucocorticoids increase oxidative stress in several tissues including the testes. Furthermore, suppression of testicular testosterone inhibits the testicular expression of antioxidant enzymes, leading to an oxidative stress state [Ghosh et al. 2002; Zini and Schlegel 2003].

Oxidative stress results from the imbalance between the cellular antioxidant defense systems and the production of reactive oxygen species (ROS); they target cells and lead to oxidative damage from the interaction of reactive oxygen with critical cellular macromolecules [Sies 1997]. Recently, chronic stress by immobilization has been associated with altering antioxidant enzyme activity, and oxidative damage to membrane lipids and DNA in testes [Nirupama et al. 2013; Priya and Reddy 2012]. These alterations are explained by the negative effects of ROS, such as superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radical ( $HO^{\cdot}$ ) [Sikka 2001]. Both germ cells and sperm are vulnerable to oxidative stress because they contain high levels of long-chain and very long chain highly unsaturated fatty acids, susceptible of being oxidized and cause cellular damage [Parodi 2014; Sikka 2001]. Lipid peroxidation (LPO) is highly detrimental to germ cell membrane structure and sperm function inducing numerous cytopathological changes [Collodel et al. 2011; Farombi et al. 2013; Leong et al. 2013] as well as cell death [Maheshwari et al. 2009; Mupfiga et al. 2013]. In addition, sperm motility is affected by LPO that can compromise the fertilizing capacity of sperm under conditions of oxidative stress [Aitken 1999; Aitken and Clarkson 1987]. Both morphology and sperm count are other parameters affected by the presence of high ROS concentrations [Agarwal et al. 2014].

It is reported that elevated production of ROS in the testes has the propensity to cause significant alteration in tissue physiology or induce oxidative damage to DNA, which is a potential risk to male reproduction [Doreswamy and Muralidhara 2005; Sepaniak et al. 2004]. Thus, spermatogenesis and sperm function must be protected from oxidative stress. To avoid harmful effects from ROS, the testes mainly use enzymatic copper/zinc superoxide dismutase

(Cu/Zn-SOD or SOD1), mitochondrial SOD (Fe/Mn-SOD or SOD2), extracellular SOD (SOD-Ex or SOD3) [Bauche et al. 1994; Gu and Hecht 1996; Mruk et al. 2002], catalase (CAT) [Dastig et al. 2011; Luers et al. 2006; Nenicu et al. 2007], and selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX or GPx-4) [Baek et al. 2007; Kaur et al. 2006] and non-enzymatic antioxidants, like reduced glutathione (GSH) [Bilommi et al. 2013; Elsharkawy et al. 2012]. The cytoplasmic space of sperm is limited and the availability and location of intracellular antioxidant enzymes is restricted, which may be further compromised by the effects of oxidative stress [Weir and Robaire 2007].

However, to our knowledge, the effects of acute stress on the oxidative state, as well as the beginning of oxidative stress after chronic stress have not been assessed. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effects of acute and chronic stress, at different time points, on the activity of testicular antioxidant enzymes, SOD, CAT, and GPx, as well as the expression of SOD1, CAT, and GPx-4, ROS production, and LPO. Epididymal sperm parameters from the caudal region, as well as serum corticosterone and testosterone were evaluated under the same conditions.

## Results

In the present study, we observed that testicular ROS production increased 6 hours after the acute exposure to the stressor, returning to similar levels to those of the control group at 12 and 24 hours after stress (Figure 1A). In contrast, in chronic stress groups, there was a marked increase in ROS production at 20, 40, and 50 days (Figure 1B). Testis LPO remained constant after the males were first exposed to stress (Figure 2A). In comparison, under chronic stress, LPO increased at days 20, 40, and 50 of stress (Figure 2B).

Testicular SOD activity remained unchanged after acute stress when compared with the control group (Figure 3A). Conversely, SOD activity decreased on days 20, 40, and 50 of stress, compared with the control group (Figure 3B). CAT activity was not modified after acute stress (Figure 4A). Its activity increased at day 20 but decreased at days 40 and 50 of chronic stress (Figure 4B). GPx activity was not modified by acute stress (Figure 5A), but decreased with chronic stress at 20, 40, and 50 days (Figure 5B). The expression of testicular SOD1, CAT, and GPx-4 did not change with acute stress

Figure 1. Reactive oxygen species (ROS) production in the testis of rats subjected to acute and chronic stress. (A) In males exposed to one stress session ROS generation increased significantly only at 6 hours post-stress. (B) In males stressed chronically for 20, 40, and 50 consecutive days ROS production increased significantly. The fluorescence relative units of the three control groups were normalized to 1 and are represented as a control group. The values of the graph show the mean  $\pm$  SD ( $n=5$ ). One-way ANOVA. Tukey-Kramer post-test. \* $p<0.05$  compared with control group.

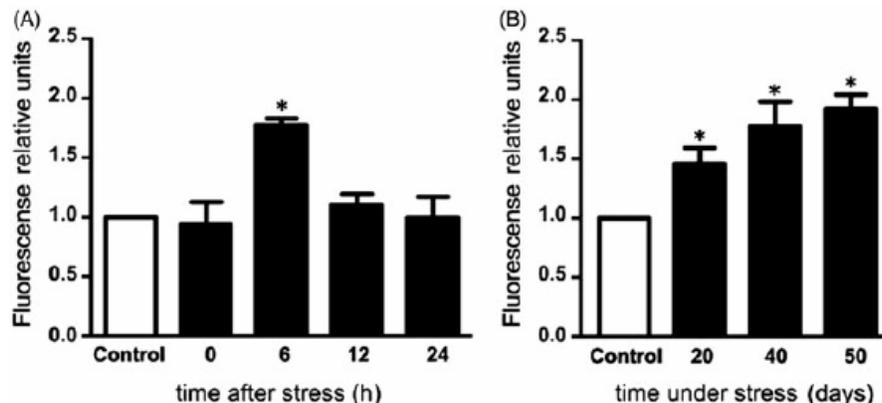


Figure 2. Lipid peroxidation (LPO) in the testis of rats acutely and chronically stressed. (A) LPO was evaluated at 0, 6, 12, and 24 hours after stress exposure in males exposed to one stress session. No significant differences were observed in the concentrations of lipid hydroperoxide. One-way ANOVA. (B) In males stressed chronically for 20, 40, and 50 consecutive days the concentrations of lipid hydroperoxide were significantly increased. The values of the graph show the mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). Two-way ANOVA. Tukey-Kramer post-test.  $*p < 0.05$  compared with their respective control group.

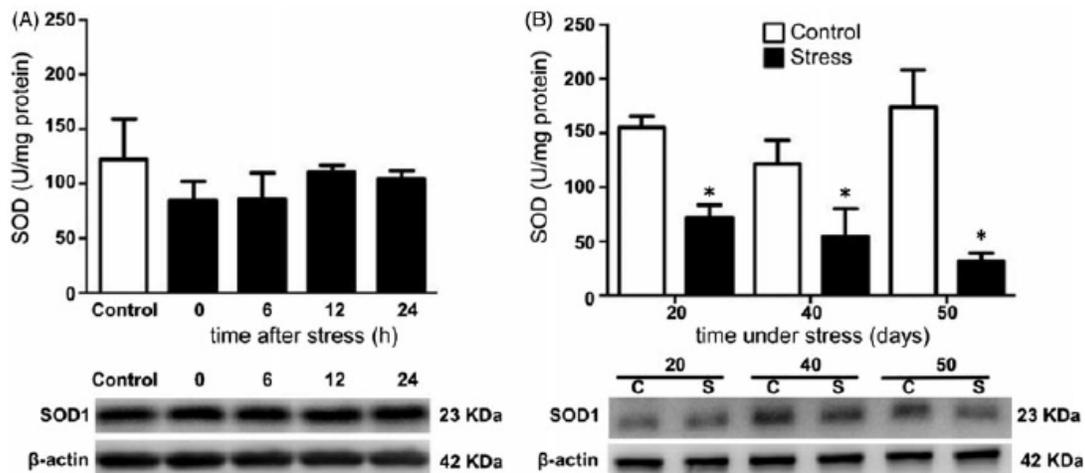
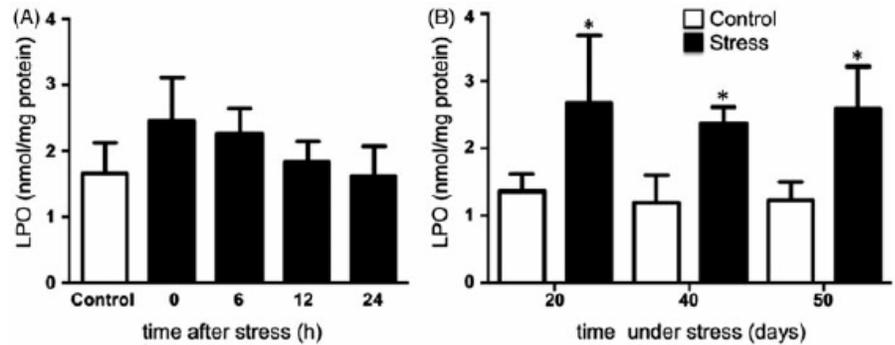


Figure 3. Total superoxide dismutase (SOD) activity and copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) expression in the testis of stressed rats. SOD1 expression was determined by Western blot (bottom panel). (A) In males exposed to one stress session no significant differences in the activity and expression of enzyme at 0, 6, 12, and 24 hours post-stress were observed. One-way ANOVA. (B) In males stressed chronically for 20, 40, and 50 consecutive days, total SOD activity decreased at different time points as result of chronic stress. The values of the graph show the mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). Two-way ANOVA. Tukey-Kramer post-test.  $*p < 0.05$  compared with their respective control group.

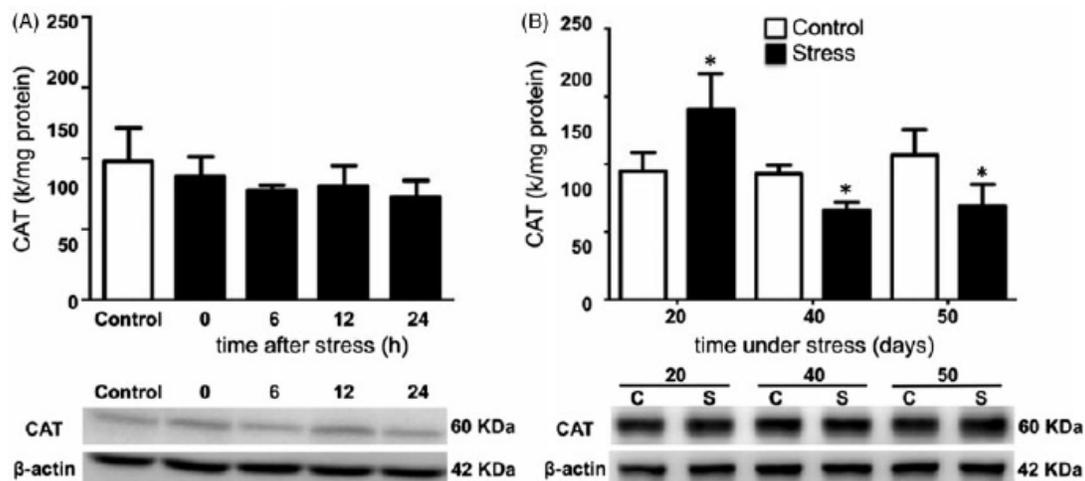


Figure 4. Activity and expression of catalase (CAT) in the testis of stressed rats. (A) No modification of CAT activity was observed in males exposed to one stress session at 0, 6, 12, and 24 hours post-stress. One-way ANOVA. Acute stress did not modify the expression of the enzyme. CAT expression was determined by Western blot (bottom panel). (B) In males stressed chronically for 20, 40, and 50 consecutive days, CAT activity increased after 20 days of stress and decreased at 40 and 50 days. The values of the graph show the mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). Two-way ANOVA. Tukey-Kramer post-test.  $*p < 0.05$  compared with their respective control group.

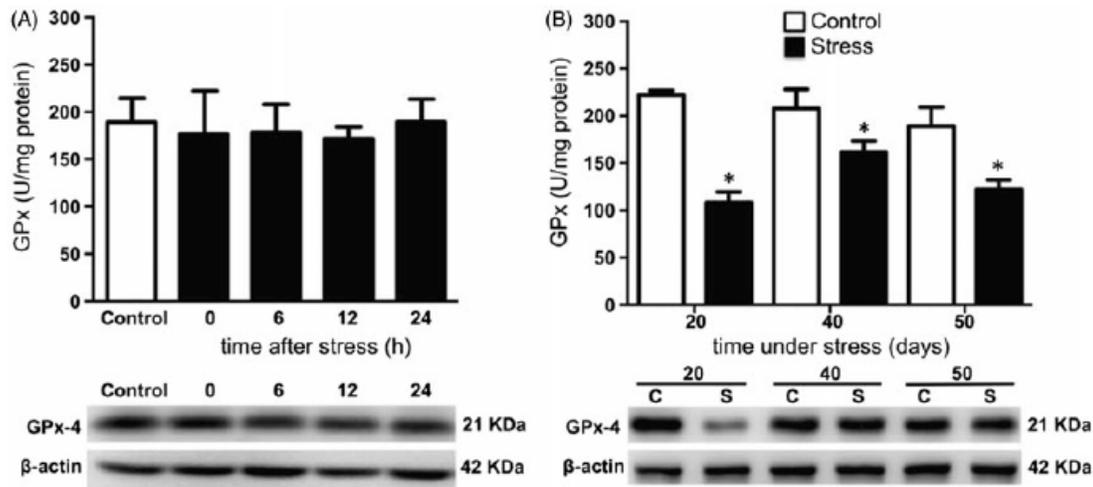


Figure 5. Total glutathione peroxidase (GPx) activity and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx-4) expression in the testis of stressed rats. (A) One stress session did not cause modifications in the activity and expression of enzyme at 0, 6, 12, and 24 hours post-stress. One-way ANOVA. (B) Total GPx activity in the testes of males stressed chronically for 20, 40, and 50 consecutive days decreased significantly. The expression of the GPx-4 was determined by Western blot (bottom panel). Western blot analysis showed that solely at 20 days of stress decreased the GPx-4 expression. The values of the graph show the mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). Two-way ANOVA. Tukey-Kramer post-test. \* $p < 0.05$  compared with their respective control group.

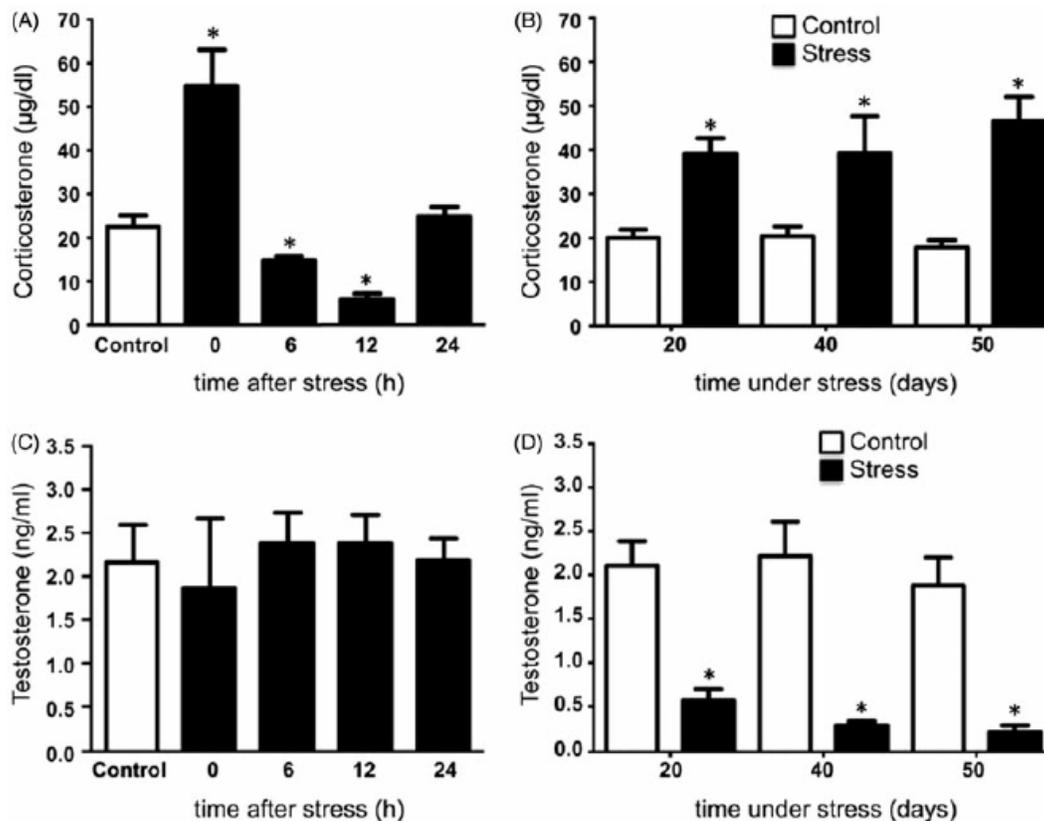


Figure 6. Serum corticosterone and testosterone levels in rats under acute and chronic stress. (A) Corticosterone increased significantly immediately after the exposure to the stressor and decreased at 6 and 12 hours post-stress, returning at 24 hours to similar concentrations to the control group. One-way ANOVA. (B) Corticosterone increased significantly in males stressed chronically for 20, 40, and 50 consecutive days. (C) Testosterone in males exposed to acute stress was not modified at 0, 6, 12, and 24 hours post-stress. One-way ANOVA. (D) Males stressed chronically for 20, 40, and 50 consecutive days showed a significant decrease in testosterone. The values of the graph show the mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). Two-way ANOVA. Tukey-Kramer post-test. \* $p < 0.05$  compared with the control group.

(Figures 3A, 4A, and 5A, bottom panel). Similarly, the expression of SOD1 and CAT remained unchanged on days 20, 40, and 50 of chronic stress (Figures 3B and 4B). The expression of GPx-4 decreased with 20 days of chronic stress,

but remained unchanged at 40 and 50 days (Figure 5B, lower panel).

Plasma levels of corticosterone increased significantly in rats exposed to cold-water immersion stress at hour 0, while

Table 1. Effect of cold water immersion stress on testicular weight.

Time (days)	20		40		50	
	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress
Testis (g)	1.74 ± 0.09	1.68 ± 0.13	1.76 ± 0.07	1.75 ± 0.10	2.01 ± 0.06	1.78 ± 0.08*

Data expressed as mean ± SD (*n* = 5).

Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test.

\**p* < 0.05 compared to control group.

Table 2. Effect of acute stress on epididymal sperm parameters.

Parameters	Control	Time after stress (hours)			
		0	6	12	24
Sperm total motility (%)	85.20 ± 4.9	83.20 ± 6.5	81.25 ± 2.9	84.60 ± 5.4	84.40 ± 4.2
Sperm viability (%)	84.80 ± 3.9	84.80 ± 1.7	86.25 ± 2.8	83.80 ± 4.8	80.60 ± 5.3
Sperm count (10 <sup>6</sup> /ml)	131.71 ± 11.5	132.92 ± 7.7	125.29 ± 16.9	130.56 ± 12.5	134.58 ± 18.5
Abnormal sperm (%)	7.96 ± 2.3	8.04 ± 2.3	9.6 ± 1.8	8.30 ± 1.4	8.76 ± 0.8

Data expressed as mean ± SD (*n* = 5).

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test.

Table 3. Effect of chronic stress on epididymal sperm parameters.

Time (days)	20		40		50	
	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress
Sperm total motility (%)	83.75 ± 3.0	62.80 ± 12.3*	84.80 ± 5.0	63.80 ± 3.1*	83.60 ± 2.2	60.20 ± 11.2*
Sperm viability (%)	86.45 ± 4.3	67.75 ± 8.2*	82.94 ± 4.0	64.20 ± 7.4*	84.55 ± 5.1	71.45 ± 7.0*
Sperm count (10 <sup>6</sup> /ml)	127.90 ± 29.8	70.77 ± 17.9*	143.42 ± 31.7	81.40 ± 20.1*	123.82 ± 21.1	85.55 ± 28.7*
Abnormal sperm (%)	8.08 ± 0.8	11.00 ± 1.4*	8.80 ± 0.9	13.12 ± 2.4*	9.64 ± 1.2	13.08 ± 1.2*

Data expressed as mean ± SD (*n* = 5).

Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test.

\**p* < 0.05 compared to control group.

at 6 and 12 hours post-stress corticosterone decreased compared to control males (Figure 6A). In males subjected to chronic stress, a significant increase of corticosterone occurred as compared to control males (Figure 6B). Acute stress did not modify testosterone in rats exposed to the stressor (Figure 6C), whereas testosterone was reduced at 20, 40, and 50 days of stress compared with the control group (Figure 6D).

In this study, we observed that testes weights of rats in the stress group at day 50 decreased significantly compared with the control group (Table 1).

Acute stress did not modify any of the sperm parameters analyzed (Table 2). The effect of chronic stress on motility, viability, total sperm count, and number of abnormal sperm cells is shown in Table 3. A significant decrease was observed in total motility, viability, and total sperm count in males exposed to stress for 20, 40, and 50 days as compared to control rats. A significant increase in the number of abnormal sperm was also observed in rats exposed to chronic stress.

The increase in serum corticosterone correlated positively with ROS and LPO in males under chronic stress. CAT activity correlated positively with corticosterone only at day 20 of stress. A negative correlation was observed with both SOD and GPx activities at all days of chronic stress. CAT activity at days 40 and 50 of stress, as well as testosterone also correlated negatively with corticosterone (Table 4).

Table 4. Pearson correlation between serum corticosterone and oxidative stress markers (ROS, LPO, SOD, CAT, GPx), and serum testosterone levels at different time points.

Days	20	40	50
Parameters			
ROS	0.847 (0.002)	0.750 (0.012)	0.974 (0.000)
LPO	0.773 (0.024)	0.828 (0.006)	0.771 (0.009)
SOD	-0.957 (0.000)	-0.700 (0.024)	-0.925 (0.000)
CAT	0.651 (0.041)	-0.644 (0.118)	-0.682 (0.030)
GPx	-0.937 (0.000)	-0.822 (0.004)	-0.893 (0.001)
Testosterone	-0.899 (0.000)	-0.848 (0.002)	-0.938 (0.000)

ROS: reactive oxygen species; LPO: lipid peroxides; SOD: total activity of superoxide dismutase; CAT: activity of catalase; GPx: total activity of glutathione peroxidase; Days: time points of 20, 40, and 50 consecutive days to exposure stressor. R (*p*). *p* is significant level (2-tailed).

The decrease in testosterone correlated positively with motility, viability, and sperm count, but negatively with the number of abnormal sperm (Table 5).

## Discussion

To date, the role played by increased ROS in the male reproductive organs has not been fully investigated. The effects of stress on the activity of antioxidant enzymes and

Table 5. Pearson correlation between serum testosterone and sperm parameters (sperm total motility, sperm viability, sperm count, and abnormal sperm) at different time points.

Days	20	40	50
Parameters			
Sperm total motility	0.812 (0.008)	0.933 (0.000)	0.835 (0.003)
Sperm viability	0.787 (0.007)	0.956 (0.000)	0.943 (0.000)
Sperm count	0.824 (0.003)	0.918 (0.000)	0.837 (0.003)
Abnormal sperm	-0.834 (0.003)	-0.752 (0.012)	-0.888 (0.001)

Days: 20, 40, and 50 consecutive days to exposure stressor. R (*p*)  
*p* is significant level (2-tailed)

LPO have been examined in the testes of rats subjected to chronic stress for 60 days. In the present work, we studied whether acute stress or shorter periods of chronic stress can cause oxidative stress in the testis and disruptions in sperm. In this study, it was shown that just one exposure to stress by cold-water immersion has an effect on ROS generation in the testis and that it is increased at 6 hours post-stress. However, the increase in ROS is not sustained and is reversible, reaching control levels after 12 hours. This ROS increment is not enough to cause oxidative stress since no LPO was observed after its increase. The activity and expression of SOD, CAT, and GPx enzymes were not modified at any time after acute stress. These results indicate that a single exposure to a stressor is not sufficient to cause oxidative stress in the testis, rather it causes a transient seemingly harmless modification of the cellular redox state.

Hormone level results showed that corticosterone rose immediately after the first exposure to stress; whereas, testosterone remained unaltered, indicating that acute stress does not compromise the steroidogenic function of the testis. In contrast, chronic exposure to stress caused an increase of corticosterone at 20, 40, and 50 days and a concomitant decrease of testosterone. The increase in serum corticosterone is an important indicator of stress [Sapolsky et al. 2000], and prolonged exposure to stress has been reported to cause oxidative damage in many tissues [Caro et al. 2007; Long et al. 2008; Sahin and Gumuslu 2007; Zafir and Banu 2009], including the testes [Nirupama et al. 2013; Priya and Reddy 2012]. The positive correlation between increased corticosterone and ROS and LPO, as well as SOD, CAT, and GPx activities suggests that increased glucocorticoids could be related with the decrease in antioxidant enzyme activity, thus increasing ROS and damage to lipids in the testis. These findings also indicate that chronic stress response causes damage to membrane lipids in testicular cells through the increase in ROS, thus affecting testicular steroidogenesis.

In addition, we found that ROS production increased in rats subjected to chronic stress, from day 20 to 50, suggesting that corticosterone may cause prolonged dysregulation of the redox state in the testis, leading to a condition of oxidative stress, as previously stated [Nayanatara 2005]. However, LPO and protein oxidation are inconclusive, since LPO increased significantly in rats exposed to stress from 20 to 50 days, nevertheless protein oxidation was not modified in any of those days (data not shown), suggesting that the damage to the testis is caused by a deregulation of the redox state and not by oxidative stress.

It has been reported that stress by immobilization for 60 days causes a decrease in the activity of SOD, CAT, and GPx in the testis [Nirupama et al. 2013]. Our results demonstrate that SOD activity decreases from day 20 of stress and remains so until day 50 of chronic stress. The decrease in SOD activity could be due to oxidation of its polypeptide chains during ROS increase [Goldstone et al. 2006; Hodgson and Fridovich 1975; MacMillan-Crow et al. 1998]. Additionally, we observed that chronic stress for 20 days caused an increase in CAT activity and a decrease in GPx activity. At this same time, ROS increased and GPx-4 expression decreased. It is likely that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated during chronic stress could have been metabolized, mainly by CAT and not by GPx [Forstrom et al. 1979], since CAT activity increases with high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, whereas GPx activates with low levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Cohen and Hochstein 1963]. This could explain the differences observed in the activity of CAT and GPx enzymes. ROS increased at 40 and 50 days of chronic stress. This increase could be due to the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by a direct reduction of O<sub>2</sub>. Peroxisomes in Leydig, Sertoli and peritubular cells, as well as in spermatogonia, spermatocytes, and round and elongated spermatids in the seminiferous tubules are another important source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as they contain a large number of oxidases, which generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Nenicu et al. 2007]. This could explain the increase in ROS production from days 20 to 50 of stress and not by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> originating from the dismutation of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> in the presence of SOD. Reduction in the activity of antioxidant enzymes indicates that exposure to chronic stress only alters their activity as a result of the imbalance of the redox state, since the expression of the enzymes was unchanged. The constant expression of enzymes could reflect a compensatory effect of the imbalance of the redox state.

In addition, we found that absolute weights of the testes decreased in rats stressed for 50 consecutive days; this indicates that these organs are vulnerable to prolonged stress, which has been considered an important parameter to assess the risk of toxic effects in the male reproductive system [Yavasoglu et al. 2008]. Along with testicular weight, chronic stress causes damage and loss of Leydig cells by apoptosis [Bitgul et al. 2013; Hou et al. 2014] and therefore, a decrease in testosterone levels. It is known that testosterone deprivation causes low motility and fertilizing capacity, and sperm death [Dyson and Orgebin-Crist 1973]. Androgen receptors are found throughout the epididymis of different species, including the rat [Goyal et al. 1997], and are mainly located in the principal cells, but can also be found in basal and apical cells [Zhou et al. 2002; Zhu et al. 2000]. Principal cells synthesize proteins necessary for sperm maturation [Hermo 1995; Hermo and Robaire 2002], and are the most sensitive epididymal cells to testosterone deprivation [Moore and Bedford 1979]. Since testosterone did not decrease after acute stress, this could explain the lack of effect on sperm parameters. In our study, after the rats were exposed to chronic stress, we observed a positive correlation between decreased testosterone and motility, viability, and sperm count, as well as a negative correlation with the number of abnormal sperm. A minimum period in the caput and corpus epididymis is required for the maturation processes of sperm [Franca et al. 2005]. The reduction in testosterone by stress accelerated the transit time of sperm through the epididymis

contributing to the alteration of sperm parameters, since transit time has an important role in sperm maturation [Fernandez et al. 2008]. The diminution in motility, viability, and sperm count of chronically stressed males could be due to the acceleration of sperm transit time in the epididymis, as it has been suggested in other studies [Klinefelter 2002]. In addition, we observed an increase in flagellar abnormalities, presence of cytoplasmic droplets, and alterations in the connecting piece that can lead to the separation of head and flagella. The detection of morphological abnormalities in sperm and their evaluation, allows inferences regarding changes in the functionality of testes that could affect the process of spermatogenesis, and/or epididymis functionality, particularly the sperm maturation process. In this study, we observed only flagella; the heads had been phagocytized by Sertoli cells or by epididymis macrophages [Baccetti et al. 1989; Chemes et al. 1999]. Droplets in sperm can induce swelling and flagellar angulation, both of which inhibit progressive motility and are associated with infertility [Cooper et al. 2004]. These results indicate that chronic stress alters the maturation process of sperm cells during their transit through the epididymis. It is also possible that the observed disturbances in motility, morphology, and sperm count can be correlated with high ROS levels in sperm, as previously reported in infertile patients [Agarwal et al. 2014].

Markers of oxidative stress were modified having undergone 20 days of chronic stress, so it is possible that the imbalance in the redox state in the testis could be started with fewer days of chronic stress. Spermatogenesis extends over approximately 52 days in the rat, and during 20 days of chronic stress the sperm parameters are altered, which would mean that the sperm formed during spermatogenesis are affected by chronic stress both in the late stage of spermatogenesis and in the epididymal environment.

In conclusion, our work shows that a single exposure to stress does not affect the antioxidant status in the testes, while chronic stress by cold water immersion significantly alters the redox state and impairs various testicular functions. This suggests weak testicular adaptation to constant or sustained challenges. These effects correlate with corticosterone increase. Finally, altered sperm parameters due to chronic stress might be a result of a decrease in the level of testosterone.

## Materials and Methods

### Animals and experimental design

A total of 55 adult male Wistar rats (90 day old, 300–320 g) were housed in polypropylene cages (50 cm x 30 cm x 20 cm). Rats were maintained under controlled temperature ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and lighting conditions (12/12 reversed light/dark cycle, lights off at 0900 h). Food and water were available *ad libitum* throughout the study. Rats were assigned randomly to one of the following groups: control ( $n = 20$ ), acute stress ( $n = 20$ ), and chronic stress ( $n = 15$ ). Control rats remained undisturbed in their cages throughout the experiment. The rats from the experimental groups were submitted to stress by cold-water immersion. Adequate measures were taken to minimize pain or discomfort in the experimental animals. Management of the rats throughout the experiments as well as

the method of euthanasia, were in accordance to international standards on animal welfare (NIH guidelines) and to Mexican Official guidelines (NOM-062-ZOO-1999).

### Stressor

This model combines physical stress (due to low temperature and shaking) and psychological stress (due to the impossibility to escape). Rats were placed individually in a covered tank of cold water (temperature =  $15^\circ\text{C}$ , depth = 15.5 cm) for 15 min to produce cold-water immersion stress. The rats either swam or remained in an upright position, keeping their head above water level. Acute stress was induced by exposing the rats once to the stressor at the onset of the dark phase (0900 h) of the light/dark cycle to avoid alterations in corticosterone levels. Chronic stress was induced by exposing the rats daily to the stressor for 20, 40, or 50 consecutive days at the onset of the dark phase of the cycle. Males stressed acutely were sacrificed at 0, 6, 12, and 24 h after exposure to the stressor. Animals exposed repeatedly to the stressor, were sacrificed at 20, 40, and 50 days, immediately after the last stress session. Five animals from each experimental group were anesthetized with a single injection of sodium pentobarbital (25 mg/kg body weight, i.p.) and subsequently sacrificed by exsanguination. The same procedure was carried out with the animals of the control groups.

### Biological samples

Blood samples were collected in glass centrifuge tubes by cardiac puncture. Blood was allowed to clot at room temperature and centrifuged ( $2000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 15 min) to separate serum. Serum samples were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until the time of corticosterone and testosterone extraction and determination by high-performance liquid chromatography (HPLC). The left testis was removed and washed with saline solution (0.9%, w/v), weighed, decapsulated, and clipped to evaluate ROS production, enzymatic activity, antioxidant enzyme expression, and LPO. Tissue destined to evaluate enzyme activity and expression was frozen in liquid nitrogen ( $-190^\circ\text{C}$ ) and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until use. The cauda epididymis was ligated. The ligature was placed between the distal corpus and the proximal cauda, and between the distal cauda and the vas deferens to avoid contamination of sperm from different regions of the caudal region. The caudal region was removed and washed with saline solution. Sperm were obtained from the cauda epididymis for qualitative and quantitative analysis.

### Reactive oxygen species measurement

ROS determination in testis was based on a modified fluorometric assay using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, SIGMA) as a ROS and cellular marker of oxidative stress [Kumar and Muralidhara 2007; LeBel et al. 1992]. Briefly, 0.1 g testis was homogenized in 600  $\mu\text{l}$  0.1 M phosphate buffer saline, pH 7.4. A total of 200  $\mu\text{l}$  of homogenate was pre-incubated with DCFH-DA (10  $\mu\text{M}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  to allow the probe to be incorporated into any membrane-bound vesicles, and the diacetate group cleaved by esterases. After 30 min of incubation, the conversion of DCFH to the fluorescent product 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) was

recorded using a fluorescent spectrophotometer DTX 880 multimodal detector (Beckman Coulter, Atlanta, GA, USA) with excitation at 480 nm and emission at 520 nm. Samples were recovered from each well and protein content in each sample was determined. The results were expressed as relative fluorescence units.

#### Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined by using a LPO assay kit (Calbiochem, USA) which measures lipid hydro peroxides (LOOHs) directly utilizing the redox reactions with ferrous ions [Mihaljevic et al. 1996]. Briefly, to 0.1 g testicular tissue freshly collected was added 400  $\mu$ l of HPLC-grade water and homogenized. A total of 300  $\mu$ l of homogenate was added to 600  $\mu$ l of chloroform and 300  $\mu$ l of methanol. The solution was mixed thoroughly and then centrifuged (1500 x g, 0°C, 5 min) to extract LOOHs from the chloroform layer. Then, 500  $\mu$ l of extract was mixed with 450  $\mu$ l of chloroform:methanol solvent and 50  $\mu$ l of freshly prepared chromogen (4.5 mM ferrous sulfate in 0.2 M HCl and 3% ammonium thiocyanate) in a glass tube. Absorbance was measured at 500 nm after 5 min incubation. LOOHs levels in the samples were calculated from a standard curve of LOOHs. Each serum was analyzed in duplicate, and LPO levels were expressed as nmol/mg protein.

#### Assessment of antioxidant enzymes

Testis were homogenized in 0.1 M HEPES buffer, pH 7.4 and centrifuged (5000 x g, 4°C, 10 min) [Arenas-Rios et al. 2007]. The aqueous phase was recovered and used for determination of enzymatic activity, as described.

Total SOD [EC 1.15.1.1] activity was measured employing generated superoxide radicals which react with chloride 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyl tetrazolium (INT) to form red formazan [Arthur and Boyne 1985]. SOD activity was measured by the degree of inhibition of this reaction. Total SOD activity was expressed as U/mg protein at 37°C (U = amount of enzyme which inhibits 50% of formazan). CAT [EC 1.11.1.6] activity was measured using hydrogen peroxide as substrate. The principle consists in reducing the color due to peroxidation reaction caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to KMnO<sub>4</sub>, and maintenance of color in the presence of CAT [Cohen et al. 1970]. Enzymatic activity was expressed as k/mg protein (k = first-order reaction rate constant) to 37°C. Total GPx [EC 1.11.1.9] activity was assayed using cumene hydroperoxide as substrate. This method measures the GPx activity indirectly by a coupled reaction to glutathione reductase [Paglia and Valentine 1967]. Enzyme activity was expressed as U/mg protein at 37°C (U = amount of enzyme that oxidizes 1.0 nmol of NADPH to NADP<sup>+</sup>/min).

#### Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described [Gomez-Quiroz et al. 2008]. Western blot was also performed using antibodies against SOD1 (Santa Cruz, TX, USA (sc-11407) 1:3,000), GPx-4 (Santa Cruz (sc-50497) 1:200), or CAT (Sigma Aldrich 1:3,000). Monoclonal  $\beta$ -actin was used as loading control (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA,

(A3854), 1:3,000). Immune complexes were detected using the enhanced chemiluminescence system (Pierce, IL, USA). Bands were visualized using a digital imaging system KODAK Gel Logic 1500 (New York, USA).

#### High-performance liquid chromatography analysis of hormones

Corticosterone and testosterone were extracted from serum and quantified by HPLC using a modification of the method reported by Woodward and Emery 1987 [Woodward and Emery 1987]. Serum (1 ml) was mixed with 100  $\mu$ l of 19-nortestosterone solution (5  $\mu$ g/ml in methanol/water, 60:40, v/v) as an internal standard. Steroids were extracted into 5 ml of diethyl ether:dichloromethane (60:40 v/v) by vortex mixing and immediately centrifuged (1050 x g, 4°C, 5 min). The organic phase was vortex mixed with 1 ml of HPLC-grade water. After a second centrifugation, organic phase (3 ml) was evaporated at room temperature. The residue was re-dissolved in 100  $\mu$ l of methanol:water (60:40 v/v). The guard column (Symmetry C18, particle size 3.5  $\mu$ m, 2.1 mm x 10 mm; Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA) and the column were equilibrated using HPLC-grade water:acetonitrile (65:35 v/v) at a flow rate of 0.4 ml/min. Separations were made at a temperature of 40°C, in a Waters Symmetry C18 column (particle size 5  $\mu$ m; column size 2.0 mm x 150 mm; Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA). A Waters 600-MS system controller was used to flush the mobile phase and the steroids were assessed using a 486 Water UV absorbance detector (fitted at 250 nm). The results were analyzed using the Millennium 32 software (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA). A series of standards covering the range of 0–50  $\mu$ g/dl to corticosterone and 0–34 ng/ml to testosterone were used in daily work. The regression line between the peak height and the levels of corticosterone and testosterone were calculated and used for determining the unknowns. Regression line for corticosterone was:  $y = 0.6464 + 0.01655x$  ( $r^2 = 0.99986$ ). For testosterone, the regression line was:  $y = 0.774 + 0.2181x$  ( $r^2 = 0.99893$ ). The detection limit of the assay for corticosterone was 0.05  $\mu$ g/dl and 0.05 ng/ml for testosterone.

#### Protein content determination

Protein concentration was determined using a bicinchoninic acid kit (Pierce Chemical), according to the manufacturer's instructions.

#### Sperm parameters

Sperm were obtained from the cauda epididymis by the chopped method using surgical scissors [Kaabi et al. 2003], allowing the exit of sperm. Sperm were diluted in 1 ml of saline solution, pre-warmed at 37°C. Sperm motility was assessed by counting motile and non-motile sperm from a total of 200. Sperm motility was expressed as percentage of motile sperm of the total sperm counted. Sperm viability was determined by eosin-nigrosin assay. Sperm viability was assessed by using the one-step eosin-nigrosin staining technique [Dott and Foster 1972]. A sample of 10  $\mu$ l of sperm suspension was mixed with 10  $\mu$ l of 0.67% eosin/10% nigrosin

stain and placed on a pre-warmed slide. Sperm viability was expressed as the percentage of unstained sperm of the total sperm counted (200). Sperm count was performed using a Neubauer's chamber as described [Nirupama et al. 2013]. The data were expressed as  $10^6/\text{ml}$  for sperm count. Sperm with morphological abnormalities in head and flagellum were counted. Morphological abnormalities were expressed as percentage of a total of 500 sperm counted.

### Data analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Hormone concentrations, LPO levels, antioxidant enzyme activity, sperm parameters (acute stress), and ROS generation (acute and chronic stress) were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Testicular weight, hormone concentrations, LPO levels, antioxidant enzyme activity, and sperm parameters under chronic stress were analyzed by two-way ANOVA, with condition and days as factors. Tukey-Kramer test was used for multiple comparisons. Pearson correlation was used to evaluate the correlation between corticosterone and oxidative stress markers, and testosterone with sperm parameters. The level of significance was fixed at  $p < 0.05$ .

### Acknowledgments

We thank CONACyT for financial support to ECG-D for her Ph.D. studies. The authors also express their gratitude to Edith Monroy for her advice on the language of the text.

### Declaration of interest

This study was partially funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología through agreement 309-0, code C/PFPN-2002-35-32; by ECGD (CVU/becario) 229367/212815, by PROMEP (103.5/09/1247) grants from MdSRM, and by the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Financial support was received from CONACyT to ECG-D for Ph.D. studies. The authors report no conflicts of interest.

### Author contributions

Study design: conceived, designed, and coordinated the study, evaluated steroid hormones, and participated in the critical review of the manuscript: MSIRM; Carried out the assessment of enzymatic antioxidants, western blot, LPO, ROS evaluation, statistical data analysis, and drafted the manuscript: ECGD; Participated in the critical review of the manuscript: LEGQ, EAR, AMA, JAIA. All authors read and approved the final version of the manuscript.

### References

- Agarwal, A., Mulgund, A., Sharma, R., and Sabanegh, E. (2014) Mechanisms of oligozoospermia: An oxidative stress perspective. *Syst Biol Reprod Med* **60**:206–16.
- Aitken, R.J. (1999) The Amoroso Lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis? *J Reprod Fertil* **115**:1–7.
- Aitken, R.J., and Clarkson, J.S. (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* **81**:459–69.
- Al-Joudi, F.S., and Jamil, J.A. (2012) Imprisonment-associated sperm clumping and male infertility. *J Int Med Res* **40**:393–7.
- Arenas-Rios, E., Leon-Galvan, M.A., Mercado, P.E., Lopez-Wilchis, R., Cervantes, D.L., and Rosado, A. (2007) Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in the testis of the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*) during its annual reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **148**: 150–8.
- Arthur, J.R., and Boyne, R. (1985) Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sci* **36**:1569–75.
- Baccetti, B., Burrini, A.G., Collodel, G., Magnano, A.R., Piomboni, P., Renieri, T., et al. (1989) Morphogenesis of the decapitated and decaudated sperm defect in two brothers. *Gamete Res* **23**:181–8.
- Baek, I.J., Seo, D.S., Yon, J.M., Lee, S.R., Jin, Y., Nahm, S.S., et al. (2007) Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice. *J Mol Histol* **38**:237–44.
- Bauche, F., Fouchard, M.H., and Jegou, B. (1994) Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett* **349**:392–6.
- Bilommi, R., Nawas, B.A., Kusmayadi, D.D., Diposarosa, R., Chairul, A., and Hernowo, B.S. (2013) The effects of glutathione on malondialdehyde expression and seminiferous tubule damage in experimental testicular torsion-detorsion in Wistar rats. *J Pediatr Urol* **9**:1059–63.
- Bitgul, G., Tekmen, I., Keles, D., and Oktay, G. (2013) Protective Effects of Resveratrol against Chronic Immobilization Stress on Testis. *ISRN Urol* **2013**:278720.
- Caro, P., Gomez, J., Sanz, A., Portero-Otin, M., Pamplona, R., and Barja, G. (2007) Effect of graded corticosterone treatment on aging-related markers of oxidative stress in rat liver mitochondria. *Biogerontology* **8**:1–11.
- Chemes, H.E., Puigdomenech, E.T., Carizza, C., Olmedo, S.B., Zanchetti, F., and Hermes, R. (1999) Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: A human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod* **14**:1811–18.
- Chidrawar, V., Chitme, H., Patel, K., Patel, N., Racharla, V., Dhoraji, N., et al. (2011) Effects of *Cynodon dactylon* on Stress-Induced Infertility in Male Rats. *J Young Pharm* **3**:26–35.
- Cohen, G., Dembiec, D., and Marcus, J. (1970) Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* **34**:30–8.
- Cohen, G., and Hochstein, P. (1963) Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes. *Biochemistry* **2**:1420–8.
- Collodel, G., Federico, M.G., Geminiani, M., Martini, S., Bonechi, C., Rossi, C., et al. (2011) Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reprod Toxicol* **31**: 239–46.
- Cooper, T.G., Yeung, C.H., Wagenfeld, A., Nieschlag, E., Poutanen, M., Huhtaniemi, I., et al. (2004) Mouse models of infertility due to swollen spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* **216**:55–63.
- Dastig, S., Nenicu, A., Otte, D.M., Zimmer, A., Seitz, J., Baumgart-Vogt, E., et al. (2011) Germ cells of male mice express genes for peroxisomal metabolic pathways implicated in the regulation of spermatogenesis and the protection against oxidative stress. *Histochem Cell Biol* **136**:413–25.
- Dhanabalan, S., Jubendradass, R., Latha, P., and Mathur, P.P. (2011) Effect of restraint stress on 2,3,7,8 tetrachloro dibenzo-p-dioxin induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* **30**:567–78.
- Dong, Q., Salva, A., Sottas, C.M., Niu, E., Holmes, M., and Hardy, M.P. (2004) Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. *J Androl* **25**:973–81.
- Doreswamy, K., and Muralidhara. (2005) Genotoxic consequences associated with oxidative damage in testis of mice subjected to iron intoxication. *Toxicology* **206**:169–78.
- Dott, H.M., and Foster, G.C. (1972) A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'life-dead' stain. *J Reprod Fertil* **29**:443–5.
- Dyson, A.L., and Orgebin-Crist, M.C. (1973) Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology* **93**:391–402.
- Elsharkawy, E.E., Yahia, D., and El-Nisr, N.A. (2012) Chlorpyrifos induced testicular damage in rats: Ameliorative effect of glutathione antioxidant. *Environ Toxicol* **29**:1011–19.
- Farombi, E.O., Abarikwu, S.O., Adesiyun, A.C., and Oyejola, T.O. (2013) Quercetin exacerbates the effects of subacute treatment of atrazine on reproductive tissue antioxidant defence system, lipid peroxidation and sperm quality in rats. *Andrologia* **45**:256–65.

- Fernandez, C.D., Porto, E.M., Arena, A.C., and Kempinas Wde, G. (2008) Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *Int J Androl* **31**:427–37.
- Forstrom, J.W., Stults, F.H., and Tappel, A.L. (1979) Rat liver cytosolic glutathione peroxidase: Reactivity with linoleic acid hydroperoxide and cumene hydroperoxide. *Arch Biochem Biophys* **193**:51–5.
- Franca, L.R., Avelar, G.F., and Almeida, F.F. (2005) Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* **63**:300–18.
- Ghosh, D., Das, U.B., Ghosh, S., Mallick, M., and Debnath, J. (2002) Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: A correlative study with testicular oxidative stress. *Drug Chem Toxicol* **25**:281–92.
- Goldstone, A.B., Liochev, S.I., and Fridovich, I. (2006) Inactivation of copper, zinc superoxide dismutase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Mechanism of protection. *Free Radic Biol Med* **41**:1860–3.
- Gomez-Quiroz, L.E., Factor, V.M., Kaposi-Novak, P., Coulouarn, C., Conner, E.A., and Thorgeirsson, S.S. (2008) Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **283**:14581–9.
- Goyal, H.O., Bartol, F.F., Wiley, A.A., Khalil, M.K., Chiu, J., and Vig, M.M. (1997) Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats. *Anat Rec* **249**:54–62.
- Gu, W., and Hecht, N.R. (1996) Translation of a testis-specific Cu/Zn superoxide dismutase (SOD-1) mRNA is regulated by a 65-kilodalton protein which binds to its 5' untranslated region. *Mol Cell Biol* **16**:4535–43.
- Hermo, L. (1995) Structural features and functions of principal cells of the intermediate zone of the epididymis of adult rats. *Anat Rec* **242**:515–30.
- Hermo, L.R., and Robaire, B. (2002) Epididymis cell types and their function. In: *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Robaire, B., and Hinton, B.T., eds. New York: Kluwer Academic/Plenum, pp. 81–102.
- Hodgson, E.K., and Fridovich, I. (1975) The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: Inactivation of the enzyme. *Biochemistry* **14**:5294–9.
- Hou, G., Xiong, W., Wang, Chen, X., and Yuan, T.F. (2014) Chronic stress influences sexual motivation and causes damage to testicular cells in male rats. *J Sex Med* **11**:653–63.
- Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., et al. (2003) Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* **60**:1249–59.
- Kaur, P., Kaur, G., and Bansal, M.P. (2006) Tertiary-butyl hydroperoxide induced oxidative stress and male reproductive activity in mice: Role of transcription factor NF- $\kappa$ B and testicular antioxidant enzymes. *Reprod Toxicol* **22**:479–84.
- Kirby, E.D., Geraghty, A.C., Ubuka, T., Bentley, G.E., and Kaufer, D. (2009) Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:11324–9.
- Klinefelter, G.R. (2002) Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Robaire, B., and Hinton, B.T., eds. Kluwer Academic Plenum Publishers, pp. 353–69.
- Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S.F., Flugge, G., Korte, S.M., et al. (2011) Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* **35**:1291–301.
- Kumar, T.R., and Muralidhara. (2007) Induction of oxidative stress by organic hydroperoxides in testis and epididymal sperm of rats in vivo. *J Androl* **28**:77–85.
- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S.C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* **5**:227–31.
- Leong, C.T., D'Souza, U.J., Iqbal, M., and Mustapha, Z.A. (2013) Lipid peroxidation and decline in antioxidant status as one of the toxicity measures of diazinon in the testis. *Redox Rep* **18**:155–64.
- Long, F., Wang, Y., Qi, H.H., Zhou, X., and Jin, X.Q. (2008) Rapid nongenomic effects of glucocorticoids on oxidative stress in a guinea pig model of asthma. *Respirology* **13**:227–32.
- Luers, G.H., Thiele, S., Schad, A., Volkl, A., Yokota, S., and Seitz, J. (2006) Peroxisomes are present in murine spermatogonia and disappear during the course of spermatogenesis. *Histochem Cell Biol* **125**:693–703.
- MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., and Thompson, J.A. (1998) Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* **37**:1613–22.
- Maheshwari, A., Misro, M.M., Aggarwal, A., Sharma, R.K., and Nandan, D. (2009) Pathways involved in testicular germ cell apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro. *FEBS J* **276**:870–81.
- McGrady, A.V. (1984) Effects of psychological stress on male reproduction: A review. *Arch Androl* **13**:1–7.
- Mihaljevic, B., Katusin-Razem, B., and Razem, D. (1996) The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radic Biol Med* **21**:53–63.
- Moore, H.D., and Bedford, J.M. (1979) Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anat Rec* **193**:293–311.
- Mruk, D.D., Silvestrini, B., Mo, M.Y., and Cheng, C.Y. (2002) Antioxidant superoxide dismutase – a review: Its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* **65**:305–11.
- Mupfiga, C., Fisher, D., Kruger, T., and Henkel, R. (2013) The relationship between seminal leukocytes, oxidative status in the ejaculate, and apoptotic markers in human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med* **59**:304–11.
- Nayanatara, A.K., Nagaraja, H.S., Anupama, B.K. (2005) The effect of repeated swimming stress on organ weights and lipid peroxidation in rats. *Thai J Pharm Sci* **18**:3–9.
- Nenicu, A., Luers, G.H., Kovacs, W., David, M., Zimmer, A., Bergmann, M., et al. (2007) Peroxisomes in human and mouse testis: Differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biol Reprod* **77**:1060–72.
- Nirupama, M., Devaki, M., Nirupama, R., and Yajurvedi, H.N. (2013) Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *J Physiol Biochem* **69**:59–68.
- Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I.J., and Goldstein, D.S. (1998) Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: A test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* **275**:R1247–55.
- Paglia, D.E., and Valentine, W.N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* **70**:158–69.
- Parodi, J. (2014) Motility, viability, and calcium in the sperm cells. *Syst Biol Reprod Med* **60**:65–71.
- Priya, P.H., and Reddy, P.S. (2012) Effect of restraint stress on lead-induced male reproductive toxicity in rats. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* **317**:455–65.
- Rivier, C., and Rivest, S. (1991) Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod* **45**:523–32.
- Sahin, E., and Gumuslu, S. (2007) Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **144**:342–7.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., and Munck, A.U. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* **21**:55–89.
- Sepaniak, S., Forges, T., Fontaine, B., Gerard, H., Foliguet, B., Guillet-May, F., et al. (2004) [Negative impact of cigarette smoking on male fertility: From spermatozoa to the offspring]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **33**:384–90.
- Sies, H. (1997) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* **82**:291–5.
- Sikka, S.C. (2001) Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* **8**:851–62.
- Srivastava, R.K., Taylor, M.F., and Mann, D.R. (1993) Effect of immobilization stress on plasma luteinizing hormone, testosterone, and corticosterone concentrations and on 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the testes of adult rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **204**:231–5.
- Weir, C.P., and Robaire, B. (2007) Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species

- production during aging in the Brown Norway rat. *J Androl* **28**: 229–40.
- Woodward, C.J. and Emery, P.W. (1987) Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **419**:280–4.
- Yavasoglu, A., Karaaslan, M.A., Uyanikgil, Y., Sayim, F., Ates, U., and Yavasoglu, N.U. (2008) Toxic effects of anatoxin-a on testes and sperm counts of male mice. *Exp Toxicol Pathol* **60**:391–6.
- Zafir, A. and Banu, N. (2009) Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. *Indian J Biochem Biophys* **46**:53–8.
- Zhou, Q., Nie, R., Prins, G.S., Saunders, P.T., Katzenellenbogen, B.S., and Hess, R.A. (2002) Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* **23**: 870–81.
- Zhu, L.J., Hardy, M.P., Inigo, I.V., Huhtaniemi, I., Bardin, C.W., and Moo-Young, A.J. (2000) Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: A quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod* **63**:368–76.
- Zini, A. and Schlegel, P.N. (2003) Effect of hormonal manipulation on mRNA expression of antioxidant enzymes in the rat testis. *J Urol* **169**: 767–71.

## 11 EFERENCIAS

Agarwal, A., Makker, K. and Sharma, R. (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* **59**:2-11.

Agarwal, A. and Prabakaran, S.A. (2005) Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol* **43**:963-974.

Ahmad, A., Rasheed, N., Chand, K., Maurya, R., Banu, N. and Palit, G. (2012) Restraint stress-induced central monoaminergic & oxidative changes in rats & their prevention by novel *Ocimum sanctum* compounds. *Indian J Med Res* **135**:548-554.

Aitken, J. and Fisher, H. (1994) Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* **16**:259-267.

Aitken, R.J. (1995) Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* **7**:659-668.

Aitken, R.J. and Clarkson, J.S. (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* **81**:459-469.

Aitken, R.J., Clarkson, J.S. and Fishel, S. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* **41**:183-197.

Aitken, R.J., Harkiss, D. and Buckingham, D.W. (1993) Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **35**:302-315.

Aitken, R.J. and Roman, S.D. (2008) Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* **1**:15-24.

Aitken, R.J., Smith, T.B., Jobling, M.S., Baker, M.A. and De Iulii, G.N. (2014) Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* **16**:31-38.

Almeida, S.A., Kempinas, W.G. and Lamano Carvalho, T.L. (2000) Sexual behavior and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress. *Braz J Med Biol Res* **33**:1105-1109.

Alvarez, J.G. and Storey, B.T. (1984) Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* **30**:833-841.

Anderson, R.A., Evans, L.W., Irvine, D.S., McIntyre, M.A., Groome, N.P. and Riley, S.C. (1998) Follistatin and activin A production by the male reproductive tract. *Hum Reprod* **13**:3319-3325.

Andreis, P.G., Neri, G., Mazzocchi, G., Musajo, F. and Nussdorfer, G.G. (1992) Direct secretagogue effect of corticotropin-releasing factor on the rat adrenal cortex: the involvement of the zona medullaris. *Endocrinology* **131**:69-72.

Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E. and Starkov, A.A. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* **70**:200-214.

Antoni, F.A. (1993) Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol* **14**:76-122.

Arenas-Rios, E., Leon-Galvan, M.A., Mercado, P.E., Lopez-Wilchis, R., Cervantes, D.L. and Rosado, A. (2007) Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in the testis of the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*) during its annual reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **148**:150-158.

Arthur, J.R. and Boyne, R. (1985) Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sci* **36**:1569-1575.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M. (1991) Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J* **273 ( Pt 3)**:601-604.

Atkinson, H.C. and Waddell, B.J. (1997) Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology* **138**:3842-3848.

Baccetti, B., Burrini, A.G., Collodel, G., Magnano, A.R., Piomboni, P., Renieri, T., et al. (1989) Morphogenesis of the decapitated and decaudated sperm defect in two brothers. *Gamete Res* **23**:181-188.

Baek, I.J., Seo, D.S., Yon, J.M., Lee, S.R., Jin, Y., Nahm, S.S., et al. (2007) Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice. *J Mol Histol* **38**:237-244.

Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demaux, N., et al. (2001) A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* **276**:37594-37601.

Bauche, F., Fouchard, M.H. and Jegou, B. (1994) Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett* **349**:392-396.

Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V. and Davies-Morel, M.C. (2000) The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl* **21**:895-902.

Beckman, J.S. (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* **9**:836-844.

Bedford, J.M. (1975) Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In: *Handbook of physiology, section 7. Endocrinology*. Eds. Hamilton, D.W. and Greep, R.O. American Physiological Society. Bethesda. St. Louis, Missouri, USA. Vol. 5, pp 303-317.

Bekris, S., Antoniou, K., Daskas, S. and Papadopoulou-Daifoti, Z. (2005) Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. *Behav Brain Res* **161**:45-59.

Benten, W.P., Lieberherr, M., Giese, G., Wrehlke, C., Stamm, O., Sekeris, C.E., et al. (1999) Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J* **13**:123-133.

Bhattacharya, A., Ghosal, S. and Bhattacharya, S.K. (2001) Anti-oxidant effect of *Withania somnifera* glycowithanolides in chronic footshock stress-induced perturbations of oxidative free radical scavenging enzymes and lipid peroxidation in rat frontal cortex and striatum. *J Ethnopharmacol* **74**:1-6.

Bjelakovic, G., Stojanovic, I., Jevtovic Stoimenov, T., Pavlovic, D., Kocic, G., Rossi, S., et al. (2010) Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis. *Amino Acids* **39**:29-43.

Bornstein, S.R., Rutkowski, H. and Vrezas, I. (2004) Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* **215**:135-141.

Buttgereit, F. and Scheffold, A. (2002) Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* **67**:529-534.

Campos, A.C., Fogaca, M.V., Aguiar, D.C. and Guimaraes, F.S. (2013) Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev Bras Psiquiatr* **35 Suppl 2**:S101-111.

Cannon, W. (1929) Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: An account into the function of emotional excitement. Nueva York. Appleton.function of emotional excitement.

Cárdenas-Rodríguez, N., Medina-Campos, O.N., and Pedraza-Chavarrí, J. (2008) Glutathione peroxidases: una familia de enzimas. In: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Ed. Konigsberg, M. Manual Moderno. México D.F., pp 201–217.

Carrasco, G.A. and Van de Kar, L.D. (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* **463**:235-272.

Caso, J.R., Leza, J.C. and Menchen, L. (2008) The effects of physical and psychological stress on the gastro-intestinal tract: lessons from animal models. *Curr Mol Med* **8**:299-312.

Celino, F.T., Yamaguchi, S., Miura, C., Ohta, T., Tozawa, Y., Iwai, T., et al. (2011) Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *PLoS One* **6**:e16938.

Chemes, H.E., Puigdomenech, E.T., Carizza, C., Olmedo, S.B., Zanchetti, F. and Hermes, R. (1999) Acepahic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod* **14**:1811-1818.

Chemes, H.E. and Rawe, V.Y. (2010) The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis. *Cell Tissue Res* **341**:349-357.

Clegg , E.D., Perreault, D. and Klinefelter, G.R. (2001) Assessment of male reproductive toxicity. In: Principles and Methods of Toxicology. Ed. Hayes, A. W. Taylor and Francis. Philadelphia, pp 1263-1300.

Clermont, Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* **52**:198-236.

Cohen, G., Dembiec, D. and Marcus, J. (1970) Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* **34**:30-38.

Cohen, G. and Hochstein, P. (1963) Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes. *Biochemistry* **2**:1420-1428.

Cohen, R.M., Szczepanik, J., McManus, M., Mirza, N., Putnam, K., Levy, J., et al. (2006) Hippocampal atrophy in the healthy is initially linear and independent of age. *Neurobiol Aging* **27**:1385-1394.

Cooper, T.G. (2011) The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl* **13**:130-138.

Cooper, T.G. (1998) Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* **53**:119-136.

Cooper, T.G., Yeung, C.H., Wagenfeld, A., Nieschlag, E., Poutanen, M., Huhtaniemi, I., et al. (2004) Mouse models of infertility due to swollen spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* **216**:55-63.

Costantini, D., Fanfani, A. and Dell'omo, G. (2008) Effects of corticosteroids on oxidative damage and circulating carotenoids in captive adult kestrels (*Falco tinnunculus*). *J Comp Physiol B* **178**:829-835.

Costantini, D., Marasco, V. and Moller, A.P. (2011) A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *J Comp Physiol B* **181**:447-456.

Cote, J., Meylan, S., Clobert, J. and Voituron, Y. (2010) Carotenoid-based coloration, oxidative stress and corticosterone in common lizards. *J Exp Biol* **213**:2116-2124.

Cuasnicu, P., Cohen, D.J., Ellerman, D.A., Busso, D., Da Ros, V.G., and Morgenfeld, M.M. (2002) Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. In: *The Epididymis – From Molecules to Clinical Practice*. Eds. Robaire, B. and Hinton, B.T. Kluwer Academic/Plenum Publisher. New York, pp. 389-403.

Czapski, G. (1984) Reaction of .OH. *Methods Enzymol* **105**:209-215.

Dacheux, J.L., Gatti, J.L. and Dacheux, F. (2003) Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* **61**:7-17.

Dastig, S., Nenicu, A., Otte, D.M., Zimmer, A., Seitz, J., Baumgart-Vogt, E., et al. (2011) Germ cells of male mice express genes for peroxisomal metabolic pathways implicated in the regulation of spermatogenesis and the protection against oxidative stress. *Histochem Cell Biol* **136**:413-425.

de Kloet, E.R., Joels, M., and Holsboer, F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* **6**:463-475.

de Kretser, D.M., Hedger, M.P., Loveland, K.L. and Phillips, D.J. (2002) Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update* **8**:529-541.

de Kretser, D.M. and Kerr, J.B. (1994) The Cytology of the Testis. In: *The physiology of reproduction*. Eds. Knobil, E. and Neill, J. 2<sup>o</sup> ed. Raven Press, Ltd. New York, pp 837-932.

de Lamirande, E. and Gagnon, C. (1992) Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* **13**:379-386.

De wiedz, D. (1980) Pituitary-adrenal system hormones and behavior. In: *Selye's guide to stress research*. Eds. Selye, H. and Ha, H.Y. Van Nostrand Reinhold. New York. Vol. 1, pp 252-279.

Demonacos, C., Djordjevic-Markovic, R., Tsawdaroglou, N. and Sekeris, C.E. (1995) The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: the interaction of the glucocorticoid receptor with mitochondrial DNA sequences showing partial similarity to the nuclear glucocorticoid responsive elements. *J Steroid Biochem Mol Biol* **55**:43-55.

Depke, M., Steil, L., Domanska, G., Volker, U., Schutt, C. and Kiank, C. (2009) Altered hepatic mRNA expression of immune response and apoptosis-associated genes after acute and chronic psychological stress in mice. *Mol Immunol* **46**:3018-3028.

Dhanabalan, S., Jubendradass, R., Latha, P. and Mathur, P.P. (2011) Effect of restraint stress on 2,3,7,8 tetrachloro dibenzo-p-dioxin induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* **30**:567-578.

Dhanabalan, S. and Mathur, P.P. (2009) Low dose of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces testicular oxidative stress in adult rats under the influence of corticosterone. *Exp Toxicol Pathol* **61**:415-423.

Dong, Q., Salva, A., Sottas, C.M., Niu, E., Holmes, M. and Hardy, M.P. (2004) Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. *J Androl* **25**:973-981.

Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**:47-95.

Dufaure, J.P., Lareyre, J.J., Schwaab, V., Mattei, M.G. and Drevet, J.R. (1996) Structural organization, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding genes. *C R Acad Sci III* **319**:559-568.

Dym, M. and Clermont, Y. (1970) Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *Am J Anat* **128**:265-282.

Dyson, A.L. and Orgebin-Crist, M.C. (1973) Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology* **93**:391-402.

Eacker, S.M., Agrawal, N., Qian, K., Dichek, H.L., Gong, E.Y., Lee, K., et al. (2008) Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. *Mol Endocrinol* **22**:623-635.

Eddy, E.M. (1998) Regulation of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **9**:451-457.

El-Taieb, M.A., Herwig, R., Nada, E.A., Greilberger, J. and Marberger, M. (2009) Oxidative stress and epididymal sperm transport, motility and morphological defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **144 Suppl 1**:S199-203.

Falkenstein, E., Tillmann, H.C., Christ, M., Feuring, M. and Wehling, M. (2000) Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* **52**:513-556.

Faure, J., Ghyselinck, N.B., Jimenez, C. and Dufaure, J.P. (1991) Specific distribution of messenger ribonucleic acids for 24-kilodalton proteins in the mouse epididymis as revealed by in situ hybridization: developmental expression and regulation in the adult. *Biol Reprod* **44**:13-22.

Feldman, R., Meyer, J., and Quenzer, L. (1997) Principles of Neuropsychopharmacology. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, pp. 495-548.

Ferin, M. (2006) Stress and the reproductive system. In: Physiology of reproduction 3rd edition. Eds. Knobil, E. and Neil, J.D. Elsevier. St. Louis, Missouri, USA. St. Louis, Missouri, USA. Vol. 2, pp. 2627-2696.

Fernandez, C.D., Porto, E.M., Arena, A.C. and Kempinas Wde, G. (2008) Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *Int J Androl* **31**:427-437.

Foa, E.B., Zinbarg, R. and Rothbaum, B.O. (1992) Uncontrollability and unpredictability in post-traumatic stress disorder: an animal model. *Psychol Bull* **112**:218-238.

Forstrom, J.W., Stults, F.H. and Tappel, A.L. (1979) Rat liver cytosolic glutathione peroxidase: reactivity with linoleic acid hydroperoxide and cumene hydroperoxide. *Arch Biochem Biophys* **193**:51-55.

Fraga, C.G., Motchnik, P.A., Shigenaga, M.K., Helbock, H.J., Jacob, R.A. and Ames, B.N. (1991) Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:11003-11006.

Franca, L.R., Avelar, G.F. and Almeida, F.F. (2005) Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* **63**:300-318.

Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* **201**:875-880.

Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **64**:97-112.

Gamaro, G.D., Manoli, L.P., Torres, I.L., Silveira, R. and Dalmaz, C. (2003) Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int* **42**:107-114.

Gao, H.B., Tong, M.H., Hu, Y.Q., Guo, Q.S., Ge, R. and Hardy, M.P. (2002) Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells. *Endocrinology* **143**:130-138.

Gao, H.B., Tong, M.H., Hu, Y.Q., You, H.Y., Guo, Q.S., Ge, R.S., et al. (2003) Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* **199**:153-163.

Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, M.C., Sharma, R.K., Alvarez, J.G., Thomas, A.J., Jr., et al. (2001) Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* **16**:1922-1930.

Godeas, C., Tramer, F., Micali, F., Soranzo, M., Sandri, G. and Panfili, E. (1997) Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* **57**:1502-1508.

Goldstone, A.B., Liochev, S.I. and Fridovich, I. (2006) Inactivation of copper, zinc superoxide dismutase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : mechanism of protection. *Free Radic Biol Med* **41**:1860-1863.

- Gollenberg, A.L., Liu, F., Brazil, C., Drobnis, E.Z., Guzick, D., Overstreet, J.W., et al. (2010) Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertil Steril* **93**:1104-1111.
- Gomez, E., Irvine, D.S. and Aitken, R.J. (1998) Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl* **21**:81-94.
- Goyal, H.O., Bartol, F.F., Wiley, A.A., Khalil, M.K., Chiu, J. and Vig, M.M. (1997) Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats. *Anat Rec* **249**:54-62.
- Granot, Z., Geiss-Friedlander, R., Melamed-Book, N., Eimerl, S., Timberg, R., Weiss, A.M., et al. (2003) Proteolysis of normal and mutated steroidogenic acute regulatory proteins in the mitochondria: the fate of unwanted proteins. *Mol Endocrinol* **17**:2461-2476.
- Gray, P.C., Bilezikjian, L.M. and Vale, W. (2002) Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan. *Mol Cell Endocrinol* **188**:254-260.
- Greenstein, S., Ghias, K., Krett, N.L. and Rosen, S.T. (2002) Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res* **8**:1681-1694.
- Gu, W. and Hecht, N.B. (1996) Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *J Androl* **17**:256-262.
- Guthrie, H.D. and Welch, G.R. (2012) Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* **78**:1700-1708.
- Hales, D.B. and Payne, A.H. (1989) Glucocorticoid-mediated repression of P450scc mRNA and de novo synthesis in cultured Leydig cells. *Endocrinology* **124**:2099-2104.
- Halliwell, B. (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* **31**:261-272.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999) Free radicals in biology and medicine.
- Harris, R.B., Zhou, J., Youngblood, B.D., Rybkin, II, Smagin, G.N. and Ryan, D.H. (1998) Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. *Am J Physiol* **275**:R1928-1938.
- Hecht, N.B. (1998) Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays* **20**:555-561.
- Herman, J.P., Adams, D. and Prewitt, C. (1995) Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology* **61**:180-190.
- Hermo, L. (1995) Structural features and functions of principal cells of the intermediate zone of the epididymis of adult rats. *Anat Rec* **242**:515-530.
- Hermo, L. and Robaire, B. (2002) Epididymis cell types and their function. In *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Eds. Robaire, B and Hinton, B.T. Kluwer Academic/Plenum. New York, pp 81–102.

Hinton, B.T. and Palladino, M.A. (1995) Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc Res Tech* **30**:67-81.

Hjollund, N.H., Bonde, J.P., Henriksen, T.B., Giwercman, A., Olsen, J. and Danish First Pregnancy Planner Study, T. (2004) Reproductive effects of male psychologic stress. *Epidemiology* **15**:21-27.

Hodgson, E.K. and Fridovich, I. (1975) The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* **14**:5294-5299.

Hou, G., Xiong, W., Wang, M., Chen, X. and Yuan, T.F. (2014) Chronic stress influences sexual motivation and causes damage to testicular cells in male rats. *J Sex Med* **11**:653-663.

Hu, G.X., Lian, Q.Q., Lin, H., Latif, S.A., Morris, D.J., Hardy, M.P., et al. (2008) Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. *Steroids* **73**:1018-1024.

Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.J. and Azhar, S. (2010) Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond)* **7**:47.

Imai, H. and Nakagawa, Y. (2003) Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* **34**:145-169.

Imlay, J.A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* **57**:395-418.

Jervis, K.M. and Robaire, B. (2001) Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol Reprod* **65**:696-703.

Jezek, P. and Hlavata, L. (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:2478-2503.

Jimenez, C., Lefrancois, A.M., Ghyselinck, N.B. and Dufaure, J.P. (1992) Characterization and hormonal regulation of 24 kDa protein synthesis by the adult murine epididymis. *J Endocrinol* **133**:197-203.

Johnson, E.O., Kamilaris, T.C., Chrousos, G.P. and Gold, P.W. (1992) Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev* **16**:115-130.

Jung, A., Schill, W.B. and Schuppe, H.C. (2002) Genital heat stress in men of barren couples: a prospective evaluation by means of a questionnaire. *Andrologia* **34**:349-355.

Kaipia, A., Penttila, T.L., Shimasaki, S., Ling, N., Parvinen, M. and Toppari, J. (1992) Expression of inhibin beta A and beta B, follistatin and activin-A receptor messenger ribonucleic acids in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* **131**:2703-2710.

Kampa, M., Papakonstanti, E.A., Hatzoglou, A., Stathopoulos, E.N., Stournaras, C. and Castanas, E. (2002) The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors that increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. *FASEB J* **16**:1429-1431.

Kamper, E.F., Chatzigeorgiou, A., Tsimpoukidi, O., Kamper, M., Dalla, C., Pitychoutis, P.M., et al. (2009) Sex differences in oxidant/antioxidant balance under a chronic mild stress regime. *Physiol Behav* **98**:215-222.

Kasahara, E., Sato, E.F., Miyoshi, M., Konaka, R., Hiramoto, K., Sasaki, J., et al. (2002) Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem J* **365**:849-856.

Kaur, P., Kaur, G. and Bansal, M.P. (2006) Tertiary-butyl hydroperoxide induced oxidative stress and male reproductive activity in mice: role of transcription factor NF-kappaB and testicular antioxidant enzymes. *Reprod Toxicol* **22**:479-484.

Kerr, J.B. (1992) Functional cytology of the human testis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **6**:235-250.

Kirchhoff, C., Pera, I., Derr, P., Yeung, C.H. and Cooper, T. (1997) The molecular biology of the sperm surface. Post-testicular membrane remodelling. *Adv Exp Med Biol* **424**:221-232.

Kitay, J.I. (1961) Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology* **68**:818-824.

Klinefelter, G.R. (2002) Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: *The Epididymis—From Molecules to Clinical Practice*. Eds. Robaire, B, and Hinton, B.T. Kluwer Academic Plenum Publisher. New York, pp. 353-369.

Klinefelter, G.R. and Suarez, J.D. (1997) Toxicant-induced acceleration of epididymal sperm transit: androgen-dependent proteins may be involved. *Reprod Toxicol* **11**:511-519.

Kodama, H., Kuribayashi, Y. and Gagnon, C. (1996) Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl* **17**:151-157.

Kohen, R. and Nyska, A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* **30**:620-650.

Koizumi, T. and Li, Z.G. (1992) Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer. *J Toxicol Environ Health* **37**:25-36.

Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S.F., Flugge, G., Korte, S.M., et al. (2011) Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* **35**:1291-1301.

Koppers, A.J., De Iuliis, G.N., Finnie, J.M., McLaughlin, E.A. and Aitken, R.J. (2008) Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* **93**:3199-3207.

Koufali, M.M., Moutsatsou, P., Sekeris, C.E. and Breen, K.C. (2003) The dynamic localization of the glucocorticoid receptor in rat C6 glioma cell mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* **209**:51-60.

Kumar, T.R. and Muralidhara. (2007) Induction of oxidative stress by organic hydroperoxides in testis and epididymal sperm of rats in vivo. *J Androl* **28**:77-85.

Kyrou, I. and Tsigos, C. (2009) Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol* **9**:787-793.

Lakoski, K.A., Carron, C.P., Cabot, C.L. and Saling, P.M. (1988) Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. *Biol Reprod* **38**:221-233.

Lampiao, F. (2009) Variation of semen parameters in healthy medical students due to exam stress. *Malawi Med J* **21**:166-167.

Landers, J.P. and Spelsberg, T.C. (1992) New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **2**:19-63.

LeBel, C.P., Ischiropoulos, H. and Bondy, S.C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* **5**:227-231.

Leblond, C.P. and Clermont, Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* **55**:548-573.

Lewis, B. and Aitken, R.J. (2001) A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. *J Androl* **22**:611-622.

Lewis, K.A., Gray, P.C., Blount, A.L., MacConell, L.A., Wiater, E., Bilezikjian, L.M., et al. (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* **404**:411-414.

Li, G. and He, H. (2009) Hormesis, allostatic buffering capacity and physiological mechanism of physical activity: a new theoretic framework. *Med Hypotheses* **72**:527-532.

Li, T.K. (1975) The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biol Reprod* **12**:641-646.

Lightman, S.L. and Conway-Campbell, B.L. (2010) The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat Rev Neurosci* **11**:710-718.

Lin, H., Decuypere, E. and Buyse, J. (2004) Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) 2. Short-term effect. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **139**:745-751.

Lin, H., Gao, J., Song, Z.G. and Jiao, H.C. (2009) Corticosterone administration induces oxidative injury in skeletal muscle of broiler chickens. *Poult Sci* **88**:1044-1051.

Lin, T., Wang, D., Hu, J. and Stocco, D.M. (1998) Upregulation of human chorionic gonadotrophin-induced steroidogenic acute regulatory protein by insulin-like growth factor-I in rat Leydig cells. *Endocrine* **8**:73-78.

Lucca, G., Comim, C.M., Valvassori, S.S., Pereira, J.G., Stertz, L., Gavioli, E.C., et al. (2008) Chronic mild stress paradigm reduces sweet food intake in rats without affecting brain derived neurotrophic factor protein levels. *Curr Neurovasc Res* **5**:207-213.

Lucca, G., Comim, C.M., Valvassori, S.S., Reus, G.Z., Vuolo, F., Petronilho, F., et al. (2009) Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int* **54**:358-362.

Luers, G.H., Thiele, S., Schad, A., Volkl, A., Yokota, S. and Seitz, J. (2006) Peroxisomes are present in murine spermatogonia and disappear during the course of spermatogenesis. *Histochem Cell Biol* **125**:693-703.

MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P. and Thompson, J.A. (1998) Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* **37**:1613-1622.

Maiorino, M., Wissing, J.B., Brigelius-Flohe, R., Calabrese, F., Roveri, A., Steinert, P., et al. (1998) Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. *FASEB J* **12**:1359-1370.

Makker, K., Agarwal, A. and Sharma, R. (2009) Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* **129**:357-367.

Manna, P.R., Huhtaniemi, I.T., Wang, X.J., Eubank, D.W. and Stocco, D.M. (2002) Mechanisms of epidermal growth factor signaling: regulation of steroid biosynthesis and the steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig tumor cells. *Biol Reprod* **67**:1393-1404.

Marchlewicz, M., Wiszniewska, B., Gonet, B., Baranowska-Bosiacka, I., Safranow, K., Kolasa, A., et al. (2007) Increased lipid peroxidation and ascorbic Acid utilization in testis and epididymis of rats chronically exposed to lead. *Biometals* **20**:13-19.

Maric, D., Kostic, T. and Kovacevic, R. (1996) Effects of acute and chronic immobilization stress on rat Leydig cell steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **58**:351-355.

Maser, R.L., Magenheimer, B.S. and Calvet, J.P. (1994) Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. *J Biol Chem* **269**:27066-27073.

Mates, J.M. (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **153**:83-104.

Matsumoto, K., Yobimoto, K., Huong, N.T., Abdel-Fattah, M., Van Hien, T. and Watanabe, H. (1999) Psychological stress-induced enhancement of brain lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and anxiogenic drugs in mice. *Brain Res* **839**:74-84.

McEwen, B.S. (1998) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* **840**:33-44.

McEwen, B.S. and Stellar, E. (1993) Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* **153**:2093-2101.

McEwen, B.S. and Wingfield, J.C. (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* **43**:2-15.

McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., de Kretser, D.M., Pratis, K., et al. (2002) Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* **57**:149-179.

Mihaljevic, B., Katusin-Razem, B. and Razem, D. (1996) The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radic Biol Med* **21**:53-63.

Mingoti, G.Z., Pereira, R.N. and Monteiro, C.M. (2003) Fertility of male adult rats submitted to forced swimming stress. *Braz J Med Biol Res* **36**:677-681.

Moore, H.D. and Bedford, J.M. (1979) Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anat Rec* **193**:293-311.

Mulder, H. (1993) Calcitonin-testosterone interrelationship. A classic feedback system? *Neth J Med* **42**:209-211.

Murata, M. and Kawanishi, S. (2000) Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J Biol Chem* **275**:2003-2008.

Myers, G.M., Lambert-Messerlian, G.M. and Sigman, M. (2009) Inhibin B reference data for fertile and infertile men in Northeast America. *Fertil Steril* **92**:1920-1923.

Nadeem, A., Masood, A., Masood, N., Gilani, R.A. and Shah, Z.A. (2006) Immobilization stress causes extra-cellular oxidant-antioxidant imbalance in rats: restoration by L-NAME and vitamin E. *Eur Neuropsychopharmacol* **16**:260-267.

Nayanatara, A.K., Nagaraja, H.S. and Anupama, B.K. (2005) The effect of repeated swimming stress on organ weights and lipid peroxidation in rats. *Thai J Pharm Sci* **18**:3-9.

Neill, J.D., Patton, J.M., Dailey, R.A., Tsou, R.C. and Tindall, G.T. (1977) Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in pituitary stalk blood of rhesus monkeys: relationship to level of LH release. *Endocrinology* **101**:430-434.

Nenicu, A., Luers, G.H., Kovacs, W., David, M., Zimmer, A., Bergmann, M., et al. (2007) Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biol Reprod* **77**:1060-1072.

Nirupama, M., Devaki, M., Nirupama, R. and Yajurvedi, H.N. (2013) Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *J Physiol Biochem* **69**:59-68.

Ohta, H., Aizawa, S. and Nishimune, Y. (2003) Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. *Biol Reprod* **68**:2249-2254.

Ong, C.N., Shen, H.M. and Chia, S.E. (2002) Biomarkers for male reproductive health hazards: are they available? *Toxicol Lett* **134**:17-30.

Orgebin-Crist, M.C. (1969) Studies on the function of the epididymis. *Biol Reprod* **1**:Suppl 1:155-175.

Ortlip, S.A., Li, S.A. and Li, J.J. (1981) Characterization of specific glucocorticoid receptor in the Syrian hamster testis. *Endocrinology* **109**:1331-1338.

Oteiza, P.I., Adonaylo, V.N. and Keen, C.L. (1999) Cadmium-induced testes oxidative damage in rats can be influenced by dietary zinc intake. *Toxicology* **137**:13-22.

Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I.J. and Goldstein, D.S. (1998) Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* **275**:R1247-1255.

Paglia, D.E. and Valentine, W.N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* **70**:158-169.

Papandreou, M.A., Tsachaki, M., Efthimiopoulos, S., Cordopatis, P., Lamari, F.N. and Margarity, M. (2011) Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. *Behav Brain Res* **219**:197-204.

Parvinen, M., Soder, O., Mali, P., Froysa, B. and Ritzen, E.M. (1991) In vitro stimulation of stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous tubule segments by interleukin-1 alpha. *Endocrinology* **129**:1614-1620.

Paul, M.K., Bisht, B., Darmawan, D.O., Chiou, R., Ha, V.L., Wallace, W.D., et al. (2014) Dynamic changes in intracellular ROS levels regulate airway basal stem cell homeostasis through Nrf2-dependent Notch signaling. *Cell Stem Cell* **15**:199-214.

Payne, A.H. and Hales, D.B. (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* **25**:947-970.

Peltola, V., Huhtaniemi, I. and Ahotupa, M. (1992) Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J Androl* **13**:450-455.

Peltola, V., Huhtaniemi, I., Metsa-Ketela, T. and Ahotupa, M. (1996) Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology* **137**:105-112.

Peltola, V., Mantyla, E., Huhtaniemi, I. and Ahotupa, M. (1994) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the rat testis after cigarette smoke inhalation or administration of polychlorinated biphenyls or polychlorinated naphthalenes. *J Androl* **15**:353-361.

Perry, A.C., Jones, R. and Hall, L. (1993) Isolation and characterization of a rat cDNA clone encoding a secreted superoxide dismutase reveals the epididymis to be a major site of its expression. *Biochem J* **293 ( Pt 1)**:21-25.

Potemina, T.E. (2008) Impairment of spermatogenesis in male rats during stress. *Bull Exp Biol Med* **145**:700-702.

Priya, P.H. and Reddy, P.S. (2012) Effect of restraint stress on lead-induced male reproductive toxicity in rats. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* **317**:455-465.

Pryor, W.A., Houk, K.N., Foote, C.S., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L., et al. (2006) Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**:R491-511.

Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Kostic, V., Carlson, E., Epstein, C.J. and Cadet, J.L. (1992) Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in copper/zinc-superoxide dismutase transgenic mice. *J Neurochem* **58**:1760-1767.

Psarra, A.M., Solakidi, S., Trougakos, I.P., Margaritis, L.H., Spyrou, G. and Sekeris, C.E. (2005) Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:2544-2558.

Rejraji, H., Vernet, P. and Drevet, J.R. (2002) GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol Reprod Dev* **63**:96-103.

Retana-Marquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vazquez-Palacios, G., Dominguez-Salazar, E., Martinez-Garcia, R. and Velazquez-Moctezuma, J. (2003a) Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* **28**:207-227.

Retana-Marquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vazquez-Palacios, G., Martinez-Garcia, R. and Velazquez-Moctezuma, J. (2003b) Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Horm Behav* **44**:327-337.

Retana-Marquez, S., Bonilla-Jaime, H. and Velazquez-Moctezuma, J. (1998) Estrés, péptidos opioides y conducta sexual masculina. *Biol Reprod UAM-I* 535-561.

Retana-Marquez, S., Salazar, E.D. and Velazquez-Moctezuma, J. (1996) Effect of acute and chronic stress on masculine sexual behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology* **21**:39-50.

Rivier, C. and Rivest, S. (1991) Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod* **45**:523-532.

Robaire, B., Hinton, B.T., Orgebin-Crist, M.C. (2006) The epididymis. In: *Physiology of reproduction*. Eds. Knobil, E. and Neil, J.D. Academic Press. St. Louis, USA, pp. 1071-1148.

Rodriguez, C.M., Kirby, J.L. and Hinton, B.T. (2002) The development of the epididymis. In: *The Epididymis - From Molecules to Clinical Practice*. Eds. Robaire, B. and Hinton, B.T. Kluwer Academic/Plenum Publisher. New York, pp. 251-267.

Romero, L.M. (2004) Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol Evol* **19**:249-255.

Roveri, A., Casasco, A., Maiorino, M., Dalan, P., Calligaro, A. and Ursini, F. (1992) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J Biol Chem* **267**:6142-6146.

Rybkin, I.I., Zhou, Y., Volaufova, J., Smagin, G.N., Ryan, D.H. and Harris, R.B. (1997) Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. *Am J Physiol* **273**:R1612-1622.

Sahin, E. and Gumuslu, S. (2004) Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav Brain Res* **155**:241-248.

Sahin, E. and Gumuslu, S. (2007a) Immobilization stress in rat tissues: alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **144**:342-347.

Sahin, E. and Gumuslu, S. (2007b) Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold). *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**:425-431.

Sahin, M., Sagdic, G., Elmas, O., Akpinar, D., Derin, N., Aslan, M., et al. (2006) Effect of chronic restraint stress and alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat peripheral organs. *Pharmacol Res* **54**:247-252.

Saki, G., Rahim, F. and Alizadeh, K. (2009) Effect of forced swimming stress on count, motility and fertilization capacity of the sperm in adult rats. *J Hum Reprod Sci* **2**:72-75.

Saleh, R.A. and Agarwal, A. (2002) Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* **23**:737-752.

Samanta, L. and Chainy, G.B. (1997) Comparison of hexachlorocyclohexane-induced oxidative stress in the testis of immature and adult rats. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **118**:319-327.

- Samson, J., Sheeladevi, R. and Ravindran, R. (2007) Oxidative stress in brain and antioxidant activity of *Ocimum sanctum* in noise exposure. *Neurotoxicology* **28**:679-685.
- Sanderson, J.T. (2006) The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol Sci* **94**:3-21.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M. and Munck, A.U. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* **21**:55-89.
- Sarumathi, A. and Saravanan, N. (2012) Antioxidant status in kidney and liver of rats during immobilization stress and treated with *Centella asiatica*. *Int J Res Biol Sci* **2**:165-169.
- Sattler, W., Maiorino, M. and Stocker, R. (1994) Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51). *Arch Biochem Biophys* **309**:214-221.
- Scheller, K., Seibel, P. and Sekeris, C.E. (2003) Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Int Rev Cytol* **222**:1-61.
- Schmid, W., Cole, T.J., Blendy, J.A. and Schutz, G. (1995) Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**:33-35.
- Schneider, M., Forster, H., Boersma, A., Seiler, A., Wehnes, H., Sinowatz, F., et al. (2009) Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J* **23**:3233-3242.
- Schwaab, V., Baud, E., Ghyselinck, N., Mattei, M.G., Dufaure, J.P. and Drevet, J.R. (1995) Cloning of the mouse gene encoding plasma glutathione peroxidase: organization, sequence and chromosomal localization. *Gene* **167**:25-31.
- Schwaab, V., Lareyre, J.J., Vernet, P., Pons, E., Faure, J., Dufaure, J.P., et al. (1998) Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* **53**:157-162.
- Selye, H. (1952) The general adaptation syndrome and the adaptation diseases. *Wien Klin Wochenschr* **64**:781-783.
- Selye, H. (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* **138**:32-36.
- Setchell, B.P., Sanchez-Partida, L.G. and Chairussyuhur, A. (1993) Epididymal constituents and related substances in the storage of spermatozoa: a review. *Reprod Fertil Dev* **5**:601-612.
- Sheiner, E.K., Sheiner, E., Hammel, R.D., Potashnik, G. and Carel, R. (2003) Effect of occupational exposures on male fertility: literature review. *Ind Health* **41**:55-62.
- Silva, E.J., Queiroz, D.B., Honda, L. and Avellar, M.C. (2010) Glucocorticoid receptor in the rat epididymis: expression, cellular distribution and regulation by steroid hormones. *Mol Cell Endocrinol* **325**:64-77.
- Silverman, A.J., Krey, L.C. and Zimmerman, E.A. (1979) A comparative study of the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuronal networks in mammals. *Biol Reprod* **20**:98-110.
- Singh, J., O'Neill, C. and Handelsman, D.J. (1995) Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* **136**:5311-5321.

- Sinha, K., Das, J., Pal, P.B. and Sil, P.C. (2013) Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol* **87**:1157-1180.
- Skinner, M.K., McLachlan, R.I. and Bremner, W.J. (1989) Stimulation of Sertoli cell inhibin secretion by the testicular paracrine factor PModS. *Mol Cell Endocrinol* **66**:239-249.
- Slater, T.F. (1984) Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* **222**:1-15.
- Smith, M.S. (1985) Release of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone from pituitaries of lactating rats by gonadotropin-releasing hormone and high potassium concentration. *Endocrinology* **116**:1826-1834.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.
- Sommer, R.J., Ippolito, D.L. and Peterson, R.E. (1996) In utero and lactational exposure of the male Holtzman rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: decreased epididymal and ejaculated sperm numbers without alterations in sperm transit rate. *Toxicol Appl Pharmacol* **140**:146-153.
- Srivastava, R.K., Taylor, M.F. and Mann, D.R. (1993) Effect of immobilization stress on plasma luteinizing hormone, testosterone, and corticosterone concentrations and on 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the testes of adult rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **204**:231-235.
- Stellato, C. (2004) Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc* **1**:255-263.
- Stier, K.S., Almasi, B., Gasparini, J., Piault, R., Roulin, A. and Jenni, L. (2009) Effects of corticosterone on innate and humoral immune functions and oxidative stress in barn owl nestlings. *J Exp Biol* **212**:2085-2091.
- Stocco, D.M., Wang, X., Jo, Y. and Manna, P.R. (2005) Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol* **19**:2647-2659.
- Stratakis, C.A. and Chrousos, G.P. (1995) Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann N Y Acad Sci* **771**:1-18.
- Suarez, M., Fiol de Cuneo, M., Vincenti, L. and Ruiz, R.D. (1996) Changes in corticosterone levels and sperm functional activity by chronic stress in rats. *Arch Physiol Biochem* **104**:351-356.
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J. and Frenette, G. (2005) Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis* **35**:1-10.
- Swami, C.G., Ramanathan, J. and Charan Jeganath, C. (2007) Noise exposure effect on testicular histology, morphology and on male steroidogenic hormone. *Malays J Med Sci* **14**:28-35.
- Takahashi, O. and Oishi, S. (2001) Testicular toxicity of dietary 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) in F344 rats. *Arch Toxicol* **75**:42-51.
- Thannickal, V.J. and Fanburg, B.L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**:L1005-1028.

Thomas, J.P., Maiorino, M., Ursini, F. and Girotti, A.W. (1990) Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem* **265**:454-461.

Tilbrook, A.J., Turner, A.I. and Clarke, I.J. (2000) Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Rev Reprod* **5**:105-113.

Toshimori, K. (2003) Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech* **61**:1-6.

Toshimori, K. (1998) Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Res* **293**:177-187.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4354.

Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G. and Panfili, E. (1998) Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* **59**:753-758.

Tsigos, C. and Chrousos, G.P. (1994) Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* **23**:451-466.

Tsopanakis, C. and Tesserommatis, C. (1991) Cold swimming stress: effects on serum lipids, lipoproteins and LCAT activity in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* **38**:813-816.

Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., et al. (1999) Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* **285**:1393-1396.

Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L. and Gregolin, C. (1982) Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta* **710**:197-211.

Uysal, N., Acikgoz, O., Gonenc, S., Kayatekin, B.M., Kiray, M., Sonmez, A., et al. (2005) Effects of acute footshock stress on antioxidant enzyme activities in the adolescent rat brain. *Physiol Res* **54**:437-442.

Vale, W., Spiess, J., Rivier, C. and Rivier, J. (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* **213**:1394-1397.

Valko, M., Morris, H. and Cronin, M.T. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**:1161-1208.

Van de Kar, L.D. and Blair, M.L. (1999) Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* **20**:1-48.

Veldhuis, J.D. (1997) Male hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Infertility in the Male* 47-48.

Verma, R.J. and Nair, A. (2001) Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. *Asian J Androl* **3**:217-221.

Vernet, P., Faure, J., Dufaure, J.P. and Drevet, J.R. (1997) Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol Reprod Dev* **47**:87-98.

Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C. and Aitken, R.J. (2001) Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* **65**:1102-1113.

Veskoukis, A.S., Nikolaidis, M.G., Kyparos, A. and Kouretas, D. (2009) Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic Biol Med* **47**:1371-1374.

Vreeburg, J.T. (1975) Distribution of testosterone and 5alpha-dihydrotestosterone in rat epididymis and their concentrations in efferent duct fluid. *J Endocrinol* **67**:203-210.

Wang, D., Muller, N., McPherson, K.G. and Reichardt, H.M. (2006) Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol* **176**:1695-1702.

Wang, X., Sharma, R.K., Sikka, S.C., Thomas, A.J., Jr., Falcone, T. and Agarwal, A. (2003) Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* **80**:531-535.

Wang, X.J., Dyson, M.T., Mondillo, C., Patrignani, Z., Pignataro, O. and Stocco, D.M. (2002) Interaction between arachidonic acid and cAMP signaling pathways enhances steroidogenesis and StAR gene expression in MA-10 Leydig tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* **188**:55-63.

Weiss, J.M. (1972a) Influence of psychological variables on stress-induced pathology. *Ciba Found Symp* **8**:253-265.

Weiss, J.M. (1972b) Psychological factors in stress and disease. *Sci Am* **226**:104-113.

Wellejus, A., Poulsen, H.E. and Loft, S. (2000) Iron-induced oxidative DNA damage in rat sperm cells in vivo and in vitro. *Free Radic Res* **32**:75-83.

Wilson, J.D. (1975) Dihydrotestosterone formation in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from normal subjects and patients with familial incomplete male pseudohermaphroditism, Type 2. *J Biol Chem* **250**:3498-3504.

Wingfield, J.C., Lynn, S. and Soma, K.K. (2001) Avoiding the 'costs' of testosterone: ecological bases of hormone-behavior interactions. *Brain Behav Evol* **57**:239-251.

Winterbourn, C.C. (2003) Radical scavenging by thiols: biological significance and implications for redox signaling and antioxidant defense. In: *Cellular Implications of Redox Signaling*. Eds. Gitler, C. and Danon, A. Imperial College Press. London, pp. 175-190.

Woodward, C.J. and Emery, P.W. (1987) Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **419**:280-284.

Wu, D. and Cederbaum, A.I. (2003) Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* **27**:277-284.

Yanagimachi, R. (1994) Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil, E. and Neil, J.D. Raven Press. New York. Vol. 1, pp. 189-317.

Yavasoglu, A., Karaaslan, M.A., Uyanikgil, Y., Sayim, F., Ates, U. and Yavasoglu, N.U. (2008) Toxic effects of anatoxin-a on testes and sperm counts of male mice. *Exp Toxicol Pathol* **60**:391-396.

Zafir, A. and Banu, N. (2009) Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress* **12**:167-177.

Zardooz, H., Zahedi Asl, S., Gharib Naseri, M.K. and Hedayati, M. (2006a) Effect of chronic restraint stress on carbohydrate metabolism in rat. *Physiol Behav* **89**:373-378.

Zardooz, H., Zahedi Asl, S. and Naseri, M.G. (2006b) Effect of chronic psychological stress on insulin release from rat isolated pancreatic islets. *Life Sci* **79**:57-62.

Zhang, A.Y., Yi, F., Jin, S., Xia, M., Chen, Q.Z., Gulbins, E., et al. (2007) Acid sphingomyelinase and its redox amplification in formation of lipid raft redox signaling platforms in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* **9**:817-828.

Zhang, A.Y., Yi, F., Zhang, G., Gulbins, E. and Li, P.L. (2006) Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells. *Hypertension* **47**:74-80.

Zhou, Q., Nie, R., Prins, G.S., Saunders, P.T., Katzenellenbogen, B.S. and Hess, R.A. (2002) Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* **23**:870-881.

Zhu, L.J., Hardy, M.P., Inigo, I.V., Huhtaniemi, I., Bardin, C.W. and Moo-Young, A.J. (2000) Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod* **63**:368-376.

Zini, A. and Schlegel, P.N. (1996) Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *J Androl* **17**:473-480.

Zini, A. and Schlegel, P.N. (1997) Identification and characterization of antioxidant enzyme mRNAs in the rat epididymis. *Int J Androl* **20**:86-91.