



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

MAESTRIA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO EN LA
ESPERMATOGÉNESIS DE LA RATA MACHO”**

T E S I S

Para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental presenta:

B. E. Juárez Rojas Adriana Lizbeth

Directora:

Dra. María del Socorro I. Retana Márquez

Asesoras:

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Dra. Irma Leticia Jiménez Morales

México, D.F. 28 de Junio de 2011

CÓMITE TUTORAL:

Directora:

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez

Profesora Titular.

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa.

Asesoras:

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Investigadora.

Laboratorio de Biología de la Reproducción

Instituto Nacional de Pediatría

Dra. Irma Jiménez Morales

Profesora Titular

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa.

Agradecimientos:

Agradezco:

Al posgrado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. El posgrado se encuentra dentro del Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro 309-0 y en el Padrón de Programas del FIPO-CONACyT/PFPN-2002-35-32.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca número: 224663 otorgada para la realización de este trabajo.

Al Laboratorio de Neuropsicoendocrinología del Departamento de Biología de la Reproducción en la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

Al Laboratorio de Biología de la Reproducción en la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría.

Dedicatorias

Dedico la presente tesis a todos los que de alguna manera participaron en su realización y conclusión.

A la Dra. María del Socorro Retana Márquez por su enorme paciencia, invaluable ayuda y consejo en la dirección del trabajo experimental y la escritura de la tesis.

A la Dra. Irma Jiménez Morales por su apoyo y ayuda en la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor por su apoyo en el trabajo experimental y en aspectos teóricos.

A mi familia:

A mis padres Martha y Salvador a quienes agradezco por haberme dado la vida y por su apoyo para poder lograr mis sueños.

A mí Abuelita Carmen por su enorme apoyo incondicional, por sus consejos y por ser la persona que me enseñó los valores más importantes de la vida: el amor, el respeto, la perseverancia y la paciencia.

A mis hijos Yolita y Tadeo por su apoyo, paciencia y motivación.

A mi esposo David que siempre me escucha y me motiva para que siga adelante, por su amor y su apoyo incondicional.

A mi hermana Yuri a quien agradezco que me apoyara hasta el último momento.

A mis suegros Yolanda y David (*in memoriam*) que me brindaron su apoyo en todo momento.

A mi cuñada Vivis que la quiero mucho y a mi sobrina Fernanda.

Índice

	Abreviaturas -----	ix
	Resumen -----	xii
1.1	Fisiología del estrés -----	1
1.1.2	Estrés crónico -----	2
1.1.3	El sistema del estrés -----	4
1.2	El estrés y la función reproductiva masculina -----	8
1.2.1	Espermatogénesis -----	10
1.2.2	Organización de la espermatogénesis -----	12
1.2.3	Regulación neuroendocrina de la función testicular -----	17
1.2.4	Biosíntesis de testosterona -----	20
2.0	Antecedentes -----	22
2.1	Efecto del estrés en el epitelio seminífero -----	22
2.2	Efecto del estrés en la secreción de testosterona -----	26
2.3	Efecto de la actividad copulatoria en la concentración de testosterona -----	30
3.0	Justificación -----	31
4.0	Hipótesis -----	32
5.0	Objetivo general -- -----	32
6.0	Objetivos particulares -----	32
7.0	Diseño experimental -----	33
7.1	Animales de laboratorio -----	33
7.2	Aplicación de estrés crónico por inmersión en agua fría ----	33
7.3	Cópula -----	34
7.4	Dissección de los testículos -----	34

7.5	Inclusión en EPON -----	35
7.6	Análisis histopatológico -----	36
7.7	Evaluación del índice de Johnsen -----	37
7.8	Determinación de testosterona -----	39
7.9	Cuantificación de testosterona por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) -----	40
8.0	Análisis estadístico -----	40
9.0	Resultados -----	41
9.1	Efecto del estrés crónico en la concentración sérica de testosterona -----	41
9.2	Análisis histológico -----	42
9.3	Índice histopatológico -----	47
9.4	Índice de Johnsen -----	48
10.0	Discusión -----	50
11.0	Conclusiones -----	63
12.0	Bibliografía -----	64

ABREVIATURAS

II	-----	Espermatocitos secundarios
17-OH	-----	17-hidroxi-pregnenolona
A	-----	Espermatogonia tipo A
ABP	-----	Proteína unidora de andrógenos
ACTH	-----	Hormona adrenocorticotrópica
AMPc	-----	Adenosina 3', 5'-monofosfato
ARTISt	-----	Ácido araquidónico relacionado con la tioesterasa involucrada con la esteroidogénesis
AV	-----	Arginina-vasopresina
B	-----	Espermatogonia tipo B
CRH	-----	Hormona liberadora de corticotropina
ctr c/cop	----	control con cópula
ctr s/cop	---	control sin cópula
DC	----	Descamación celular
DHEA	-----	Dehidroepiandrosterona
Di	-----	Diacinesis
DNA	-----	Ácido desoxirribonucleico
E	-----	Epinefrina
Ee	-----	Espermátidas alargadas
Ep	-----	Espermatocitos primarios
Er	-----	Espermátidas redondas
Es	-----	Espermatogonias
FSH	-----	Hormona foliculoestimulante
GnRH	-----	Hormona liberadora de gonadotropinas

HHA	-----	Eje hipotálamo – hipófisis – adrenal
HHG	-----	Eje hipotálamo – hipófisis – gonadal
HPLC	-----	Cromatografía líquida de alta resolución
HRE	-----	Elemento de respuesta hormonal
IH	-----	Índice histopatológico
IJ	-----	Índice de Johnsen
L	-----	Espermatocito primario en leptoteno
LC	-----	locus coeruleus
LH	-----	Hormona luteinizante
LH-R	-----	Receptor de LH
In	-----	Espermatogonia intermedia
NE	-----	Norepinefrina
P	-----	Espermatocito primario en paquiteno
P450 _{scc}	-----	side-chain cleavage-enzyme
PAS	-----	Ácido per-iódico, reactivo de Schiff
PKA	-----	Proteína cinasa A
PI	-----	Espermatocito primario en preleptoteno
POMC	-----	Pro-opiomelanocortina
PVN	-----	Núcleo paraventricular
RNA	-----	Ácido ribonucleico
S	-----	Células de Sertoli
SAM	-----	Sistema simpático-adrenomedular
SNC	-----	Sistema Nervioso Central
SNS	-----	Sistema Nervioso Simpático
StAR	-----	Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

str c/cop ---- estrés con cópula
str s/cop --- estrés sin cópula
UV ---- Ultravioleta
Z ---- Espermatozoides primarios en zigoteno

RESUMEN:

El estrés es la respuesta del organismo a una variedad de estímulos adversos, extrínsecos e intrínsecos. Estos pueden provocar la supresión de la función del eje reproductivo, posiblemente a través de la activación del eje adrenal. El estrés crónico (EC) por inmersión en agua fría provoca alteraciones en el epitelio seminífero en los testículos de ratas machos sexualmente expertos. Estas alteraciones parecen tener relación con la disminución de testosterona inducido por efecto del estrés. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el EC afecta el epitelio seminífero en ratas macho sexualmente inexpertas, sometidas a cópula después de ser expuestas a estrés crónico por inmersión en agua fría.

Se utilizaron 24 ratas macho, sexualmente inexpertos, de la cepa Wistar con peso de 250 a 300 g. Que fueron asignados a uno de los 4 grupos siguientes: a) control sin cópula (n = 6); b) control con cópula (n = 6); c) estrés sin cópula (n=6) y d) estrés con cópula (n = 6). Los grupos control fueron mantenidos en sus cajas sin manipulación. Los animales fueron estresados por inmersión en agua fría durante 50 días consecutivos. Los machos de los grupos con exposición a cópula se aparearon con hembras sexualmente receptivas los días 1, 10, 20, 30, 40 y 50 de estrés. Al final de los 50 días de estrés se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca para la evaluación de la testosterona y se extrajeron los testículos, éstos se perfundieron y se procesaron para su análisis histológico. Se obtuvieron cortes de testículo de 1 µm de grosor que fueron teñidos con azul de toluidina al 0.5% para su posterior evaluación. El análisis histológico consistió en evaluar el desarrollo y la

diferenciación de las células germinales mediante el índice de Johnsen, así como el grado de daño testicular mediante el índice histopatológico.

Los resultados mostraron que los machos sometidos a estrés crónico presentaron un alto índice de daño testicular. Los datos mostraron que los machos del grupo de estrés que copularon se presentaron alteraciones como: plegamiento de la lámina basal, descamación de células del epitelio seminífero y desorganización celular. En el grupo de estrés sin cópula, se encontraron alteraciones como: degeneración celular, vacuolización epitelial, descamación celular, así como túbulos que mostraban la formación de células con picnosis, la cual se sabe es una característica de células en proceso de muerte celular. Por otra parte, el desarrollo y la diferenciación celular fue menor en los machos estresados, siendo el grupo sin acceso a cópula el que presentó el menor grado de maduración celular. El análisis histopatológico evidenció que estos machos tuvieron el mayor grado de daño testicular. La concentración sérica de testosterona fue significativamente menor en este grupo de machos estresados y sin acceso a cópula (0.5-0.7 ng/ml), en comparación con los machos control (5.0-7.0 ng/ml) y con los machos estresados que si copularon (1.5-3.4 ng/ml). Estos resultados muestran que el estrés crónico causa alteraciones importantes en la maduración de las células germinales, así como daño testicular. La actividad sexual parece atenuar los efectos del estrés en la disminución de testosterona, así como alteraciones en las células del epitelio seminífero.

1.1. FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS

La existencia de la vida se mantiene gracias a un equilibrio dinámico del medio interno denominado homeostasis, la cual es constantemente alterada por el estrés. El estrés es la respuesta del organismo frente a una situación de amenaza; conocida como estresor, el cual puede alterar la homeostasis del cuerpo. Los estresores pueden ser definidos como estímulos adversos extrínsecos o intrínsecos que interrumpen o perturban la homeostasis del cuerpo (Johnson, et al., 1992).

El término estrés ha sido utilizado para incluir una gran variedad de respuestas que son provocadas por los estresores. Los organismos responden a estos estímulos mediante procesos fisiológicos y conductuales tendientes a neutralizar el efecto de los estresores y de restablecer el equilibrio homeostático del organismo. Este proceso se conoce como respuesta adaptativa del estrés, la cual involucra una redirección de la conducta y la energía. (Selye, 1946).

La respuesta adaptativa del estrés depende de la calidad del estímulo, que puede ser físico o emocional; de la intensidad y la duración: agudo o crónico, así como de la constitución y estado del organismo (De Wied, 1980). Los estímulos físicos incluyen el desequilibrio del medio ambiente interno del organismo (anoxia o hipoglucemia); pero también pueden ser condiciones extremas, como el frío o el calor; pero además existen estresores mixtos como son los estímulos nocivos, el ejercicio extenuante y las enfermedades. Los estresores psicológicos son estímulos que afectan las emociones, provocando: miedo, ansiedad o frustración y son los activadores más potentes del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) (Levine et al., 1972).

En 1936 Hans Selye, científico pionero en el estudio del efecto del estrés en los organismos, propuso el “Síndrome General de Adaptación”, el cual involucra al Sistema Nervioso Simpático (SNS) y al eje HHA, estos sistemas son importantes reguladores de las funciones homeostáticas de los animales (Tsigos y Chrousos, 2002). Selye definió cuatro etapas en la respuesta del estrés: la primera etapa es una reacción de alarma, caracterizada por una descarga simpático-adrenomedular (SAM) inmediata. La segunda es un estado de resistencia, el cual se caracteriza por la activación del eje HHA. En la tercera etapa se presenta hipertrofia adrenal, ulceraciones gastrointestinales y disminución de las funciones linfoides y tímicas. Si el organismo no se adapta, sobreviene una cuarta etapa de agotamiento, enfermedad e incluso la muerte (Johnson, et al., 1992).

1.1.2 ESTRÉS CRÓNICO

El estrés en función de su intensidad y duración puede ser clasificado en: agudo y crónico. El estrés se considera agudo cuando el tiempo de exposición a un estímulo estresante es de unos cuantos minutos a unas horas; mientras que el estrés crónico implica la exposición prolongada al mismo, en un tiempo mayor de seis horas y se extiende hasta varios días (Justel, et al., 2009; Retana-Márquez, et al., 1998). La exposición a este tipo de estrés puede tener consecuencias fisiológicas y conductuales que pueden afectar el bienestar del individuo, incluyendo el envejecimiento acelerado, la inmunosupresión y retardo en el crecimiento (Johnson, et al., 1992).

En la actualidad existen modelos experimentales que han sido utilizados para estudiar el efecto del estrés crónico en los organismos, como son: la inmovilización (Collu, et al., 1984), el ejercicio prolongado (Watanabe, et al.,

1991), la iluminación constante, el nado forzado (en agua fría o caliente), el ruido, la falta de alimento, el hacinamiento y el estrés social (Monder, et al., 1994) aplicados en ratas. Este tipo de estresores provocan la disminución en el contenido hipotalámico de la hormona liberadora de corticotropinas (CRH), el aumento en las concentraciones plasmáticas de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) y de los glucocorticoides.

Se ha visto que durante el tiempo de exposición al estrés, hay aumento en la atención y el cerebro se enfoca en la amenaza percibida. En ese momento la frecuencia cardíaca y la respiración están aceleradas, el catabolismo se encuentra incrementado y el flujo sanguíneo se redirige a proporcionar la más alta perfusión hacia el cerebro, corazón y músculos (Chrousos, 1992). Esta respuesta es normalmente transitoria y tiene por objeto mantener la supervivencia de los individuos. Pero cuando esta respuesta es estimulada de manera crónica, pueden presentarse consecuencias potencialmente perjudiciales para los individuos y se afectan funciones fisiológicas esenciales, como el metabolismo, el crecimiento, la función inmune, la personalidad, así como la conducta y la función reproductiva (Kyrou y Tsigos, 2009).

La manera en que el estrés crónico puede inhibir las funciones reproductivas masculinas en los mamíferos, incluyendo a los humanos, es por la depresión del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) (Almeida, et al., 2000). Esta inhibición se debe a que existen complejas interacciones entre el cerebro, la hipófisis y los órganos blanco que regulan el sistema reproductor, tanto en hembras como en machos, ambos son sensibles a los desajustes provocados por agentes o estímulos nocivos que activan el eje HHA (Armstrong, 1986).

1. 1. 3 EL SISTEMA DEL ESTRÉS

El sistema del estrés está constituido por estructuras neuroendocrinas y periféricas que tienen como objetivo producir cambios fisiológicos, bioquímicos y conductuales encargados de mantener el equilibrio homeostático del organismo (Chrousos, et al., 1988). Estas estructuras forman parte del eje HHA y del SNS, los cuales se encargan de regular la respuesta del estrés. La regulación central de esta respuesta involucra principalmente a componentes del sistema límbico, hipotálamo y del tallo cerebral. De entre estos componentes destaca la función del hipotálamo, esta estructura del Sistema Nervioso Central (SNC) es la encargada de integrar toda la información concerniente al estímulo estresante, es capaz de modular una enorme variedad de procesos fisiológicos y metabólicos vía la activación de dos sistemas: el SNS y el eje HHA (Justel, et al., 2009). En la figura 1 se muestran los componentes del SNS y del eje HHA que inician y mantienen la respuesta adaptativa de estrés, estos se encuentran localizados en el hipotálamo y el tallo cerebral e incluyen a las neuronas parvocelulares que secretan CRH, a las neuronas arginina-vasopresina (AV) del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, así como al sistema locus coeruleus (LC)-norepinefrina (NE) del SNS (Chrousos, 1992).

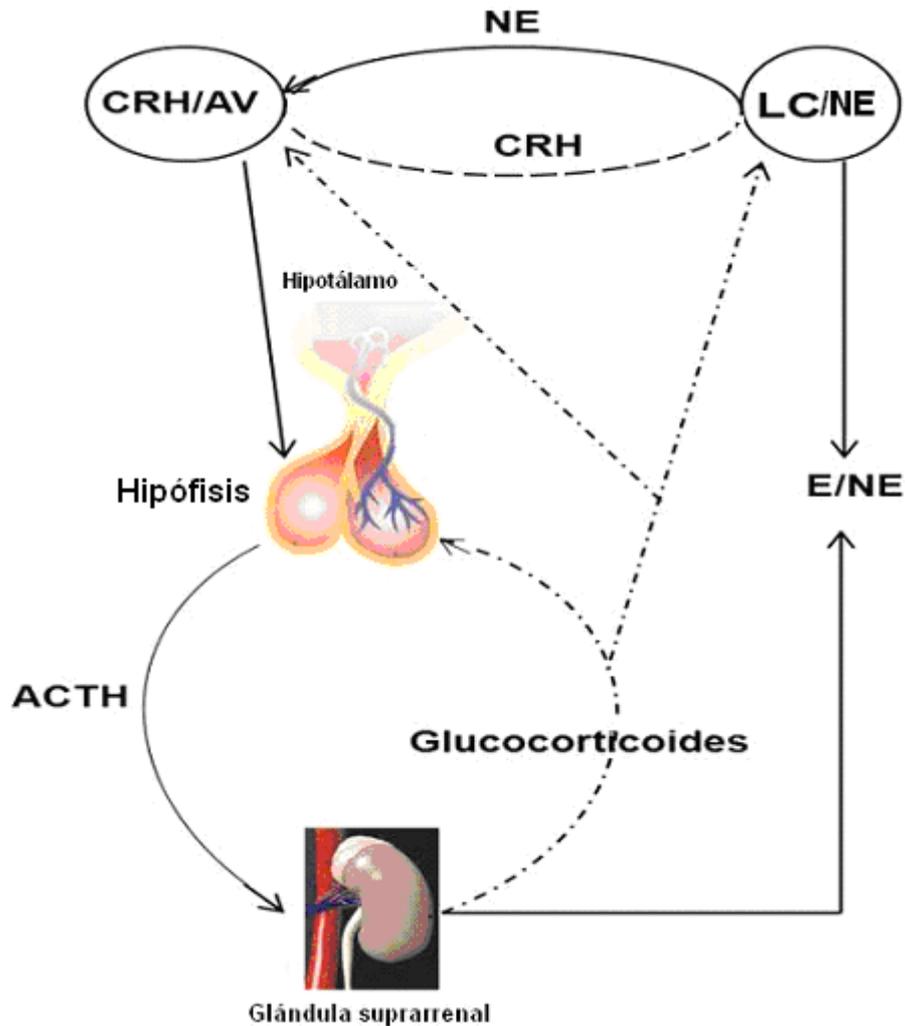
El SNS constituye un componente efector importante del sistema del estrés este proporciona un mecanismo que permite una rápida regulación de las funciones vitales del organismo, tales como la función cardiovascular, respiratoria, gastrointestinal, renal y endocrina (Kvetnansky, et al., 2009; Gilbey y Spyer, 1993). Además ofrece una contribución humoral durante la respuesta del estrés, proporcionando la mayor parte de la epinefrina (E) y NE de la

circulación desde la médula adrenal (Kyrou y Tsigos, 2009). Al producirse una situación de estrés el sistema LC-NE del SNS se activa y las glándulas adrenales secretan NE y E (figura 1) (Justel, et al., 2009). La activación crónica de este sistema, estimula la liberación de NE por todo el cerebro a través de una extensa red de neuronas que da por resultado un aumento en la excitación, la vigilancia y la ansiedad (Johnson, et al., 1992). Además ambas catecolaminas estimulan la secreción de la CRH del hipotálamo.

El eje HHA forma parte del sistema neuroendocrino que controla las reacciones del estrés y regula varios procesos del organismo tales como; la digestión, el sistema inmune, las emociones, la conducta sexual y el metabolismo energético. Tiene un papel importante en la capacidad que poseen los organismos para hacer frente a una situación de amenaza. De manera que, cuando los organismos están expuestos a una situación de estrés se activan rápidamente las neuronas parvocelulares del PVN del hipotálamo, estas neuronas se encuentran en el ápice del eje HHA, e incrementan su actividad, lo que provoca un aumento en la producción y secreción de CRH y de péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC), que son liberados hacia la circulación del sistema portal hipofisiario (Wamsteeker y Bains, 2010). En la hipófisis, los corticotropos responden liberando ACTH, esta hormona es liberada desde el lóbulo anterior de la hipófisis hacia la circulación sistémica y es transportada hasta la glándula adrenal (figura 1), donde estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides desde la corteza adrenal (Tsigos y Chrousos, 2002).

Los glucocorticoides son los efectores finales del eje HHA y participan en el control de la homeostasis del organismo y en la respuesta del estrés (de

Kloet, 1991). Estos tienen efectos a largo plazo en las conductas adaptativas del organismo, incluyendo la función cardiovascular, muscular, en el metabolismo, el sistema inmune, la función reproductiva y el comportamiento (Johnson. et al., 1992).



Esquema adaptado de Johnson, et al., 1992

Figura 1. El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y el sistema nervioso simpático (SNS) son los reguladores biológicos de la respuesta del estrés. Estos sistemas actúan a través de los glucocorticoides, secretados por la corteza adrenal y por las catecolaminas: epinefrina y norepinefrina (E, NE). Los glucocorticoides inhiben ambos sistemas durante la respuesta del estrés, a fin de prevenir una activación excesiva o prolongada. La regulación central de esta respuesta involucra a componentes del sistema límbico, hipotálamo y tronco cerebral. (Las líneas sólidas representan eventos estimulantes, las líneas punteadas representan eventos inhibitorios de los glucocorticoides).

Además, los glucocorticoides junto con la E y NE, inhiben la captación de glucosa, el almacenamiento de los ácidos grasos, la síntesis de proteínas y estimulan la liberación de sustratos energéticos, incluyendo glucosa, aminoácidos y ácidos grasos libres en el músculo, el tejido graso y en el hígado (Munck, et al., 1984). Los cambios producidos en la disponibilidad de energía pueden afectar la función cardiovascular y pulmonar, lo cual provoca alteraciones en la frecuencia cardíaca, en la presión sanguínea y en la respiración (Yates, et al., 1980).

De manera simultánea, los procesos anabólicos son suprimidos, tales como la digestión, el crecimiento y la función reproductiva. La activación crónica de los procesos catabólicos durante la respuesta del estrés pueden llegar a ser patológicos y destructivos, estos pueden provocar alteraciones metabólicas (miopatía, fatiga y cambios en la glucosa) y cardiovasculares (hipertensión), que comprometen el crecimiento y la función reproductiva (causando impotencia o amenorrea), además de suprimir la función inmune (aumentando la susceptibilidad para contraer enfermedades), todas estas alteraciones pueden ocurrir cuando el estado de estrés es indebidamente prolongado (Krieger, 1982).

Por otro lado, los glucocorticoides tienen un papel importante en la regulación de la actividad basal del eje HHA, ya que estos ejercen retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipófisis (figura 1). Los glucocorticoides de la circulación inhiben directamente la secreción de ACTH en la hipófisis y además suprimen la secreción de CRH en el hipotálamo (Keller-Wood y Dallman, 1984). Este mecanismo permite al organismo mantener concentraciones plasmáticas de glucocorticoides estables, además

de proporcionar un mecanismo de emergencia por el cual el SNC puede responder rápidamente ante una situación de estrés (Johnson, et al., 1992).

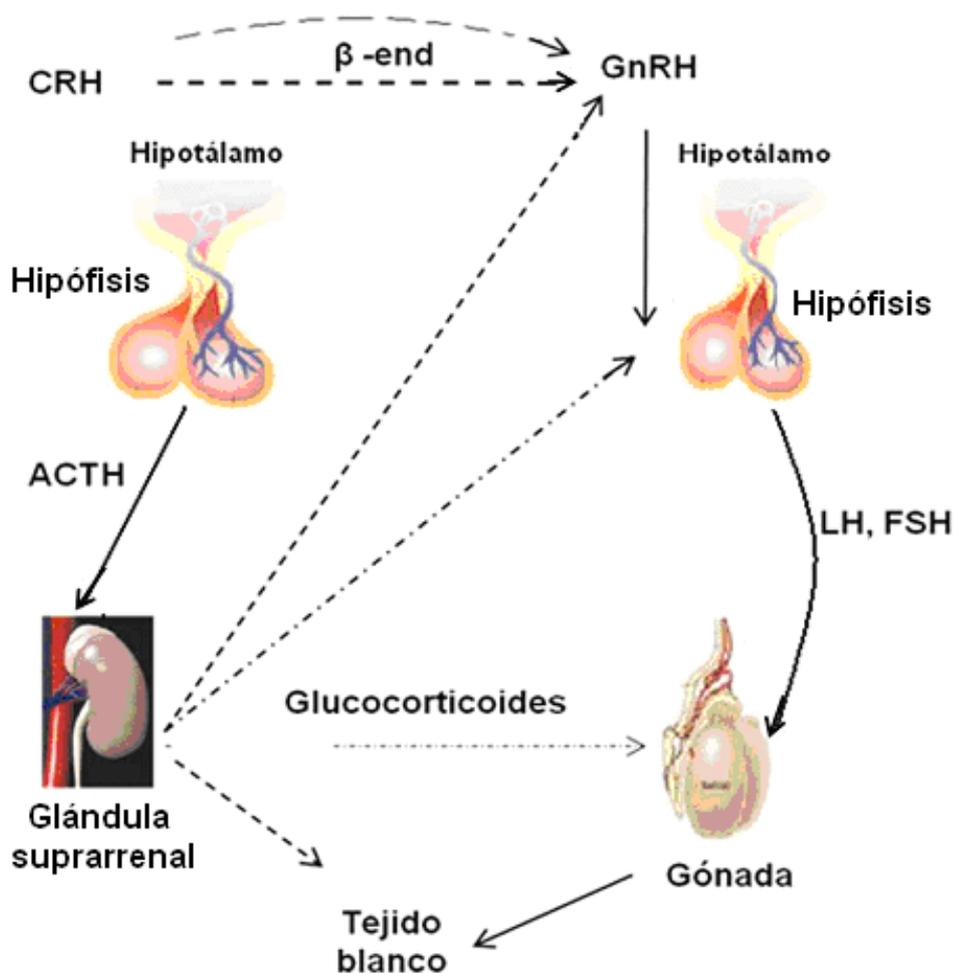
1.2 EL ESTRÉS Y LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA MASCULINA

En 1946 Hans Selye, sugirió que la exposición crónica a los estresores aumenta la actividad del eje HHA y al mismo tiempo inhibe la actividad del eje HHG. A partir de entonces el estudio de la respuesta de estrés se ha enfocado en el papel que los glucocorticoides ejercen en la función reproductiva (Retana-Márquez, et al., 1998). La figura 2 ilustra el proceso por el que el estrés puede modificar la secreción de varios componentes del eje HHA tales como la CRH, la ACTH, las β -endorfinas y los glucocorticoides, los cuales a su vez pueden actuar a diferentes niveles del eje HHG suprimiendo así su actividad (Johnson, et al., 1992).

El mecanismo por el que el estrés puede inhibir al eje HHG, posiblemente involucre los siguientes niveles: inhibición de la liberación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), por efecto directo de la CRH del hipotálamo o indirectamente por la vía de los péptidos opioides endógenos (β -endorfinas específicamente); disminución de la sensibilidad de la hipófisis hacia la GnRH causada por los glucocorticoides, provocando una disminución en la secreción de la hormona luteinizante (LH); a nivel gonadal inhiben directamente la función de las células de Leydig, disminuyendo su respuesta a la LH, a través de la reducción en los receptores testiculares de la LH (LH-R) (Bambino y Hsueh, 1981).

Además, los glucocorticoides pueden alterar la producción de esteroides sexuales en las gónadas y causar resistencia a las hormonas esteroides sexuales en sus órganos blanco (Johnson, et al., 1992). De esta manera, el

estrés crónico puede llegar a provocar un efecto general inhibitorio sobre la función hipófisis-gónada, debido a la disminución en los niveles plasmáticos de LH y de testosterona (Tsigos y Chrousos, 2002).



Esquema adaptado de Johnson, et al., 1992

Figura 2. El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) están relacionados entre sí. Durante el tiempo de exposición al estrés, la actividad de las neuronas que se encargan de secretar a la hormona liberadoras de las gonadotropinas (GnRH) es directamente inhibida por la hormona liberadora de corticotropina (CRH) o indirectamente por las β-endorfinas del hipotálamo. Los glucocorticoides inhiben la actividad del eje HHG en todos sus niveles, incluyendo el hipotálamo, la hipófisis, las gónadas y los tejidos que son blanco de los esteroides sexuales. (Las líneas sólidas representan efectos estimulantes, las líneas punteadas representan efectos inhibitorios de los glucocorticoides).

Actualmente se sugiere que la actividad reproductiva masculina es una de las principales funciones que llegan a ser alteradas e inactivadas durante la respuesta del estrés (Johnson, et al., 1992). En la actualidad, poco es lo que se sabe acerca de los efectos nocivos del estrés en la ejecución de la conducta sexual así como en el funcionamiento y en la estructura de las gónadas masculinas, particularmente en el desarrollo de la espermatogénesis (Almeida, et al., 2000). Por ello es importante hacer mención de las funciones que se llevan a cabo en los testículos, como son la espermatogénesis y la esteroidogénesis, las cuales ocurren en distintos compartimentos del órgano.

1.2.1 ESPERMATOGÉNESIS

El éxito de la fertilidad masculina, requiere de la producción de un gran número de espermatozoides maduros a través de un complejo proceso conocido como espermatogénesis (de Kretser, et al., 1998). Este proceso ocurre en los túbulos seminíferos como consecuencia del estímulo producido por las hormonas gonadotrópicas: hormona folículo estimulante (FSH) y LH de la hipófisis anterior (Málaga et al., 2005). Ambas hormonas, favorecen la maduración gonadal y la esteroidogénesis en los mamíferos (Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua, 2002).

La organización de los tipos celulares que comprenden el proceso de la espermatogénesis dentro del epitelio seminífero involucra un proceso dinámico en el cual existe una multitud de células diploides indiferenciadas (células tronco espermatogoniales); éstas pasan por una secuencia de divisiones mitóticas, meióticas y de diferenciación hasta generar espermatozoides maduros (De Martino et al., 1989). Como se muestra en la figura 3, la organización de estos tipos celulares dentro del epitelio seminífero, no es

aleatoria sino que está altamente organizada. Hacia finales del siglo XIX, un grupo de investigadores observaron que las células germinales en diferentes fases de desarrollo, fácilmente identificables, formaban asociaciones celulares.



Figura 3. Organización de los tipos celulares que comprenden el ciclo del epitelio seminífero dentro del epitelio seminífero de la rata. Cada columna vertical (identificada por un número romano, del I al XIV) corresponde a un estado del ciclo. La secuencia completa constituye un ciclo del epitelio seminífero. Nomenclatura: A, In, B: espermatozonias tipo A, intermedias y B, respectivamente; Pl, L, Z, P, Di: espermatozonias primarias en preleptoteno, leptoteno, zigoteno, paquiteno y diacinesis, respectivamente; Il espermatozonias secundarias; 1-19, etapas de la espermiogénesis (Esquema tomado de Dym y Clermont, 1970).

Posteriormente, estas investigaciones se ampliaron por el estudio detallado de Le Blond y Clermont en 1952, quienes definieron el ciclo del epitelio seminífero como la serie de cambios que ocurren con el tiempo en

cualquier sitio dado del túbulo. En estos estudios, utilizaron la tinción de PAS (ácido per-yódico, de Schiff) para teñir el acrosoma de las espermatidas y con base a su estructura y morfología nuclear, establecieron que la espermatogénesis de la rata esta dividida en 14 estados o asociaciones celulares (I al XIV) (figura 3). La secuencia completa de estas asociaciones celulares constituyen un ciclo del epitelio seminífero (de Kretser y Kerr, 1994).

El ciclo comienza con la espermatogonia A, que constituye el punto de partida de una serie espermatogénica. Antes de que la serie haya completado su evolución se inician otras en el mismo lugar del túbulo. De esta manera, cualquier sección del túbulo seminífero muestra varias generaciones de células germinales superpuestas, de forma que en un área dada del epitelio seminífero hay una sucesión constante de asociaciones celulares que transcurre con regularidad cíclica. La secuencia completa de estas asociaciones celulares constituyen un ciclo del epitelio seminífero (de Kretser y Kerr, 1994). El ciclo espermatogénico consta de varios ciclos del epitelio seminífero. En especies como 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).

1.2.2 ORGANIZACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis completa comprende cuatro etapas básicas: la espermatocitogénesis, la meiosis, la espermiogénesis y la espermiación (figura 4).

1) La espermatocitogénesis comprende el desarrollo de las espermatogonias (McLachlan, et al 2002); las cuales se encuentran situadas en

una o dos capas a lo largo del borde externo del epitelio tubular. Durante el desarrollo embrionario y la infancia, las espermatogonias primitivas, localizadas junto a la membrana basal del epitelio seminífero son llamadas espermatogonias tipo A, éstas se dividen por mitosis (figura 4) para producir más espermatogonias. En la rata, al iniciar la pubertad, aproximadamente la mitad de las espermatogonias tipo A crecen y se diferencian en células más diferenciadas las espermatogonias tipo B (Málaga, et al., 2005), las cuales después de varias divisiones meióticas se convierten en espermatocitos primarios en preleptoteno (Rowley, et al., 1971; Ville, et al., 1992; Málaga, et al., 2005). En los roedores se han descrito múltiples espermatogonias tipo A, tipo B e intermedias (figura 3).

2) Primera división meiótica (figura 4), esta fase involucra la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA) en espermatocitos primarios en preleptoteno (Parviven, et al., 1991), la síntesis de ácido ribonucleico (RNA) en espermatocitos primarios en paquiteno (en los estados VII y VIII del ciclo del epitelio seminífero en la rata) y en la terminación de la meiosis I (estado XIII del ciclo del epitelio seminífero en la rata) (figura 3), cada espermatocito en paquiteno da origen a dos espermatocitos secundarios (estado XIV del ciclo del epitelio seminífero de la rata) (figura 3 y 4) que emprenden la segunda división meiótica (figura 4). Estos tienen una vida relativamente corta y cuando ellos completan la meiosis producen cuatro espermátidas haploides (figura 4).

3) Espermiogénesis, en esta etapa inicia la transformación de las espermátidas redondas a espermatozoides (figura 4). Los cambios citológicos involucrados en este proceso pueden ser agrupados en:

a) Condensación de la cromatina, asociado con cambios químicos en el

DNA y con la aparición de una clase especial de proteínas básicas llamadas *protaminas*. Durante este proceso, existe una reducción en el volumen nuclear y cambios en la forma de la cabeza del espermatozoide, el cual es característico en cada especie; en la rata, se caracterizan por presentar una cabeza en forma de gancho.

b) Formación de un lisosoma modificado conocido como el acrosoma que consiste en un delgado saco membranoso de doble capa ubicado sobre el núcleo. Esta estructura en forma de casquete se origina del complejo de Golgi y contiene acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas importantes para la penetración de la zona pelúcida del ovocito, al momento de la fecundación.

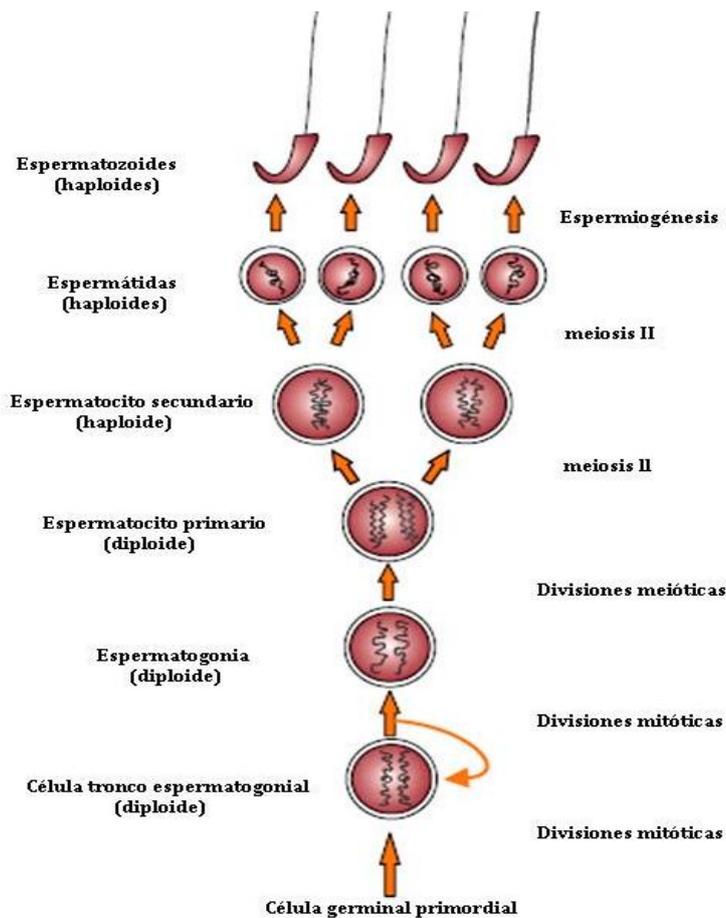


Figura 4. Procesos que ocurren en las células germinales durante la espermatogénesis de la rata. (Ilustración tomada de Chen y Mruk, 2010).

c) Formación del flagelo, se inicia con el desarrollo del filamento axial a partir del centriolo que está alineado en el eje del flagelo, conocido como centriolo distal o longitudinal (de Kretser y Kerr, 1994). El filamento axial o axonema, se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. Este segmento está rodeado por nueve fibras gruesas o densas relacionadas con los nueve dobletes del axonema.

d) Enseguida se inicia el empaquetamiento de las mitocondrias que formarán la pieza media del espermatozoide. De esta manera, el axonema y las fibras densas asociadas con la pieza media, están cubiertos de manera periférica por numerosas mitocondrias. Esta vaina mitocondrial, se encuentra dispuesta en un patrón helicoidal alrededor de las fibras longitudinales del flagelo y aporta la energía necesaria para la motilidad del espermatozoide.

e) Durante la formación del flagelo, el axonema es modificado por el desarrollo de nueve fibras electrodensas, conocidas como fibras densas externas, en la región de la pieza media del espermatozoide y distalmente para la formación de la vaina fibrosa en la región de la pieza principal.

f) Tras la finalización de estos eventos, se forma la gota citoplásmica o cuerpo residual que está compuesto de restos citoplasmáticos. Éste es liberado hacia el lumen del túbulo y es fagocitado por las células de Sertoli (de Kretser y Kerr, 1994; de Kretser, et al., 1998).

4) Espermiación, última etapa de la espermatógenesis, los espermatozoides completamente desarrollados son liberados hacia la luz tubular (McLachlan, et al., 2002), para continuar con su proceso de maduración en el epidídimo.

Cada uno de los pasos anteriores representa un importante elemento durante la producción de espermatozoides. Cualquier cambio o alteración en este proceso puede provocar el fracaso total de la espermatogénesis, conduciendo a la producción de espermatozoides defectuosos y/o a una reducción o ausencia en la producción de espermatozoides maduros afectando así la reproducción masculina (de Kretser, et al., 1998).

Además de las células germinales, en el epitelio seminífero se encuentran las células de Sertoli, estas células tienen diferentes funciones en los túbulos seminíferos, proveen de nutrientes y factores regulatorios y de crecimiento necesarios para el desarrollo de las células germinales (Russell y Griswold, 1993), fagocitan las células germinales en proceso de degeneración celular, así como los cuerpos residuales, también se encuentran involucradas en el proceso de espermiación y en la producción de proteínas que regulan y/o que responden a la liberación de FSH, como la inhibina. Además, tienen influencia en la actividad mitótica de las espermatogonias (Jonhson, et al., 1991, Russell y Griswold, 1993).

En el espacio intersticial del testículo, entre los túbulos seminíferos se encuentran las células de Leydig, que son las principales productoras de andrógenos (de Kretser, et al., 1998). En los adultos sexualmente maduros, los andrógenos son esenciales para el desarrollo de la espermatogénesis, para la competencia reproductiva, para la ejecución de la conducta sexual así como para el mantenimiento de las características sexuales masculinas (Swerdloff y Wang, 1996; Wu, et al., 2007).

1.2.3 REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DE LA FUNCIÓN TESTICULAR

En los mamíferos la espermatogénesis requiere de la acción de un ordenado complejo de péptidos y hormonas esteroides, cada uno de los cuales desempeña un papel importante en el funcionamiento normal del epitelio seminífero. Estos mensajeros hormonales son críticos no sólo para la regulación del desarrollo de células germinales masculinas, sino también para la proliferación y función de los tipos de células somáticas requeridas para el apropiado desarrollo del testículo (Sharpe, 1994; McLachlan et al., 2002).

La producción de espermatozoides y la secreción de testosterona, dependen principalmente de la estimulación de las gonadotropinas de la hipófisis; la FSH y LH, estas hormonas son secretadas en respuesta a la secreción de la GnRH del hipotálamo. Las gonadotropinas actúan directamente en los testículos estimulando la función de las células de Leydig que mantienen la secreción de testosterona, así como la producción de factores necesarios para el desarrollo y mantenimiento de la espermatogénesis a través de las células de Sertoli.

Las células de Leydig están bajo el control de la gonadotropina LH, que estimula a estas células para que secreten la testosterona necesaria para la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis (Schultz, et al., 1993; McLachlan et al., 2002). Los LH-R, además de localizarse en las células de Leydig, también están presentes en las células germinales (Holdcraft y Braun, 2004), lo que implica un control directo de la LH en el proceso de espermatogénesis.

Las células de Sertoli tienen un papel importante en la regulación de la espermatogénesis y su función biológica es regulada por la FSH. Estas células

forman parte del epitelio seminífero y, junto con la testosterona producida por las células de Leydig, parecen tener una acción local de especial importancia en la espermatogénesis. Las células de Sertoli tienen receptores para la FSH y para la testosterona, los cuales son los principales reguladores hormonales de la espermatogénesis. Si bien la FSH parece tener un papel importante en la estimulación de la síntesis de DNA, en la mitosis de las espermatogonias tipo B y en la meiosis de los espermátocitos primarios en fase de preleptoteno, también tiene un papel importante en la prevención de apoptosis de espermátocitos primarios en paquíteno y de espermátidas redondas (Henriksen, et al., 1996; Shetty, et al., 1996).

Varios estudios han demostrado que la supresión del eje HHG puede inducir una disminución de gonadotropinas, lo cual provoca la muerte de células germinales, particularmente en los estados VI y VII del ciclo del epitelio seminífero, durante la espermatogénesis (Russell y Clermont, 1977), debido a que se incrementa la apoptosis (Sinha y Swerdloff, 1999, Kim et al., 2001). Además, el aumento en la secreción de cortisol inducido por el estrés prolongado puede inhibir la secreción de gonadotropinas, este efecto ha sido observado en el mono Rhesus (Dubey y Plant, 1985).

Estudios con animales hipofisectomizados, muestran que la regulación neuroendocrina de la espermatogénesis depende principalmente de la interacción que existe entre la FSH y la testosterona (Steinberger, 1971; McLachlan, et al., 2002). La FSH muestra un papel importante en el desarrollo de los testículos, esta hormona estimula la proliferación de las células de Sertoli y la progresión meiótica de las espermatogonias A y B (Billig, et al., 1995; Franca, et al., 2000) en la rata.

La testosterona por si misma puede mantener todo el desarrollo de la espermatogénesis, pero requiere de la acción hormonal de la FSH para poder normalizar varios aspectos cuantitativos de la espermatogénesis (Steinberger, 1971; Bartlett, et al., 1989; McLachlan, et al., 1996). Además estimula la producción de la proteína fijadora de andrógenos (ABP) por las células de Sertoli, que depende principalmente de la FSH. La ABP tiene como función fijar la testosterona en el testículo y es la proteína específica para el transporte plasmático de esta importante hormona masculina (Hansson et al., 1975).

A pesar de que la FSH y la testosterona representan las condiciones hormonales para el desarrollo de la espermatogénesis, las células germinales carecen de receptores para estas hormonas (de Kretser, et al., 1998). Se ha descrito que los receptores de FSH se localizan principalmente en las células de Sertoli. De manera que los efectos de la testosterona y la FSH en las células germinales son regulados a través de las células de Sertoli, éstas además expresan los genes involucrados en la regulación de la espermatogénesis, los cuales pueden ser también regulados por múltiples factores locales que actúan en conjunto con los andrógenos (Roberts y Zirkin, 1991). También existen interacciones locales de regulación entre las células intersticiales, las células mioideas y las células del túbulo seminífero, las cuales involucran a factores del crecimiento y péptidos derivados de la POMC; que regulan el crecimiento y la diferenciación de la célula, necesarios para la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis (Skinner et al., 1991).

1.2.4 BIOSÍNTESIS DE TESTOSTERONA

Las hormonas esteroides tienen un papel regulador importante en diversos aspectos fisiológicos de los mamíferos; incluyendo la respuesta al estrés y en el desarrollo de las características sexuales secundarias. En las hembras, tienen el control del ciclo menstrual; mientras que, en los machos estimulan la espermatogénesis. En los mamíferos, existen dos sitios principales de producción de esteroides en las adrenales, que producen principalmente aldosterona y corticosteroides (cortisol en humanos y corticosterona en ratas) y en las gónadas, que sintetizan hormonas sexuales esteroides; estradiol y progesterona en hembras y andrógenos en machos, en mayor proporción (Eacker, et al., 2008).

Los andrógenos son producidos por las células de Leydig y son responsables del desarrollo y mantenimiento de las características sexuales masculinas del cuerpo, tales como los órganos sexuales internos y genitales externos del sistema reproductor masculino, también son responsables de las características sexuales secundarias masculinas (Swerdloff y Wang, 1996; Wu, et al., 2007).

El andrógeno de mayor importancia biológica sintetizado por los testículos es la testosterona; esta hormona es requerida por las células de Sertoli para apoyar el proceso de espermatogénesis durante todas sus etapas (Hardy, et al., 2002). La testosterona tiene sitios específicos de acción en la iniciación (Haywood, et al., 2003), mantenimiento (Sun, et al., 1989) y restauración (O'Donnell, et al., 1994) de todas las fases de la espermiogénesis. Las células de Leydig, localizadas en el espacio intersticial de los túbulos seminíferos, están bajo el control de la liberación pulsátil de la LH por la

hipófisis. Esta hormona se une a su receptor LH-R localizado en la superficie de las células de Leydig (Ascoli, et al., 2002). El LH-R está acoplado a proteínas G y su activación estimula a las células de Leydig a activar la maquinaria enzimática para iniciar la síntesis de testosterona a partir del colesterol (Dufau, 1997).

La interacción de la LH con su receptor en la membrana celular provoca aumento del AMPc (adenosina 3', 5' –monofosfato), el cual a su vez activa la enzima colesterol éster hidrolasa requerida para la formación de colesterol libre. De manera adicional, ocurre una serie de eventos que estimula la liberación de colesterol celular hacia la membrana mitocondrial externa.

La acción del AMPc induce la liberación de ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos intracelulares y araquidonil-CoA por acción de la fosfolipasa A₂ y una tioesterasa acyl-Coa conocida como ARTIST (ácido araquidónico relacionado con la tioesterasa involucrada con la esteroidogénesis). La liberación del ácido araquidónico y la conversión de uno o más metabolitos son requeridos en la biosíntesis *de novo* de esteroides.

La combinación de la actividad de la proteína cinasa A (PKA) y los metabolitos del ácido araquidónico dan como resultado la síntesis *de novo* de la proteína StAR (proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda), esta proteína facilita el transporte del colesterol desde el espacio intracelular hacia la mitocondria, el cual rápidamente interactúa con la membrana mitocondrial externa y la enzima P450_{scc} (*side-chain cleavage enzyme*) donde es convertido en pregnenolona, esta hormona a su vez es metabolizada a 17-hidroxi-pregnenolona (17-OH-pregnenolona) y posteriormente es convertida a dehidroepiandrosterona (DHEA) por acción de la enzima 17 α -

hidroxilasa/C₁₇,C₂₀-liasa, subsecuentemente la DHEA es convertida a androstenediona por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Por último, la androstenediona es convertida en testosterona por la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, esta enzima es expresada exclusivamente en las gónadas (Miller, 1988; Andersson, et al., 1996). Esta vía se encuentra en la mayoría de los roedores, incluyendo a la rata y al ratón (Slaunwhite y Samuels, 1956).

2.0 ANTECEDENTES

2.1 EFECTO DEL ESTRÉS EN EL EPITELIO SEMINÍFERO

En las últimas décadas se ha incrementado el estudio de los efectos del estrés en la función reproductiva masculina. La mayor parte de la investigación, se ha enfocado en evaluar los mecanismos neuroquímicos y fisiológicos involucrados en la respuesta del estrés; dichas investigaciones reconocen que el estrés es capaz de inhibir la función gonadal en varias especies animales, incluyendo a los humanos. En estos estudios se ha evaluado el efecto del estrés en la función reproductiva y el posible papel de los glucocorticoides y de los opioides endógenos en la inhibición del eje HHG. También se ha logrado identificar a aquellas hormonas involucradas en la respuesta del estrés, que han sido utilizadas como marcadores bioquímicos para identificar y correlacionar al estrés crónico con diferentes parámetros involucrados en la fertilidad masculina. Sin embargo, el mecanismo preciso a través del cual el estrés inhibe la función gonadal, no ha sido completamente entendido. Por esta razón, se han utilizado modelos animales que han permitido evaluar los efectos del estrés en diversos aspectos de la actividad reproductiva como son la

conducta sexual, la espermatogénesis y la esteroidogénesis testicular. Para ello, se han desarrollado diversos paradigmas experimentales que han permitido evaluar estos efectos.

Esos paradigmas han consistido en la aplicación de choques eléctricos en las patas (Ishikawa, 1992; Retana-Márquez, et al., 2003), inmovilización en primates (Gondos, 1970) y en ratas (Collu, en 1984; Retana-Márquez, et al., 2003), así como el nado forzado en agua caliente (Mingoti, et al., 2003) o la inmersión en agua fría (Bidzinska, 1993; Retana-Márquez, et al., 2003). La mayoría de estos trabajos reportan que el estrés es capaz de alterar diversos aspectos de la fisiología reproductiva y conductual en los mamíferos machos.

La mayoría de estas investigaciones, establecen que los mamíferos machos expuestos a alguna de estas situaciones de estrés, pueden presentar disminución en la secreción de testosterona (Collu, et al., 1984), alteraciones en la espermatogénesis (Almeida, et al., 2000) y disminución de la libido (Sapolsky, et al., 1986) e incluso involución testicular y disminución de la fertilidad (Phillips et al, 1989). Esta reducción en la fertilidad, probablemente se deba a que el estrés tenga efectos indirectos en el epitelio seminífero (Guo-Xin, et al., 2008), a través de la disminución en la concentración de testosterona, lo que provoca pérdida de células germinales (Russell y Clermont, 1977) alterando así el desarrollo de la espermatogénesis.

El estrés por inmovilización en monos de la especie *Macaca nemestrina* causa degeneración progresiva de los espermatoцитos primarios y de las espermátidas, llegando a observarse túbulos seminíferos que solo contenían espermatoгонias y células de Sertoli (Gondos, et al., 1970). Otro estudio

sugiere que la disminución en la secreción de testosterona por efecto del estrés crónico reduce la producción de espermatogonias y espermátocitos, lo que provoca reducción significativa en la población de espermátidas (O'Donnell, et al., 1996).

Resultados similares se han obtenido en ratas jóvenes (40 días de edad), inmovilizadas en cilindros de plástico 6 horas diarias, durante 60 días consecutivos. El análisis histológico del epitelio seminífero de estos roedores, mostró una disminución del 16% en la producción de espermátidas maduras, una disminución del 32% en la concentración espermática en la cauda del epidídimo y una pequeña pero significativa reducción en las células de Sertoli, todos estos cambios fueron asociados con una disminución del 37% en la secreción de testosterona plasmática. Es probable, que la disminución en la producción de testosterona de las ratas estresadas pudiera ser la responsable de los cambios producidos en la producción de espermátidas (Almeida, et al., 1998).

Además de los modelos experimentales anteriormente descritos, existen otros que han evaluado la sensibilidad del epitelio seminífero a estímulos ambientales como el calor, el frío o a la radiación (Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1997), los cuales pueden provocar interrupción de la espermatogénesis afectando directamente la fertilidad masculina (Nelson, 1951). Se ha investigado de manera intensa el efecto del estrés por calor (inducido por criptorquidia) en los testículos de rata (Nelson, 1951; Chowdhury y Steinberger, 1970; Yavetz et al., 1992), pero el efecto de las bajas temperaturas en la función del testículo ha sido poco estudiado.

En los mamíferos, la temperatura puede tener un papel importante en el

control de las funciones endocrinas y principalmente en los procesos reproductivos (Yazawa, et al., 2001). Se ha demostrado que la temperatura puede afectar directamente a las células del epitelio seminífero, alterando el desarrollo y mantenimiento de la espermatogénesis, provocando infertilidad en los machos (Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1997). Se ha reportado que un aumento en la temperatura escrotal de 1.5 – 2 °C puede llegar a inhibir la espermatogénesis (Mieusset, et al., 1933; Skandhan y Rajahariprasad, 2007).

El congelamiento directo de testículos de ratas a 0 °C durante 1 hora, provoca la pérdida masiva de células germinales. En este caso, los túbulos seminíferos contenían en su interior sólo células de Sertoli; además, todas las espermatogonias tronco fueron completamente destruidas y por lo tanto la espermatogénesis no se restableció (Gronsky, 1930). Posteriormente, se evaluó el efecto de 1 hora de congelamiento (de 2 °C a 4 °C) en los testículos de rata, este estímulo permitió que las espermatogonias lograran sobrevivir y que la espermatogénesis pudiera ser restablecida 28 días después del congelamiento (McDonald y Harrison, 1954). De este modo, las bajas temperaturas (hipotermia), así como la exposición al calor, pueden tener efectos directos en las células germinales del epitelio seminífero (Yin, et al., 1997; Zhang, et al., 2004).

Diferentes formas de estrés pueden producir cambios en la función reproductiva masculina. En un estudio reciente en el que se sometieron ratas a nado forzado, colocándolas en un tanque de agua a 32 °C, por periodos de 3 minutos, durante 15 días consecutivos, se observó que la fertilidad masculina no se afecta inmediatamente, pero sí provoca disminución significativa en la producción de espermátidas (Mingoti, et al., 2003). En relación con los seres

humanos, el nado actualmente es considerado como ejercicio, pero se ha visto que este puede ocasionar reducción de corta duración en la concentración sérica de testosterona; la cual retorna a su concentración normal poco tiempo después de terminar el ejercicio sin afectar de manera importante la fertilidad masculina (Cumming, et al., 1987).

Los efectos nocivos del estrés en animales y humanos van desde reducción del volumen seminal, disminución de la motilidad y de la cuenta espermática, además de una disminución en la cantidad de espermatozoides normales (Steinberg, 1978; Cui, 1996). En los humanos, existen reportes de que el estrés psicológico severo provocado por el fallecimiento de un familiar o de la esposa reduce de manera constante la producción de espermatozoides, lo que ocasiona disminución de la fertilidad (Fenster, et al., 1997). El estrés psicológico es considerado como una de las principales causas de infertilidad idiopática en el hombre (Saki, et al., 2009).

2.2 EFECTO DEL ESTRÉS EN LA SECRECIÓN DE TESTOSTERONA

Actualmente existen estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, que muestran que los glucocorticoides pueden inhibir directamente la producción de testosterona del plasma al actuar en las células de Leydig (Hales y Payne, 1989). En estos estudios se ha propuesto que un posible mecanismo por el que el estrés podría afectar la función reproductiva, involucra principalmente a la CRH, la cual podría inhibir la secreción de GnRH directa o indirectamente a través de los péptidos opioides (Johnson, et al., 1992), suprimiendo la secreción de gonadotropinas de la hipófisis.

Algunos de estos estudios realizados en ratas, ratones y en el ser humano muestran que el estrés puede provocar modificaciones hormonales durante la exposición aguda a estresores físicos como el nado forzado en agua fría (Bidzinska, et al., 1993; Retana-Márquez, et al., 2003), la inmovilización (Collu, et al., 1984), la privación de sueño (Andersen, et al., 2004), los choques eléctricos en las patas (Ishikawa, et al., 1992; Retana-Márquez, et al., 2003) o en situaciones que causan ansiedad en algunos machos de estas especies (Schedlowski, et al., 1995), la exposición prolongada a alguna de estas situaciones puede aumentar significativamente la corticosterona plasmática y disminuir la concentración de testosterona en el plasma (Sapolsky, 1985, Retana-Márquez, et al., 1998, 2003) en los machos.

Esta disminución en la secreción de testosterona plasmática es una de las primeras señales de que el estrés afecta la función reproductiva masculina (Fenster, et al., 1997). Un mecanismo posible por el que el estrés puede inhibir la función reproductiva, involucra directamente a los glucocorticoides plasmáticos, ya que estos tienen un efecto indirecto en la esteroidogénesis, debido a que pueden inhibir la liberación de LH en la hipófisis (Briski y Silvestre, 1994), afectando directamente la producción de testosterona en las células de Leydig (Evain, et al., 1976, Bambino y Hsueh, 1981, Li, 1991).

Recientemente se ha investigado el efecto del estrés crónico por inmersión en agua fría durante 20 días de exposición en la conducta sexual de la rata macho. Se demostró que este estresor tiene un profundo efecto inhibitorio tanto en la conducta sexual masculina como en la concentración plasmática de testosterona, la cual disminuye significativamente (Retana-Márquez, et al., 2003). Al mismo tiempo, el estrés por inmersión en agua fría

ocasionó un aumento significativo en la concentración plasmática de corticosterona, que es la hormona que libera la corteza suprarrenal durante el estrés en los roedores. Estos resultados muestran que el estrés por inmersión en agua fría es un potente activador del eje HHA e inhibidor del eje HHG, debido a que causa una clara y significativa disminución de la testosterona en el plasma (Retana-Márquez, et al., 2003).

La inhibición en la concentración de testosterona en la sangre por efecto del estrés, en gran medida puede deberse a un efecto directo del receptor a glucocorticoides que, además de su ubicación citosólica, también se encuentra en la membrana de las células de Leydig. Por otra parte, también se ha reportado que el estrés crónico, provoca disminución de la secreción de gonadotropinas de la hipófisis (Sapolsky, 1992). En la rata, la concentración plasmática de LH se altera sólo cuando el estrés se prolonga a 10 días o más (Hardy, et al., 2002). Además, se ha visto en estos roedores que la concentración plasmática de estas hormonas se modifica de manera bifásica, es decir, en el estrés agudo, la concentración de LH y de testosterona se eleva en la sangre, mientras que en el estrés crónico disminuye (Taylor, et al., 1987).

En un estudio reciente quedó establecido que el aumento en la concentración de glucocorticoides inducido por el estrés, podría estar involucrado en la iniciación de apoptosis en las células de Leydig (Hardy, et al., 2005) de la rata. Este puede ser un mecanismo por el que la corticosterona podría contribuir indirectamente a reducir la concentración de testosterona en el plasma durante la exposición al estresor. La muerte por apoptosis en las células de Leydig está relacionada con la activación del sistema Fas, de la procaspasa 3, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y el aumento

en la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), éstos están implicados en los procesos de apoptosis en las células de Leydig inducidos por la exposición a la corticosterona (Hardy, et al., 2005).

El efecto de los glucocorticoides en la función testicular de la rata, podría ser atribuido a la reducción en la producción de andrógenos por las células de Leydig (Evain, et al., 1976; Ge, et al., 1997), mediada por receptores membranales a los glucocorticoides (Weber, et al., 2000). Asimismo se han encontrado receptores para glucocorticoides en varios tipos de células germinales, así como en las células de Sertoli (Schultz et al., 1993, Konrad, et al., 1998). El estrés crónico, puede afectar la función testicular a través de cambios combinados en la concentración plasmática de glucocorticoides y de LH (Norman, 1993; Orr, et al., 1994; Almeida, et al., 1998). En los humanos, el estrés crónico por ejercicio intenso, entrenamiento militar o privación de sueño durante cinco días consecutivos provoca aumento en la concentración plasmática de cortisol, provocando disminución en la concentración circulante de testosterona (Opstad, 1994).

Aunque está claro que el aumento de los glucocorticoides en la sangre por efecto del estrés, está relacionado con la disminución en la testosterona plasmática (Monder, et al., 1994), las consecuencias a largo plazo de tales cambios en la salud reproductiva masculina, no han sido completamente estudiadas. Asimismo, la disminución en la producción de testosterona observada en la mayoría de estos estudios, está relacionada con el aumento de la corticosterona plasmática de los machos expuestos a diferentes tipos de estrés. Recientemente se demostró que la exposición a estrés crónico por inmersión en agua fría y los choques eléctricos en las patas, aplicados a ratas

macho, inhibe la ejecución de la cópula y que ese efecto está asociado con la disminución de la testosterona plasmática (Retana-Márquez, et al., 2003).

2.3 EFECTO DE LA ACTIVIDAD COPULATORIA EN LA CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA

La ejecución de la conducta sexual masculina durante la cópula, es un aspecto importante en la fisiología reproductiva de los organismos (Moralí, 1998). Se sabe que la actividad sexual estimula la secreción de testosterona, causando un incremento de aproximadamente 3 veces la concentración basal en la rata macho (Retana-Márquez, et al., 2003), en los anfibios (Orchinick, et al., 1988), en los caballos (Colborn, et al., 1991) y en los ratones (Craigén y Bronson, 1982). Por lo anterior, se ha considerado que la ejecución de esta conducta podría atenuar los efectos del estrés (Justel, et al., 2009). No obstante, existen estudios en los que se muestra que la exposición al estrés por 20 días puede afectar la conducta copulatoria y al mismo tiempo disminuir la concentración plasmática de testosterona (Retana-Márquez, et al., 2003; Almeida, et al., 2000). Sin embargo, no hay estudios en los que se haya evaluado el efecto del estrés por tiempos más prolongados en la concentración de testosterona plasmática, durante los cuales los animales tengan acceso a cópula con hembras receptivas.

Por otro lado, aún no se ha establecido de manera clara qué tipo de alteraciones causa el estrés crónico en la función testicular. Se sabe que el estrés puede disminuir la eficiencia en la actividad reproductiva masculina, a través de inducir cambios degenerativos en la histología de los testículos, pero pocos estudios se han conducido a investigar el efecto del estrés por inmersión

en agua fría en la espermatogénesis de la rata y los efectos que puede producir en la función testicular. Con base en estas consideraciones, utilizando a la rata macho como modelo experimental de mamífero, en este trabajo se evaluó el daño que el estrés crónico puede provocar en el epitelio seminífero de ratas macho sexualmente inexpertas, sometidas a cópula después de ser expuestas a estrés crónico por inmersión en agua fría. Esto con la finalidad de analizar algunas de las causas que conducen a la infertilidad masculina, misma que ha sido poco estudiada en los seres humanos.

3.0 JUSTIFICACIÓN

Durante la respuesta adaptativa del estrés se activa el eje HHA y al mismo tiempo se inhibe la actividad del eje HHG. Se ha propuesto que la inhibición del eje gonadal se debe a los glucocorticoides que son liberados de la corteza suprarrenal y que actúan en todos los niveles de este eje. Aunque se ha demostrado que el estrés crónico inhibe la conducta sexual masculina, disminuye la secreción de testosterona y altera la espermatogénesis en el testículo, aún no está bien definido qué células del túbulo seminífero se afectan por efecto del estrés.

Se ha establecido que el estrés incrementa la concentración plasmática de glucocorticoides y que éstos ejercen una poderosa supresión del eje reproductivo. A pesar de ello aún no se ha considerado al estrés crónico como un factor de riesgo para la infertilidad masculina, tanto en los humanos como en otras especies. Existen pocos reportes concernientes al efecto del estrés crónico en los testículos, por lo que en este trabajo se evaluarán los cambios que presenten las células germinales de los túbulos seminíferos.

Considerando que el proceso de la espermatogénesis está regulado por la testosterona y que la cópula estimula la producción de testosterona, se evaluarán los cambios en la concentración de la testosterona plasmática asociados al daño testicular en ratas macho sometidas a cópula después de ser expuestas a estrés crónico por inmersión en agua fría.

4.0 HIPÓTESIS

Si la activación del eje HHA por efecto del estrés inhibe la función del eje HHG, entonces el estrés crónico provocará disminución en la secreción de testosterona y causará daño en las células del epitelio seminífero afectando así el proceso de la espermatogénesis.

5.0 OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar el efecto del estrés crónico en algunos aspectos de la función reproductiva de la rata macho.

6.0 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Evaluar los cambios producidos en la concentración sérica de testosterona por efecto del estrés crónico.
- Determinar el efecto del estrés crónico sobre la espermatogénesis

7.0 DISEÑO EXPERIMENTAL

Todos los procedimientos utilizados en el presente estudio, cumplieron con la Guía para el estudio y uso de animales de laboratorio y el protocolo experimental se ajustó a las reglas oficiales mexicanas.

7.1 ANIMALES DE LABORATORIO

Se utilizaron ratas macho adultas jóvenes, sexualmente inexpertas, de la cepa Wistar de tres meses de edad, con un peso aproximado de 300g, producidas en el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Se mantuvieron 6 ratas macho por caja (cajas de acrílico de 50 X 30 X 20 cm), bajo condiciones habituales de bioterio en un cuarto con temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ y con un ciclo de luz-oscuridad invertido (12:12), la luz se prendió a las 9 pm y se apagó a las 9 am del día siguiente, con agua y alimento *ad libitum*. Los animales fueron divididos en los siguientes grupos: grupo control, sin cópula; grupo control, con cópula; grupo de estrés por inmersión en agua fría, con cópula, grupo de estrés por inmersión en agua fría, sin cópula. Cada grupo estuvo formado por 6 animales.

7.2 APLICACIÓN DE ESTRÉS CRÓNICO POR INMERSIÓN EN AGUA FRÍA

Consistió en colocar a las ratas individualmente en un tanque de agua a una temperatura de 15°C , a una altura de 15 cm, donde permanecían nadando o en posición vertical, de pie sobre sus patas traseras, manteniendo la cabeza por encima del nivel del agua, durante periodos de 15 minutos. Este procedimiento se llevó a cabo durante 50 días consecutivos. Los machos de los

grupos control fueron mantenidos en sus cajas y sólo se sacaron para las sesiones de cópula.

7.3 CÓPULA

Los machos de los grupos de cópula, se aparearon con hembras sexualmente receptivas, previamente ovariectomizadas y tratadas con estradiol (10 µg) durante 10 días y con progesterona (2mg) 4 horas antes del acceso a la cópula, los machos copularon con las hembras los días 1, 10, 20, 30, 40 y 50 de estrés, la prueba se realizó en la fase oscura y con luz roja. La cópula se realizó 30 minutos después de las sesiones de estrés, para ello cada macho fue colocado en un redondel de acrílico y se dejó un periodo de habituación de 5 minutos, posteriormente se introdujo a la hembra receptiva y se les permitió copular durante 30 minutos.

7.4 DISECCIÓN DE LOS TESTÍCULOS

Al finalizar los 50 días de estrés crónico los animales se trasladaron a la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría en el laboratorio de Biología de la Reproducción para realizar el estudio histológico. Las ratas se pesaron y se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (25 mg/kg de peso corporal administrado por vía intraperitoneal) (Sedalphorte Reg. SAGARPA Q-7503-003).

Ambos testículos fueron retirados del escroto a través de una incisión de la línea media del abdomen inferior, únicamente el testículo derecho se perfundió a través de la arteria testicular, con una solución amortiguadora de cacodilato de sodio al 0.1 M y posteriormente con la solución de Karnovsky

(Karnovsky, 1965). Inmediatamente se le retiró la cápsula para obtener los túbulos seminíferos, los cuales fueron depositados en un vial con solución de Karnovsky durante 24 horas. Al día siguiente, los túbulos se lavaron con solución amortiguadora de cacodilato de sodio al 0.1 M. Enseguida se realizaron cortes seccionados en diferentes puntos de los túbulos seminíferos, de manera que se encontraran en la misma dirección, este procedimiento se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico, se obtuvieron 4 secciones de túbulos seminíferos, por animal. Los túbulos seminíferos seccionados se procesaron para inclusión en EPON, esta resina plástica permite obtener cortes de grosor mucho más delgados.

7.5 INCLUSIÓN EN EPON

Una vez seccionados, a los túbulos seminíferos se les realizó una post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% durante 1 hora. Enseguida, se lavaron con solución amortiguadora de cacodilato de sodio al 0.1 M por 5 minutos, este procedimiento se repitió 3 veces. Posteriormente, los túbulos fueron deshidratados con una serie de concentración ascendente del agente deshidratante (etanol):

Primero, se realizaron dos cambios seguidos con alcohol al 60 % y se dejó reposar 10 minutos en el tercer cambio. Una vez transcurrido el tiempo se repitió este mismo procedimiento con alcohol al 70% y posteriormente con alcohol al 80%. Enseguida, se realizaron dos cambios con alcohol al 90 % y se dejó reposar 10 minutos en cada cambio. Se continuó con este mismo procedimiento con alcohol al 96% y a continuación con alcohol al 100%.

Posteriormente, a los túbulos seminíferos se les realizaron dos cambios con óxido de propileno y se dejó reposar 15 minutos en cada cambio.

Posterior a la deshidratación los túbulos seminíferos se impregnaron con óxido de propileno, como se describe a continuación:

1. En un tubo de ensaye se realizó una dilución de EPON con óxido de propileno en proporción 1:1, de esta mezcla se tomó una alícuota y se depositó en el vial que contenía los túbulos seminíferos y se dejó impregnar por una hora.

2. Posteriormente, se realizó una segunda dilución de EPON con óxido de propileno en proporción 2:1 dejando impregnar durante 24 horas. Al día siguiente, los túbulos se cubrieron con EPON puro y se dejaron impregnar por 24 horas.

Al terminar el proceso de impregnación, los túbulos fueron incluidos en EPON, para ello los túbulos se colocaron de manera transversal en un molde de silicón y se cubrieron en su totalidad con EPON puro. Este molde se metió en la estufa (Fisher Scientific) a una temperatura de 60° durante 24 horas. Una vez incluidos en EPON, se realizaron cortes semifinos de 1 μm de grosor, utilizando un ultramicrotomo (LEICA ULTRACUT UCT), se obtuvieron 20 cortes seriados, por animal. Los cortes obtenidos fueron teñidos con azul de toluidina al 0.5% y se montaron 5 cortes por portaobjeto.

7.6 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

El análisis histológico se realizó utilizando un microscopio de luz (Olympus light microscope CX 41), se analizaron aproximadamente 50 túbulos seminíferos por rata. A cada uno de los túbulos examinados se les asignó un

valor de acuerdo al daño histológico observado, utilizando una escala que va desde el 1 hasta el 6, llamado índice histopatológico (IH), ilustrado en la tabla 1 (Vigueras-Villaseñor, et al., 2009). El IH se determinó por la suma de los puntos en cada una de las secciones transversales de los túbulos examinados. Este IH permite evaluar las alteraciones histológicas que presentan los túbulos seminíferos.

7.7 EVALUACIÓN DEL ÍNDICE DE JOHNSEN

El índice de Johnsen (IJ) (Johnsen, 1970), permite evaluar de acuerdo la presencia o ausencia de los tipos celulares dispuestos en orden de desarrollo y maduración. Para ello se asignó una puntuación a cada túbulo seminífero de acuerdo al tipo celular presente, asignando desde 1 (ausencia de células en el túbulo seminífero) hasta 10 (espermatogénesis completa con un gran número de espermatozoides presentes), ilustrado en la tabla 2.

Tabla 1. Índice histopatológico, permite hacer una evaluación de las alteraciones histológicas que presentan los túbulos seminíferos (Viguera-Villaseñor, et al., 2009)

Alteraciones histológicas	Puntaje
a) Plegamiento de la lámina basal	1
b) Descamación celular	1
c) Vacuolización epitelial	2
d) Vacuolización en células germinales	2
e) Desorganización celular	2
f) Degeneración celular	2
g) Cincisio celular	2
h) Picnosis	3
i) Tubos sin espermatocitos	4
j) Tubos sin espermatogonias	5
k) Ausencia de todo tipo celular	6

Tabla 2. Índice de Johnsen, permite hacer una evaluación de acuerdo a la presencia o ausencia de los tipos celulares dispuestos en un orden de desarrollo y maduración (Johnsen, et al., 1970).

Puntuación	Presencia o ausencia de células germinales en los túbulos seminíferos
10	Espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides
9	Espermatogénesis completa con poca cantidad de espermatozoides (5 por túbulo)
8	No hay espermatozoides maduros, presencia de espermátidas maduras en diferenciación
7	Gran cantidad de espermátidas sin algún signo de diferenciación
6	Presencia de pocas espermátidas (5 por túbulo)
5	Gran cantidad de espermatocitos presentes
4	Pocos espermatocitos presentes (5 por túbulo)
3	Presencia únicamente de espermatogonias
2	No hay células germinales, sólo están presentes las células de Sertoli
1	No hay células en el tubo seminífero

7.8 DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA

Para determinar la concentración de testosterona sérica de los machos control y estresados, se obtuvo sangre (3-4 ml) por punción cardiaca los días 1, 10, 20, 30, 40 y 50 de estrés, media hora después de la cópula. La sangre obtenida se depositó en tubos de ensayo e inmediatamente fue centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos, para separar el suero, este se colocó en tubos de ensayo y se congelaron a -20° C para su posterior evaluación.

Al finalizar los 50 días de estrés se descongelaron los sueros para determinar la concentración de testosterona plasmática por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La extracción de los esteroides del suero se realizó de acuerdo con una modificación del método reportado por Woodward y Emery, en 1988. Se obtuvo 1 ml de suero, tanto de animales control y estresados, se separaron de acuerdo al grupo al que pertenecían, para iniciar la fase de separación de esteroides a cada uno de los tubos se les añadieron 100 μ l de hidróxido de sodio 0.03 M, 5 ml de éter-dietílico -diclorometano (proporción V/V 60:40) y se homogenizaron en un vortex durante 2 minutos y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos.

Se obtuvo la fase orgánica a la que se le adicionó 1 ml de agua grado HPLC y se homogenizó con el vortex. Después de una segunda centrifugación, se separó la fase orgánica (3 ml) y se dejó evaporar a temperatura ambiente. Posteriormente, los residuos fueron re-disueltos en 100 ml de una mezcla de metanol y agua (65:35 v/v).

7.9 CUANTIFICACIÓN DE TESTOSTERONA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La pre-columna (Symmetry C18, tamaño de partícula de 3.5 µm, 2.1 X 10 mm; Waters Corp., Milford, Massachussets, USA) y la columna fueron equilibradas con acetonitrilo–agua (67:33 v/v) con una velocidad de flujo de 0.4 ml/min. Las separaciones se realizaron a una temperatura de 40 °C, con una columna de Waters Symmetry C18 (tamaño de la partícula 5 µl; tamaño de la columna 2.0 X 150 mm; Waters Corp., Milford, Ma, USA).

Se utilizó un sistema controlador Waters 600 MS para separar la fase móvil y los esteroides se evaluaron con un detector ultravioleta (UV) (486 Waters UV absorbance detector) a una absorbancia de 245 nm. Para la calibración, se utilizaron estándares (nortestosterona, androstendiona y testosterona) concentraciones que cubren el rango de 0-30 ng/ml. La regresión lineal de la concentración de testosterona fue calculada y se usó para determinar las concentraciones de las muestras biológicas. Para la testosterona, la regresión lineal fue: $y = - 0.774 + 0.2181x$ ($r^2 = 0.99893$). El límite de detección del ensayo para la testosterona fue de 0.05 ng/ml.

8.0 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico del análisis histopatológico y del índice de Johnsen se realizó mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía; mientras que la concentración plasmática de testosterona, se realizó mediante un análisis de varianza ANOVA de dos vías, seguida la prueba post hoc de Newman Keuls. El nivel de significancia se fijó en $p < 0.05$.

9.0 RESULTADOS

9.1 EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO EN LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE TESTOSTERONA.

La concentración sérica de testosterona en cada grupo experimental se muestra en la figura 5. La concentración de testosterona en los machos del grupo control, sin acceso a cópula (ctr s/cop) fueron entre 2 y 3 ng/ml. En los machos del grupo control, con acceso a cópula (ctr c/cop), las concentraciones séricas de testosterona fueron significativamente mayores que en los machos de los grupos de estrés, con y sin acceso a cópula (str c/cop y str s/cop) ($p < 0.01$).

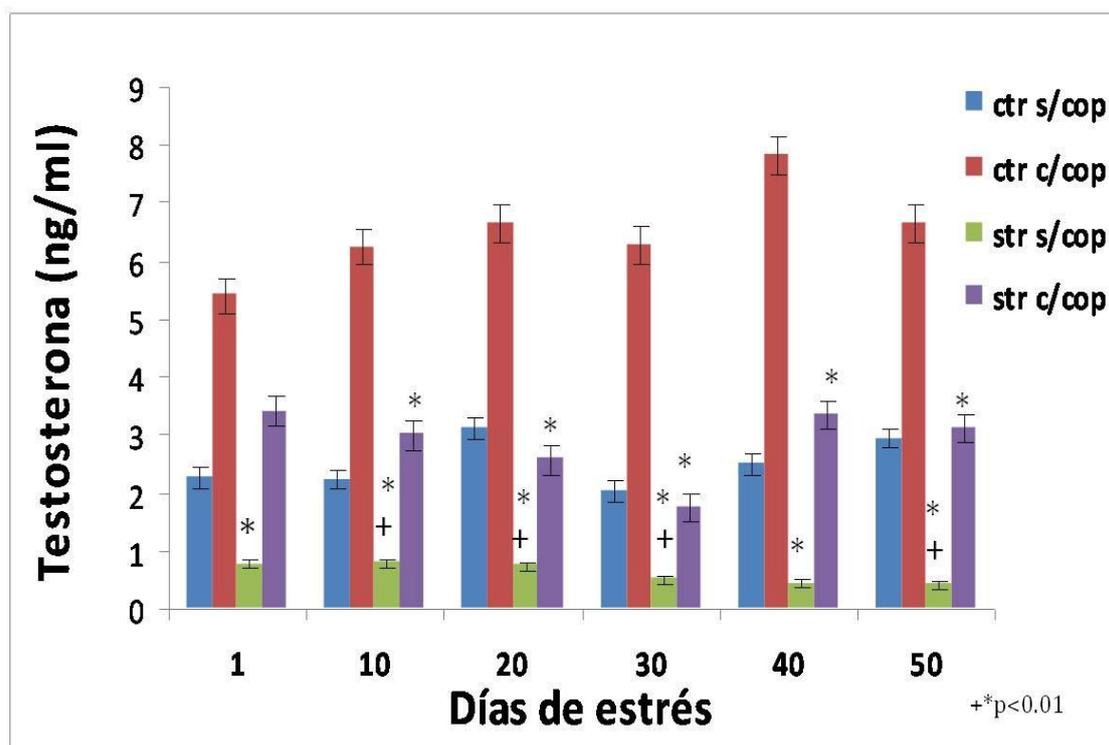


Figura 5. Concentración sérica de testosterona en machos control y estresados crónicamente, a los que se les permitió copular o no con hembras receptoras. Los datos se muestran como $X \pm E.E.$ * $p < 0.01$, se analizaron con una ANOVA de dos vías, seguida por la prueba post hoc Newman-Keuls, con nivel de significancia de +* $p < 0.01$.

En el grupo de los machos de str c/cop, la concentración de testosterona fué similar a la concentración observada en los machos ctr s/cop. Los valores observados fluctuaron entre 2 y 3 ng/ml. La concentración de testosterona en el grupo de los machos de str s/cop, oscilaron entre 0.5 y 1.0 ng/ml, esta concentración de testosterona sérica fue significativamente menor en comparación con los machos ctr s/cop, ctr c/cop y str c/cop ($p < 0.01$). Este efecto se observó desde el primer día de estrés. Los machos estresados con cópula (str c/cop) presentaron concentraciones mayores de testosterona, en comparación con los machos str s/cop ($+p < 0.01$).

9.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

El análisis histológico de los túbulos seminíferos de los machos control con y sin cópula, mostraron una estructura normal. Como se ilustra en la figura 6A, los túbulos se encuentran rodeados por una capa de células mioides peritubulares que envuelven la superficie externa del epitelio seminífero y forman la lámina basal, esta lámina separa el epitelio seminífero del espacio intersticial, en donde se encuentran las células de Leydig. El epitelio seminífero mostró una población normal de las células. Como se muestra en la figura 6B, las espermatogonias (Es) se localizan en la base del túbulo, los espermacitos primarios (Ep) se encuentran en la parte media y las espermatidas redondas (Er) y alargadas (Ea) muy cerca del ápice del epitelio seminífero, mostrando así una progresión en el desarrollo de menor a mayor maduración de las células germinales y cómo éstas se van desplazando hacia el lumen del túbulo (Amann, 1970), donde son liberadas como espermatozoides (Jonhson, et al.,

2008). Estos túbulos se encuentran en el estado VII del ciclo del epitelio seminífero.

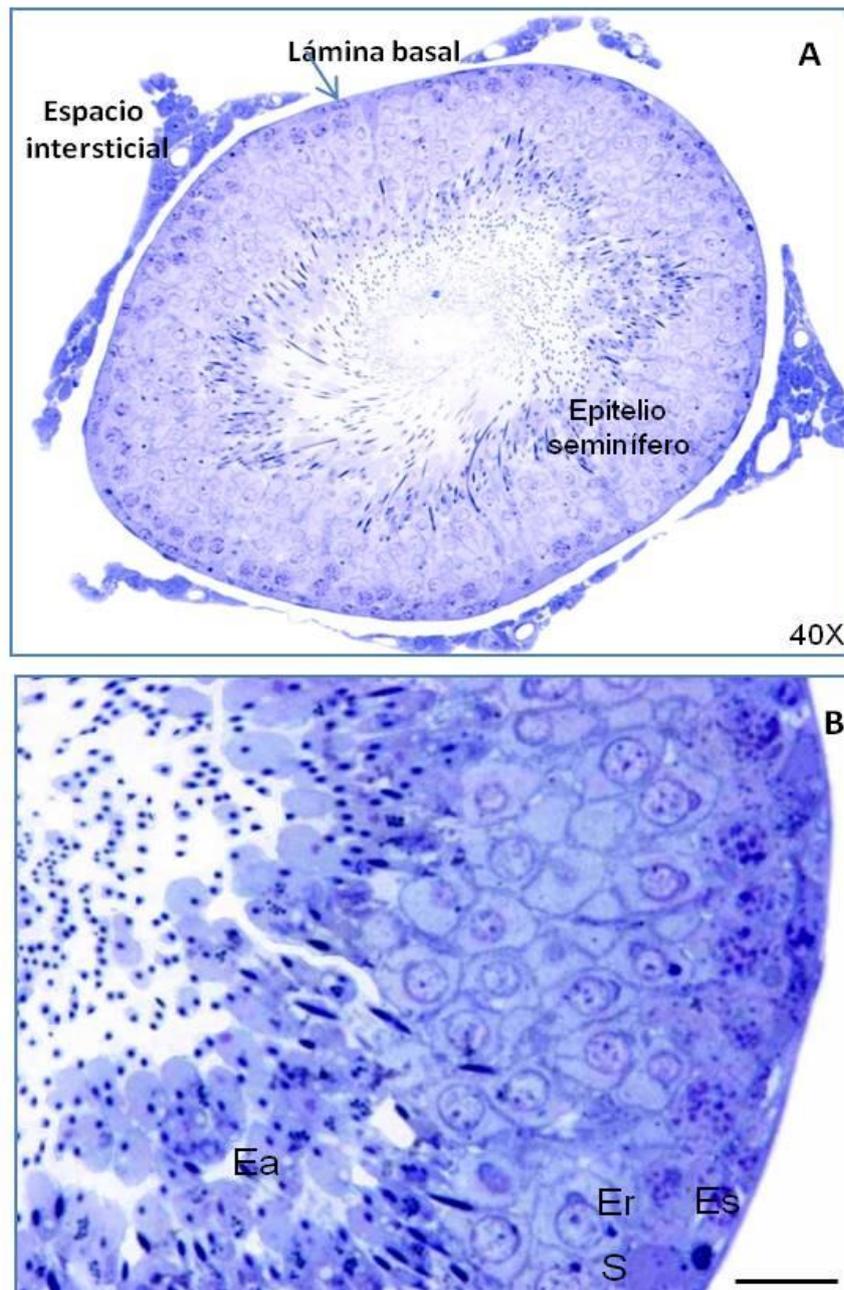


Figura 6. En (A) se muestra un túbulo seminífero de rata macho control (visto a 40X); que se encuentra en el estado VII del ciclo del epitelio seminífero, se observa la lámina basal que se encuentra contorneada y sin alteraciones. En (B) se muestra las células del epitelio seminífero, el cual está constituido por espermatogonias (Es), espermatocitos primarios (Ep), espermatidas redondas (Er) y alargadas (Ea). Las células de Sertoli (S), forman parte importante del epitelio seminífero (Barra: 17 μ m).

El análisis histológico de los testículos de los machos del grupo de str c/cop, se ilustra en la figura 7. Los túbulos seminíferos de este grupo mostraron pérdida masiva de células provocado por el desprendimiento prematuro de las células germinales, observándose túbulos con descamación celular (IH = 1), (figura 7A), otros túbulos mostraron plegamientos en la lámina basal (IH = 1), estos plegamientos provocan que se pierda completamente la contractilidad y la forma del túbulo, el plegamiento se ilustra en la figura 7B.

También, se encontraron túbulos con degeneración de células germinales, ilustrado en la figura 7C, asociado con la descamación celular (IH = 3); estas células presentaron alteraciones en la membrana celular, la cual se observó plegada o sin forma; asimismo, presentaron núcleos profundamente teñidos y con la cromatina completamente condensada. Es probable que las Er y Ea así como los espermatoцитos primarios fueran las células más afectadas por la degeneración.

El análisis histológico de los túbulos seminíferos de los machos de str s/cop, presentaron una descamación celular más severa ilustrada en la figura 8A; en estos túbulos se observaron pocas células germinales (IH=4); otros túbulos presentaron descamación de células germinales localizadas en el lumen del túbulo (IH=1) como se observa en la figura 8B. En este mismo grupo, se observaron túbulos seminíferos que presentaban picnosis celular (IH=3), la cual se caracterizó por la formación de cuerpos picnóticos (CP). Como se observa en la figura 8B, la picnosis involucró principalmente a los espermatoцитos primarios; debido a que, estos se observaron con núcleos intensamente teñidos por el azul de toluidina. Asociado a está picnosis se observaron enormes vacuolas (V) (IH=2), las cuales se caracterizaron por la

formación de grandes espacios vacíos, en donde probablemente se encontraba una célula germinal o de Sertoli.

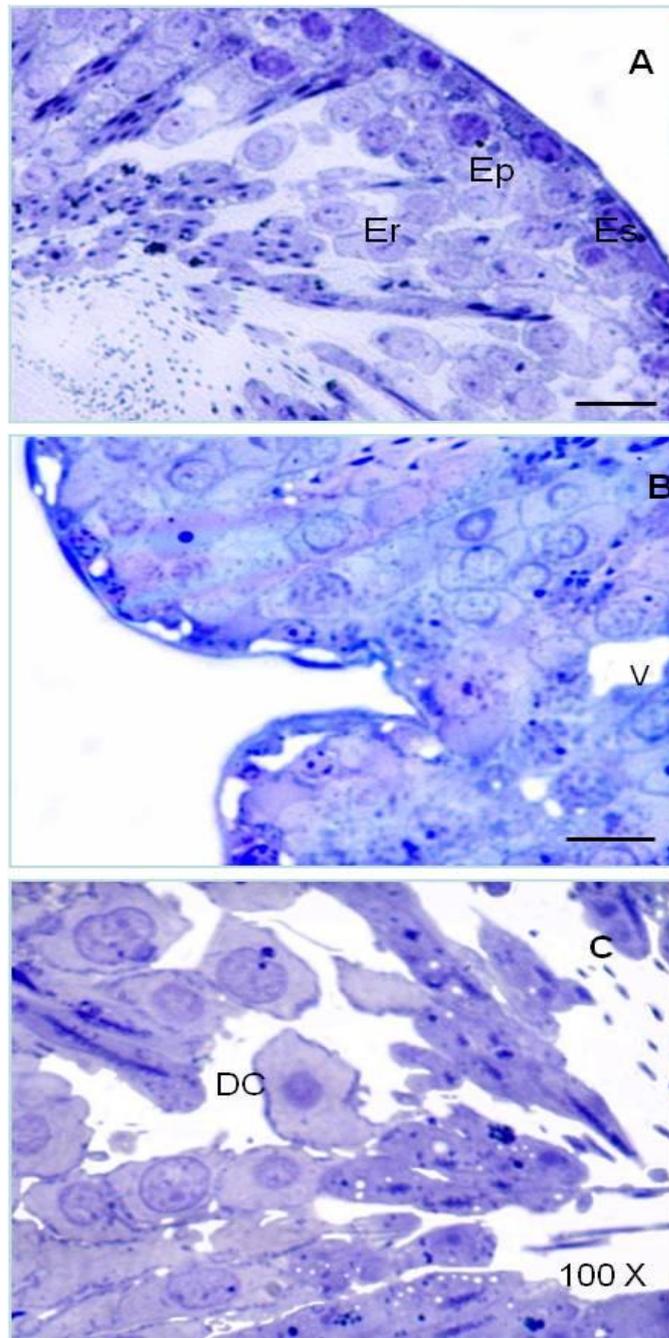


Figura 7. Túbulos seminíferos de testículos de machos estresados con acceso a cópula (str c/cop). En A (estado VII del ciclo del epitelio seminífero) se observa el desprendimiento de células germinales (barra: 17 μ m); el plegamiento de la lámina basal y vacuolas (V) se muestra en B (barra: 17 μ m) y la degeneración de células germinales (DC) se ilustra en C (visto a 100X).

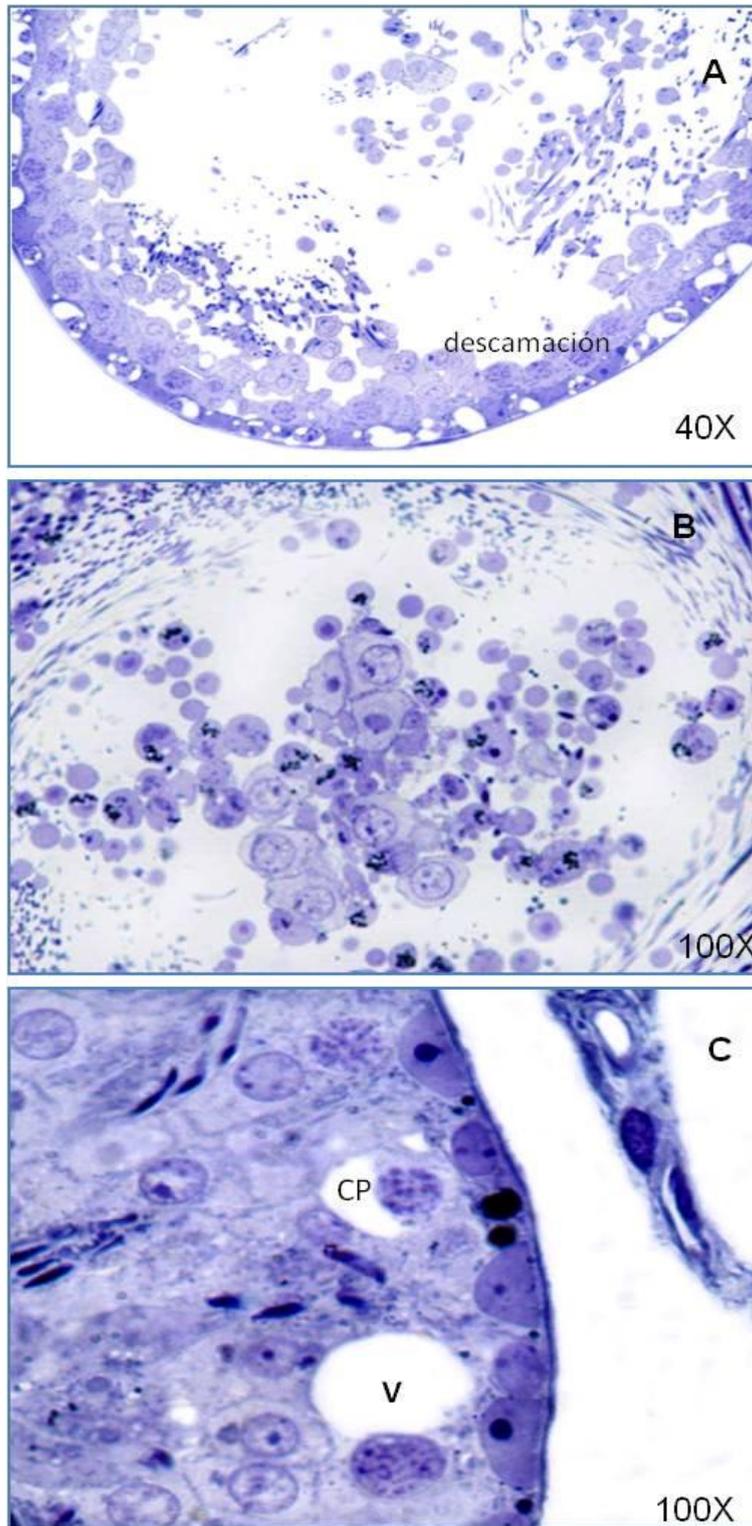


Figura 8. Túbulos seminíferos de testículo de los machos estresados sin acceso a cópula (str s/cop). Se observaron túbulos con gran cantidad de células germinales descamadas, vistos como túbulos casi vacíos (A) (visto a 40X); descamación de células germinales (B) (visto a 100X) en el lumen del túbulo, así como cuerpos picnóticos (CP) y vacuolas (V) en C (estado VI del ciclo del epitelio seminífero) (visto a 100X)

9.3 ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO

Durante la evaluación del IH de los túbulos seminíferos de ambos grupos de machos control, no se observaron alteraciones histopatológicas importantes. En la figura 9 se muestra que los machos del grupo ctr s/cop presentaron un IH igual a 0.91; mientras que, los machos del grupo ctr c/cop presentaron un IH igual a 0.95. Los machos de estos grupos no presentaron daño testicular. En el análisis de los testículos de los machos del grupo de str s/cop se obtuvo un IH de 1.97, significativamente mayor que el IH en los testículos de los machos de los grupos ctr s/cop y ctr c/cop.

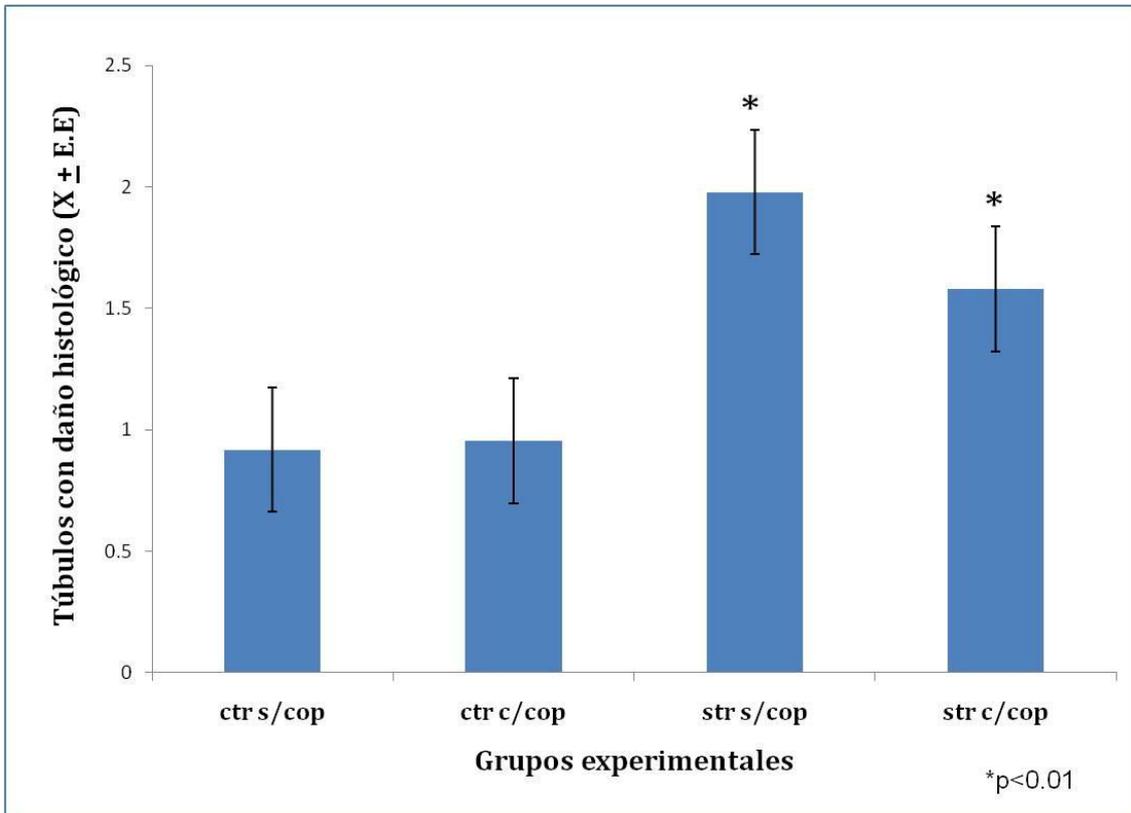


Figura 9. Índice histopatológico en los diferentes grupos experimentales. Los testículos de los machos estresados, con y sin acceso a cópula presentaron índices histopatológicos significativamente mayores que, los testículos de los machos control. Los datos se muestran como $X \pm E.E.$, se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc Newman-Keuls, con nivel de significancia de $*p<0.01$.

En la figura 9, se muestra que este grupo presentó el mayor daño testicular. Mientras que, el grupo de str c/cop presentó un IH igual a 1.57, presentando un aumento significativo con respecto a los grupos control ($p < 0.001$). El daño testicular de estos machos fue ligeramente menor a los machos de str s/cop.

9. 4 ÍNDICE DE JOHNSEN

Los túbulos de los machos de los grupos ctr s/ cop y ctr c/cop presentaron un grado de desarrollo y diferenciación celular normal. En la figura 10 se muestra que los machos del grupo ctr s/cop obtuvieron un IJ igual a 9.16; mientras que los machos del grupo ctr c/cop presentaron un IJ igual a 9.17.

En los machos del grupo de str s/cop, se observó un IJ igual a 8.44, siendo este grupo el que presentó el grado de desarrollo y diferenciación celular más bajo, en comparación con los dos grupos de machos ctr s/cop y ctr c/cop ($p < 0.001$).

Por otro lado, los machos del grupo de str c/cop, presentaron un IJ promedio de 8.77. En la figura 10 se muestra que este grupo presentó una disminución significativa en el desarrollo y diferenciación celular, comparado con ambos grupos de machos control ($p < 0.01$). El desarrollo de las células del epitelio seminífero de este grupo fue ligeramente mayor que el grupo de los machos de str s/cop.

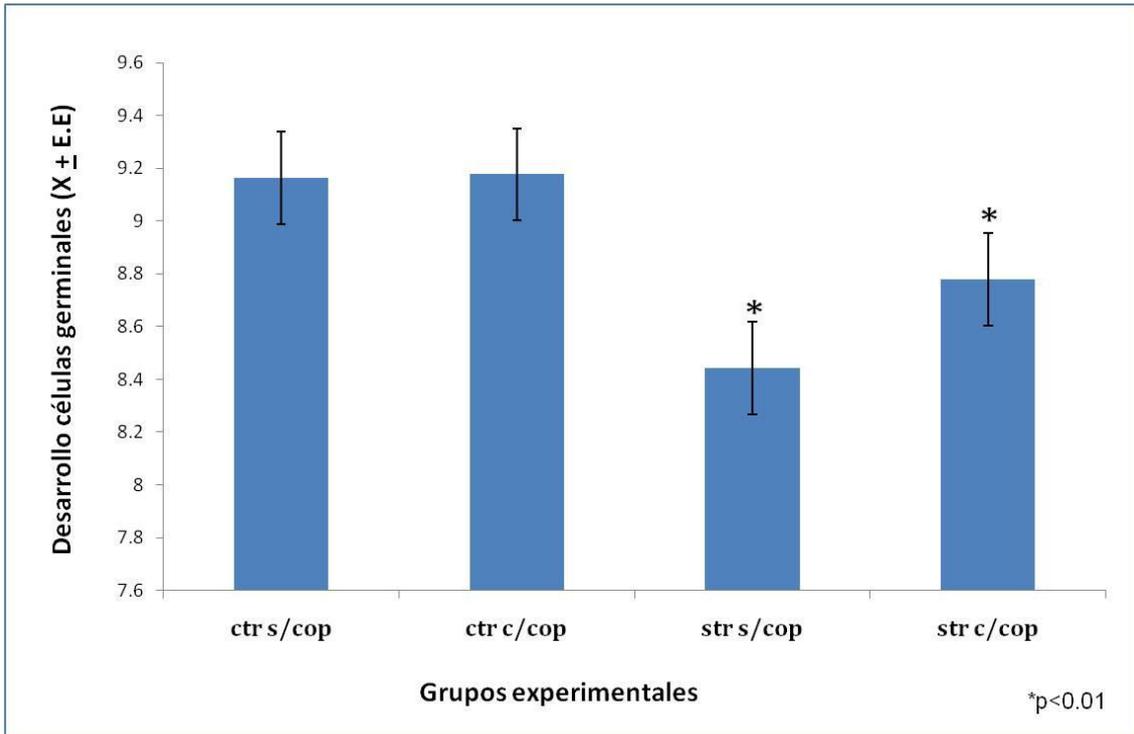


Figura 10. Muestra el efecto del estrés crónico en el desarrollo y diferenciación de las células germinales del epitelio seminífero de las ratas macho. El análisis del índice de Johnsen muestra que los machos de str s/cop y str c/cop, presentaron menor desarrollo y diferenciación celular, en comparación con los machos ctr s/cópula y ctr c/cop, los cuales presentaron mayor desarrollo y diferenciación celular. Los datos se muestran como $X \pm E.E.$ y se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls, con nivel de significancia de $*p<0.01$.

10.0 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se mostró que la exposición de los machos a estrés crónico durante 50 días consecutivos causa alteraciones importantes en el epitelio seminífero. En el análisis histomorfológico de los testículos de los machos estresados, con y sin acceso a cópula, se observaron túbulos con descamación celular, la cual involucró principalmente a las espermatidas redondas y alargadas. Estos resultados son similares a lo reportado por Almeida y colaboradores (1998), quienes mostraron que el estrés crónico por inmovilización durante 60 días consecutivos causa disminución en el número de espermatidas maduras y en las células de Sertoli. Estas alteraciones en las células germinales del epitelio seminífero están asociadas con la disminución en la concentración de testosterona (Almeida et al 1998).

Resultados similares se reportaron utilizando un modelo de nado forzado en el que los machos se colocan en un tanque de agua a 32 °C, por periodos de 3 minutos, durante 15 días consecutivos. Si bien este estresor no afecta inmediatamente la fertilidad masculina, sí causa disminución significativa en la producción de espermatidas (Mingoti, et al., 2003). A pesar de que la disminución de las espermatidas con un corto tiempo de exposición al estresor muestra los efectos del estrés en el epitelio seminífero, es necesario que el periodo de tiempo se ajuste a la duración de la espermatogénesis, que en la rata tiene una duración de 49-52 días. Este hecho es importante porque las espermatidas que se desprenden del epitelio seminífero y son liberadas hacia el lumen del túbulo ocasionan que se interrumpa la espermatogénesis en alguno de sus pasos. Además, este desprendimiento celular puede estar relacionado con la disminución en la concentración de testosterona.

En el presente trabajo se observó que la exposición prolongada al estrés causó disminución significativa en las concentraciones séricas de testosterona. Este efecto fue superior en los machos que no tuvieron acceso a cópula con hembras receptivas. Sin embargo, la actividad copulatoria en los machos estresados causó incremento de testosterona, aunque no en la misma proporción que en los machos control. Como se sabe, la actividad copulatoria estimula la secreción de testosterona en machos de diferentes especies de vertebrados (Craigie y Bronson, 1982; Orchinick et al, 1988; Colborn et al, 1991; Retana-Márquez, et al., 2003).

Por otro lado, en los mamíferos, la producción de espermatozoides se lleva a cabo de manera constante y está bien establecido que la espermatogénesis depende principalmente de concentraciones adecuadas de testosterona (O'Donnell, et al., 1994). Esta hormona actúa a través de sus receptores que se encuentran en las células de Sertoli, las cuales son responsables de mantener un adecuado funcionamiento de la barrera hemato testicular (Meng et al., 2005), inducir la meiosis y del desarrollo post-meiótico de las células germinales (Dohle, et al., 2003; Holdcraft y Braun, 2004). Se ha demostrado que la testosterona puede inhibir la apoptosis de las células germinales (Singh, et al., 1995). Existen reportes que sugieren que la testosterona modula la expresión de genes, así como la proliferación y la diferenciación de las células de Sertoli (Dohle, et al., 2003; Holdcraft y Braun, 2004).

Además, se ha reportado que la testosterona es capaz de regular enzimas importantes que participan en la esteroidogénesis de las células de Leydig (Hales, et al., 1987; Shan, et al., 1995). Todas estas funciones pueden

ser suprimidas o inhibidas por el estrés. Estudios realizados en ratones knock-out que carecen del gen del receptor a andrógenos, muestran alteraciones en la expresión de varias enzimas que son importantes para la esteroidogénesis, así como arresto en la espermiogénesis, principalmente a las espermátidas redondas (Xu, et al., 2007). Adicionalmente, se ha propuesto que la testosterona es un factor autocrino que puede regular su propia síntesis (Xu, et al., 2007).

La testosterona tiene un papel preponderante durante el desarrollo de la espermatogénesis, ya que participa de manera específica en la conversión de espermátidas redondas que se encuentran en el fase 7 y trascienden a la fase 8 de la espermiogénesis. Es probable que la disminución de testosterona, por efecto del estrés, pueda afectar esta conversión, y provocar el desprendimiento prematuro de estas células impidiendo que las espermátidas continúen con el proceso de elongación (O'Donnell et al 1994; Sofikitis y cols, 1999) interrumpiéndose así el desarrollo de la espermiogénesis.

El desprendimiento de las espermátidas redondas también podría deberse a que estas células pierdan contacto directo con la membrana plasmática de las células de Sertoli (Zirkin, 1998). Se sabe que las células de Sertoli presentan uniones intercelulares, con las espermatogonias, los espermatocitos y las espermátidas redondas (Russel, 1977, 1993), algunas de estas uniones parecen contener caderinas y cateninas, las cuales son sintetizadas por las células de Sertoli.

Estas uniones son importantes blancos de la acción hormonal, por lo que, es probable que la disminución de testosterona provoque que las células de Sertoli no puedan sintetizar estas moléculas de adhesión; dicha síntesis

parece ser dependiente tanto de testosterona como de FSH (Perryman, et al., 1996). El desprendimiento prematuro de células germinales observado en el presente trabajo, podría estar relacionado con la disminución de estas uniones celulares, ya que las N-caderinas tienen un papel importante en el mantenimiento de la estructura del tejido testicular y en la arquitectura celular. La disminución en la elaboración de estas moléculas, puede provocar que se pierdan estas uniones y que las espermatidas sean desprendidas hacia el lumen del túbulo seminífero o que sean fagocitadas por las células de Sertoli (Sofikitis, et al., 2006).

Una de las consecuencias de la descamación podría ser la degeneración de las células germinales, como se observó en el epitelio seminífero y que, al parecer, eran espermatidas redondas o alargadas, desprendidas del epitelio seminífero. Es probable que estas células, al momento de perder todo contacto con la membrana de las células de Sertoli, debido a la pérdida de las uniones intercelulares, hayan perdido acceso a las señales hormonales y de crecimiento necesarias para continuar con su proceso de maduración.

Esta hipótesis se apoya en estudios que han reportado la presencia de células germinales en proceso de degeneración cuando la testosterona disminuye por efecto de la hipofisectomía o por inmunoneutralización de LH, esto en ratas macho adultas (Dym y Madhwa, 1977). Asimismo, se ha reportado que la disminución de gonadotropinas puede provocar la muerte por apoptosis de las células germinales, particularmente en los estados VI y VII de la espermatogénesis (Russell y Clermont, 1977; Sinha y Swerdloff, 1999, Kim et al., 2001). Se ha demostrado que la supresión de testosterona conduce a la

retención anormal de espermátidas en el paso 19 (Russell y Clermont, 1977; Kerr, et al., 1993). Esta retención es uno de los cambios anormales más tempranos y sutiles asociados con daño en la espermatogénesis (Kerr, et al., 1993).

Los testículos de los machos estresados a los que no se les permitió copular con hembras receptivas mostraron un mayor daño en el epitelio seminífero en comparación con los testículos de los machos estresados que si copularon. Esto, aunado al hecho de que la concentración de testosterona en los machos que copularon fue mayor que en los machos que no copularon, sugiere que la testosterona podría proteger de manera parcial pero no totalmente al epitelio testicular contra los efectos del estrés. Esto podría explicar en parte el hecho de que el daño testicular causado por el estrés fue ligeramente menor en los machos que copularon en comparación con los machos estresados que no tuvieron acceso a cópula. No obstante, la testosterona no protegió totalmente, ya que el grado de daño testicular observado en los túbulos seminíferos de ambos grupos no fue significativamente diferente. Por tanto, puede concluirse que el incremento de testosterona debido a la ejecución de la cópula puede disminuir parcialmente el daño testicular causado por el estrés

La disminución de la testosterona plasmática observada en los machos estresados que no tuvieron acceso a cópula podría explicar las alteraciones observadas en los espermátocitos primarios del epitelio seminífero. Dichas alteraciones se evidenciaron por la presencia de picnosis. La picnosis se debe a la formación de hebras de DNA rotas o fraccionadas. Estos resultados son acordes con lo reportado en otros estudios en los que se ha observado que la

disminución en la secreción de testosterona, ocasiona muerte celular de espermatocitos primarios en los estados de paquiteno y diploteno. Estas células germinales son las que con mayor frecuencia muestran características de muerte celular, éste acontecimiento podría estar asociado con la interrupción de la metafase meiótica que provoca una sinapsis incompleta de la meiosis (Francavilla, et al., 2002).

La fragmentación de la cromatina en células germinales ha sido observada también en testículos sometidos a hipotermia leve, en el que el escroto se expone a temperatura de 10 ° C (Blanco-Rodriguez y Martínez-García, en 1996). Lo mismo se ha reportado en situaciones de estrés por hipotermia leve, la cual provoca la interrupción de la espermatogénesis, conduciendo así a la infertilidad (Yavetz, et al., 1992). La formación de cuerpos picnóticos observado en las células del epitelio seminífero de los machos estresados sin acceso a cópula, podría estar relacionado con procesos de muerte celular por apoptosis. Sin embargo, esto deberá ser confirmado en estudios posteriores.

Los resultados del presente trabajo, aunados a los reportados en otros estudios permiten sugerir que los tipos celulares más vulnerables al estrés crónico son las espermátidas redondas y alargadas así como los espermatocitos primarios. Actualmente, se considera que en los testículos la apoptosis de células germinales es un importante mecanismo fisiológico para prevenir la sobrepoblación de células germinales y el número de células que pueden sostener las células de Sertoli, siendo este mecanismo un punto importante para el desarrollo normal de la espermatogénesis. Los mecanismos moleculares y celulares involucrados en este proceso parecen involucrar la

generación de especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden inducir muerte celular por apoptosis. El estrés oxidativo puede ser un factor importante que pudiera estar relacionado con diversas etiologías que provocan infertilidad en diferentes especies de mamíferos machos, incluyendo el hombre (Aitken y Roman, 2008).

Con respecto a esto, algunos estudios han demostrado que la disminución en la testosterona intratesticular, causada por la ciclofosfamida puede provocar supresión de la expresión de enzimas antioxidantes, tales como: la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y la catalasa, lo cual provoca daño peroxidativo, así como la interrupción de la espermatogénesis y un aumento en la incidencia de apoptosis de las células germinales (Chainy, et al., 1997). Estos efectos inhibitorios pueden ser revertidos por la administración de gonadotropinas exógenas, las cuales elevan la concentración de testosterona intratesticular disminuyendo así el daño peroxidativo (Chainy, et al., 1997; Aitken y Roman, 2008).

Otro hallazgo importante fue que el estrés crónico provoca disminución en el desarrollo y diferenciación de las células germinales. Una proporción importante de túbulos seminíferos presentaron espermátidas sin ningún signo de diferenciación, así como espermatogénesis incompleta. Estos hallazgos son congruentes con otros estudios realizados *in vitro*, en los que se evaluó el efecto del congelamiento directo de testículos de ratas a 0 °C por 1 hora. Este estresor ocasiona la pérdida importante, parcial o total de células germinales, quedando solo células de Sertoli. En estas condiciones la espermatogénesis no puede restablecerse, debido a que las espermatogonias tronco son completamente destruidas. En cambio, si los testículos se exponen hipotermia

leve (de 2 a 4 °C), las espermatogonias logran sobrevivir al congelamiento, y la espermatogénesis se restablece 24 días después de finalizar el estímulo (Gronsky, 1930; Mcdonald y Harrison, 1954). Esto es importante porque implica que, al no ser dañadas las espermatogonias durante el estrés, éstas pueden reiniciar nuevos ciclos espermatogénicos en el epitelio seminífero, repoblando nuevamente a los túbulos seminíferos. Conjuntando los resultados de la literatura con los de este trabajo, a pesar de las diferentes metodologías utilizadas, se puede concluir que el estrés crónico causa daño a las células germinales de manera proporcional a la intensidad del estresor y que la espermatogénesis puede continuar o bien restablecerse una vez que termina el estrés, siempre y cuando las espermatogonias sobrevivan.

Otra alteración observada en la estructura de los túbulos seminíferos, por efecto del estrés crónico, fue el plegamiento de la lámina basal, ocasionando cambios importantes en la estructura de los túbulos seminíferos. El epitelio seminífero está rodeado de células mioides peritubulares, las cuales expresan receptores a andrógenos. Sin embargo poco se sabe acerca del papel de estas células en la función testicular.

Pocos estudios *in vivo* han demostrado que la pérdida de células mioides puede provocar severas alteraciones en la espermatogénesis (Franca et al., 2000). Esto se debe a que, al parecer las células mioides son controladas por los andrógenos durante la espermatogénesis (Skinner y Fritz, 1985) y que estas células interactúan íntimamente con las células de Sertoli en el establecimiento de la membrana basal que rodea los túbulos seminíferos (SKinner et al., 1985). De esta forma, la testosterona producida en el compartimento intersticial puede ser capaz de entrar al flujo sanguíneo y al

drenaje linfático de los testículos fácilmente, atravesando la barrera por difusión hacia los túbulos seminíferos, promoviendo así la acumulación de andrógenos en los túbulos (Hansson, et al., 1975). El plegamiento de la lámina basal observada en los túbulos seminíferos de los testículos de los machos estresados en este estudio podría explicarse por la disminución en la testosterona plasmática causada por el estrés. Es probable que, al disminuir la testosterona las células mioideas pierdan contractilidad, provocando así alteraciones directas en la forma del túbulo.

La acción biológica de los andrógenos es de suma importancia en el epitelio seminífero. Dicha acción se lleva a cabo a través de los receptores a andrógenos que se encuentran localizados principalmente en las células de Sertoli (Walker, 2003). Las alteraciones observadas en la lámina basal así como en las células germinales, podrían estar asociadas con la disminución en los receptores a andrógenos en estas células blanco por efecto del estrés. Si bien las células germinales carecen de receptores a andrógenos (Johnston, et al., 2001), se ha sugerido que la testosterona puede regular la espermatogénesis a través de la expresión de los receptores a andrógenos que se encuentran en las células de Sertoli, en las células mioideas peritubulares y en las propias células de Leydig (Welsh, et al., 2009).

Como se ha mencionado, la producción de testosterona en el testículo es principalmente controlada por hormonas que son secretadas en los tres niveles del eje HHG. Se ha propuesto que la inhibición del eje HHG se debe a que durante la activación del eje HHA, se produce un aumento en la producción y secreción de la CRH, ACTH y de los glucocorticoides. El aumento en la producción y secreción de estas hormonas en la circulación sistémica,

interfieren directamente con las neuronas hipotalámicas secretoras de GnRH, ejerciendo una enorme supresión en la producción y secreción de gonadotropinas de la hipófisis, provocando cambios que afectan la función reproductiva masculina.

Además de los glucocorticoides, existen otros mediadores que pueden afectar la función del eje HHG. A nivel central, los péptidos derivados de la POMC, tienen un papel importante en la disminución de la secreción de gonadotropinas durante el estrés agudo y crónico. Este efecto tiene un impacto importante en la regulación de la frecuencia y la amplitud del patrón pulsátil de la secreción de LH (Van Vugt, et al 1982). Durante la activación del eje HHA, también son secretadas otras hormonas y varios neurotransmisores en el cerebro, tales como la vasopresina, la oxitocina, las β -endorfinas, la epinefrina, la norepinefrina y la serotonina entre otros (Negro-Vilar, et al., 1987), todos ellos participan en la regulación de la respuesta del estrés.

Se ha demostrado que el estrés crónico causa disminución de la testosterona plasmática, asociada al incremento del glucocorticoide corticosterona en las ratas (Retana-Márquez, et al., 2003). Por ello, es probable, que las alteraciones observadas en el presente trabajo, se deban al aumento de los glucocorticoides plasmáticos por efecto del estrés crónico. Los receptores a glucocorticoides están presentes en varios tipos de células germinales y ocasionalmente se han encontrado en las células de Sertoli (Schultz et al. 1993; Konrad et al. 1998). Los receptores a glucocorticoides al unirse con su ligando forman un complejo que se transloca al núcleo, donde interactúan como homodímeros y se unen a una secuencia específica dentro del DNA, conocida como elemento de respuesta a glucocorticoides (Pratt,

1990). Una vez que están unidos al DNA, pueden regular la expresión de varios genes (Sasagawa, et al., 2001).

Los receptores activados inhiben, a través de interacciones proteína-proteína, algunos factores de transcripción tales como: c-jun/c-fos y NF-kB, los cuales son reguladores positivos de la transcripción de varios genes involucrados en la activación y crecimiento celular (Scheiman, et al., 1995). Además, los glucocorticoides pueden cambiar la estabilidad del RNAm y la traducción de varias proteínas que responden a los glucocorticoides (Tsigos y Chrousos, 2002). De esta forma, se ha propuesto que los glucocorticoides a través de unión con sus receptores, pueden iniciar la apoptosis de células germinales (Sasagawa, et al., 2001).

La administración del glucocorticoide sintético dexametasona, incrementa el número de células germinales apoptóticas en los testículos y que la administración de mifepristona, un antagonista de los receptores a glucocorticoides, disminuye dramáticamente la muerte de células germinales por apoptosis aún después de la aplicación de la dexametasona (Yazawa, et al., 2000). No puede descartarse sin embargo la participación de otros mediadores en los efectos del estrés en el epitelio testicular, tales como los péptidos opioides que son liberados por las propias células de Leydig durante el estrés (Fabbri, 1990) y que parecen tener un papel regulador en la esteroidogénesis en esas células.

Si bien la inhibición en la secreción de testosterona, inducida por el aumento en los niveles de corticosterona. Es responsable, al menos en parte, de las alteraciones observadas en las células germinales del epitelio seminífero de los machos estresados, como ha sido propuesto anteriormente (Kim, et al.,

2001), también es posible que los glucocorticoides ejerzan efectos directos en dichas células. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las células germinales mueren por efecto del estrés aún no está del todo claro. Esto abre la perspectiva de realizar estudios con técnicas más avanzadas y finas en el campo de la biología molecular para determinar el tipo de muerte celular que experimentan las células germinales y los mecanismos involucrados en este proceso.

Está demostrado que el aumento de corticosterona plasmática es capaz de inhibir la esteroidogénesis en las células de Leydig (Hales y Payne, 1989) a través de un mecanismo regulado por el receptor. Efectos similares se han observado en ratas expuestas a estrés agudo por inmovilización. En dicho estudio se demostró que el aumento en la corticosterona plasmática disminuye la capacidad de respuesta de las células de Leydig hacia las gonadotropinas, provocando un bloqueo en la biosíntesis de testosterona aún en presencia de niveles normales de LH (Chapernet, et al., 1982).

Las células de Leydig son capaces de inactivar de manera oxidativa a la corticosterona, por medio de la enzima 11 β -hidroxysteroides deshidrogenasa (11 β HSD). Los glucocorticoides pueden ser regulados por esta enzima, la cual presenta dos isoformas la 11 β HSD-1 (tipo I), que es una oxidoreductasa dependiente de NADP⁺/NADPH. La 11 β HSD-1 se encarga de catalizar la conversión de los 11 β -hidroxilesteroides (como la corticosterona) a los 11 β -cetoesteroides (tales como la 11-dehidrocorticosterona, 11DHC). La 11 β HSD-2 (tipo II) es una oxidasa unidireccional, debido a que tiene una gran capacidad para modular los niveles normales de corticosterona y es capaz de inactivar oxidativamente a la corticosterona, transformándola a su forma biológicamente

inerte la 11DHC (Ge et al, 2005). Por lo tanto, es posible que los efectos adversos del estrés en las células de Leydig ocurran cuando su capacidad de inactivación oxidativa es excedida por el incremento en la concentración intracelular de los glucocorticoides. De esta manera, es probable que la excesiva exposición a la corticosterona contribuya potencialmente a la disminución de los niveles plasmáticos de testosterona durante el tiempo de exposición al estrés (Hui-Bao, et al., 2002).

Los glucocorticoides liberados durante el estrés son también capaces de suprimir la secreción de GnRH y de gonadotropinas a nivel de hipotálamo y de la hipófisis respectivamente (Baldwin y Sawyer. 1974), causando así la disminución en la secreción de testosterona en los machos estresados (Rivest y Rivier, 1991; Almeida, et al., 1998; 2000; Demura, et al., 1989). Al mismo tiempo, la corticosterona ejerce un efecto inhibitorio directo en las células de Leydig disminuyendo su sensibilidad a la LH y a la gonadotropina coriónica humana (hCG), a través de la reducción en los receptores testiculares a estas hormonas (Bambino y Hsueh, 1981). Además de la testosterona, la FSH también es necesaria para mantener la espermatogénesis (Steinberger, 1971; McLachlan et al, 1996), lo que hace más complejo el mecanismo preciso por el cual el estrés crónico inhibe la secreción de testosterona (Andersen, 2004).

10.0 CONCLUSIONES

El estrés crónico por 50 días consecutivos causa la supresión de testosterona en el plasma.

La disminución de testosterona parece ser parcialmente responsable de alteraciones importantes en el epitelio seminífero, afectando el desarrollo de la espermatogénesis y la función testicular.

La actividad copulatoria parece disminuir ligeramente los efectos nocivos del estrés en el epitelio seminífero de la rata, al incrementar la secreción de testosterona en los animales estresados.

11.0 BIBLIOGRAFIA

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

Almeida, A.S., Anselmo-Franci, J. A., Rosa-e Silva, A. A. M., Lamano-Carvalho, T. L. (1998). *Decreased Spermatogenic and androgenic testicular Functions in adult rats submitted to immobilization-induced stress from prepuberty*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31: 1443 – 1448.

Almeida, A.S., Petenusci, S. O., Franci, J. A., Rosa-e Silva, A. A. M., Lamano-Carvalho, T. L. (2000). *Chronic immobilization-induced stress increases plasma testosterone and delays testicular maturation in pubertal rats*. *Andrologia* 32: 7-11

Amann, R. P. (1970). *Sperm production rates*. In: Johnson, A. D., Gomez, W. R., Van Demark, N. L. (Eds), *The Testis*. Vol. 1. Academic Press Inc., New York, pp 433-482.

Andersen, M. L., Bignotto, M., Machado, R. B, Tufik, S. (2004). *Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses my male rats*. *Braz. J. of Med. and Biol. Reprod.* 37: 791 – 797.

Andersson, S., Geissler, W. M., Wu, L., Davis, D. L., Grumbach, M. M. (1996). *Molecular genetics and pathophysiology of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency*. *Endocrinol. Metab. Clin.* 81: 130 – 136.

Armstrong D. (1986). *Environmental stress and ovarian function*. *Biol. Rep.* 34: 29-39.

Ascoli, M., Fanelli, F., Segaloff, D. L. (2002). *The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective*. *J. of Endocrinol. Rev.* 23: 141 – 174.

Baldwin, D. M., Sawyer, C. H. (1974). *Effects of dexamethasone on LH release and ovulation in the cyclic rat*. *J. of Endocrinol.* 94:1397-1403.

Bambino, T.H., Hsueh, A. J. E. (1981). *Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro*. *J. of Endocrinol.* 108: 2142 – 2148.

Bartlett, J. M. S., Weinbauer, G. F. Nieschlag, E. (1989). *Differential effects of FSH and testosterone on the maintenance of spermatogenesis in the adult hipophysectomized rat*. *J. of Endocrinol.* 121: 49 – 58.

Bidzinska, B., Petraglia, F., Angioni, S., Genazzani, A. D., Riscuolo, M., Ficarra, G., Gallinelli, A., Trentini, G. P., Genazzani, A. R. (1993). *Effect of different chronic intermittent stressor and acetyl-L-carnitine on hypothalamic beta-endorphin and GnRH and on plasma testosterone levels in male rats*. *Neuroendocrinol.* 57: 985 – 990.

- Billig, H., Furuta, I., Rivier, C., Tapanainen, J., Parvinen, M., Hsueh, A. J. W. (1995). *Apoptosis in testis germ cell: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages*. *Endocrinol.* 136: 5 – 12.
- Blanco-Rodriguez, J., Martínez-García, C. (1997). *Mild Hypothermia induces apoptosis in rat testis at specific stages of the seminiferous epithelium*. *J. of Androl.* 18(5): 535 – 539.
- Blanco-Rodriguez, J., Martínez-García, C. (1996). *Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: assesment of cell types that exhibit the capability to undergo apoptosis during spermatogenesis*. *Cell Prolif.* 29: 13 – 31.
- Briski, K. P., Sylvester, P. W. (1994). *Antagonism of type II but not type I glucocorticoid receptors results in elevated basal luteinizing hormone release in male rats* *Neuroendocrinol.* 60: 601 – 608.
- Chainy, G. B., Samantaray, S., Samanta, L. (1997). *Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system*. *Androl.* 29: 343 – 349.
- Charpenet, G., Taché, Y., Bernier, M., Ducharme, J., Collu, R. (1982). *Stress-induced testicular hyposensitivity to gonadotropin in rats. Role of the pituitary gland*. *Biol. Reprod.* 27: 616 – 623
- Chen, C. Y., Mruk, D. D. (2010). *The biology of spermatogenesis : the past, present and future*. *Phil. Trans. R. B.* 365 : 1459 – 1463.
- Chowdhury, A., Steinberger, E. (1970). *Early changes in the germinal epithelium of rat testes following exposure to heat*. *J. Reprod. Fertil.* 22: 205 – 212.
- Chrousos, G. P., Loriaux, L. D., Gold, P. W. *The concept of stress and its historical development. In Chrousos, G. P., Loriaux, L. D., Gold, P. W. Mechanisms of physical and emotional stress.* (1988). *Advances in experimental medicine and biology*. New York: Plenum Press; Vol. (245): 3 – 7.
- Chrousos, G. P., Gold, P. (1992) *The concepts of stress system disorders: overview of behavioral and physical homeostasis*. *JAMA* 267(9): 1244 – 1252.
- Chrousos, G. P. (1992). *Regulation and dysregulation of the hypothalamic – pituitary – adrenal axis. The corticotropin releasing hormone perspective*. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 21: 833 – 858.
- Clermont, Y. (1972). *Kinetics of spermatogenesis in mammals*. *Physiol. Rev.* 52: 198 – 204.
- Colborn, D. R., Thompson, D. L., Capehart, J. J., White, K. L. (1991). *Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings*. *J. Animal. Sci.* 69: 2556 – 2562.

- Collu, R., Gibb, W., Ducharme, G. R. (1984). *Role of catecholamines in the inhibitory effect of immobilization stress on testosterone secretion in rats*. Biol. Reprod. 30: 416 - 422.
- Craigien, W., Bronson, F. H. (1982). *Deterioration of the capacity for sexual arousal in aged male mice*. Biol. Reprod. 26(5): 869 – 874.
- Cui, K. H. (1996). *The effect of stress on semen reduction in the marmoset monkey (C. Jacchus)*. H. Reprod. 11: 568 – 573.
- Cumming, D. C., Wall, S. R., Quinney, H. A., Belcastro, N. A. (1987). *Decrease in serum testosterone levels with maximal intensity swimming exercise in trained male and female swimmers*. Endocrinol. Reprod. 13:31 – 41.
- de Kloet, R. E. (1991). *Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control*. Front. Neuroendocrinol. 12: 95 – 164.
- de Kretser, D. M., Kerr, J. B. (1994) *The Cytology of the Testis*. In : Knobil, E., Neill, J. (eds). *The physiology of reproduction*. 2^o ed. Raven Press, Ltd., New York. Pp 837 – 932.
- de Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., Wreford, N. (1998). *Spermatogenesis*. Hum. Reprod. 13(1): 1 – 8.
- De Martino, C., Francavilla, S., Fabbrini, A., Accinni, L. (1989). *Mammalian spermatogenesis and its disorders in man*. In Motta, P. M., Van Blerkom, J. (eds). *Ultrastructure of human gametogenesis and Early embryogenesis*. K. Aca. Publ. Basel. 1 – 32.
- De Wied, D. (1980). *Pituitary-adrenal system hormones and behavior*. In: Selye, H. (Ed). *Selye's guide to stress research*. Vol. 1 Van Nostrand Reinhold. New York, pp 252 – 279.
- Demura, R., Suzuki, T., Nakamura, S., Komatsu, H., Odagiri, E., Demura, H. (1989). *Effect of immobilization stress on testosterone and inhibin in male rats*. J. of Androl. 10: 21 – 213.
- Dhole, G. R., Smit, M., Weber, R. F. (2003). *Androgen and male fertility*. World J. Urol. 21: 341 – 345.
- Dubey, A. K., Plant, T. M. (1985). *A suppression of gonadotropin secretion by cortisol in castrated male rhesus monkeys (Macaca mulatta) mediated by the interruption of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release*. Biol. Reprod. 33 (2): 423 – 431.
- Dufau, M. L. (1997). *The luteinizing hormone receptor*. In: Payne, A. H., Hardy, M. P. Russell, L. D. *The Leydig cell*. Vienna, IL: Cache River Press; 333 – 350.

- Dym, M., Madhwa Raj, H. G. (1977). *Response of adult Sertoli rat cells and Leydig cells to depletion of luteinizing hormone and testosterone*. Biol. Reprod. 17: 676 – 696.
- Eacker, S. M., Agrawal, N., Qian, K., Dichek, H. L., Eun-Yeung, G., Lee, K., Braun, R. E. (2008). *Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis*. Mol. Endocrinol. 22(3): 623 – 635.
- Evain, D., Morera, A. M., Saez, J. M. (1976). *Glucocorticoid receptors in interstitial cells of the rat testis*. J. of Ster. Bioch. 7: 1135 – 1139.
- Fabbri, A. (1990). *The role and regulation of testicular opioids*. Trends in Endocrinol. and Meabt. 1(3): 117 – 120.
- Fenster, L., Katz, D. F., Wyrobek, A. J., Pieper, C., Rempel, D. M., Oman, D., Swan, S. H. (1997). *Effects of psychological stress on human semen quality*. J. Androl. 18: 194 – 202.
- Franca, L. R., Leal, M. C., Sasso-Cerri, E., Vasconcelos, A., Debeljuk, L., Russell, L. D. (2000). *Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells*. Biol. Reprod. 63: 1403 – 1412.
- Franca, S., D'Abrazio, P., Cordeschi, G., Pelliccione, F., Necozone, S., Ulisse, S., Properzi, G., Franca, F. (2002). *Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis*. Mol. Horm. Reprod. 8(3): 213 – 220.
- Ge, R. S., Hardy, D. O., Catterall, J. F., Hardy, M. P. (1997). *Developmental changes in glucocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase oxidative and reductive activities in rat Leydig cells*. Endocrinol. 138: 5089 – 5095
- Ge, R. S., Dong, Q., Niu, E., Sottas, C. M. O., Catterall, J. F. (2005). *11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 2 in rat Leydig cell: its role in blunting glucocorticoid action at physiological levels of substrate*. Endocrinol. 146: 2657 - 2664.
- Gilbey, M. P., Spyer, K. M. (1993). *Essential organization of the sympathetic nervous system*. Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. 7 (2): 259 – 278.
- Gondos, B. M. D., Zemjanis, E. D., Abraham, T. K., Cockett, M. D. (1970). *Ultrastructural Alterations in the Seminiferous Epithelium of Immobilized Monkeys*. American J. of Pat. 61(3): 497 – 506.
- Gronsky N. (1930). *On the effect of low temperatures on the testes of white rats at local application*. Anat. Anzeiger. 69: 228-238.
- Guo-Xin, H., Qing-Quan, L., Han, L., Syed, A. L., Morris, D. J., Hardy, M. P., Ren-Shan, G. (2008). *Rapid mechanism of glucocorticoid signaling in the Leydig cell*. Steroid. 73: 1018 – 1024.

Hales, D. B., Sha, L. L., Payne, A. H. (1987). *Testosterone inhibits cAMP-induced de Novo synthesis of Leydig cell cytochrome P-450 (17 alpha) by an androgen receptor-mediated mechanism.* J. Biol. Chem. 262: 11200 – 11206.

Hales D. B., Payne, A. H. (1989). *Glucocorticoid-mediated repression of P450scc mRNA and de novo synthesis in cultured Leydig cells.* Endocrinol. 124: 2099-2104.

Hansson, V., Weddington, S. C., McLean, W. S., Smith, A. A., Nayfeh, S. N. French, F. S., Ritzén, E. M. (1975). *Regulation of seminiferous tubular function by fsh and androgen.* J. of Reprod. Fertil. 44: 363 – 375.

Hardy M. P., Sottas, M. C., Renshan, Ge., McKittrick, C. R., Tamashiro, K. L., McEwen, B. S., Haider, S. G., Markham, C. M., Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Sakai, R. R. (2002). *Trends of reproductive hormones in male rats during psychosocial stress: role of glucocorticoid metabolism in behavioral dominance.* Biol. of Reprod. 67, 1750-1755.

Hardy, M. P., Hui-Bao, Gao., Qiang, Dong., Renshan Ge., Qian Wang., Wei Ran Chai., Xing Feng. (2005). *Stress hormone and male reproductive function.* Cell Tissue Res. 322, 147-153.

Haywood, M., Spaliviero, J., Jimenez, M., King, N. J., Handelsman, D. J., Allan, C. M. (2003). *Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone.* Endocrinol. 144: 509 – 517.

Henriksen, K., Kangasniemi, M., Parvinen, M. (1996). *In vitro follicle-stimulating hormone prevents apoptosis and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage specific fashion.* Endocrinol. 132: 2607 – 2613.

Holdcraft, R. W., Braun R. E. (2004). *Rev. Hormonal regulation of spermatogenesis.* International J. of Androl. 27:335–342

Hui-Bao, G., Ming-Han, T., Yan-Qiang, H. Qing-Su, G., Renshan, G., Hardy, M. P. (2002). *Glucocorticoid induces apoptosis in rat Leydig cells.* Endocrinol. 143(1): 130 – 138.

Ishikawa, M., Hara, Ch., Ohdo, S., Ogawa, N. (1992). *Plasma corticosterone response of rats with sociopsychological stress in the communication box.* Physiol. Behav. 52: 475 – 480.

Johnsen, S. G. (1970). *Testicular biopsy score count- a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males.* Hormones 1: 1 – 25. In: Sukhotnik, I., Meyer, G. Natiu, O., Coran, A. G., Voskoboinik, K., Shiloni, E., Mogilner, J. G. (2008). *Effect of allopurinol on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat.* Pediat. Surg. Int. 24: 61 – 66.

Johnson, L., Varner, D. D., Thompson Jr, D. L. (1991). *Effect of age and season on the establishment of spermatogenesis in the horse*. J. Reprod. Fertil., 44: 87 – 97.

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

Johnson, L., Thompson, D. L., Varner, D. D. (2008). *Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis*. Anat. Reprod. Sci. 105: 23-51.

Johnston, D. S., Russell, L. D., Friel, P. J., Griswold, M. D. (2001). *Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation*. Endocrinol. 142: 2405 – 2408.

Justel, N. R., Bentosela, M., Mustaca, A. E. (2009). *Comportamiento sexual y ansiedad*. R. Lat. De Psi. 41 (3): 429 - 444

Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27:137A.

Keller-Wood, M., Dallman, M. (1984). *Corticosteroid inhibition of ACTH secretion*. Endocrinol. Rev. 5 : 1 – 24.

Kerr, J. B., Millar, M., Maddocks, S., Sharpe, R. M. (1993). *Stage-dependent changes in spermatogenesis and sertolli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone*. Anat. Rec. 235: 547 – 559.

Kim, J. M., Ghosh, S. R., Weil, A. C., Zirkin, B. R. (2001). *Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone*. Endocrinol. 142: 3809 – 3816.

Konrad, L., Weber, M-A., Groos, S., Albrecht, M., Aumüller, G. (1998). *Paracrine interaction in testicular somatic cells*. Italian J. of Anat and Embriol. 103(1): 139 – 152.

Krieger, D. (1982). *Cushing's Syndrome*. Monog in end. Berlin: Springer-Verlag; vol. 22.

Kvetnansky, R., Sabban, E. L., Palkovits, M. (2009). *Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches*. Physiol. Rev. 89: 535 – 606.

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

Le Blond, C. P., Clermont, Y. (1952) *Defintion of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat*. Am New York. Acad Sci. 55; 548 – 573. In: Knobil, E., Neil, J. (eds.). *The physiology of reproduction*. (1994). Raven Press, Ltd., New York pp 1242 – 1243.

Levine, S., Goldman, L., Coover, G. D. (1972) *Expectancy and the pituitar-adrenal system*. In: *Physiology, emotion and psychosomatic illness*. CIBA Foundation symposium 8. Amsterdam: Elsevier/Excerpta Medica. 281-291.

Li, S. P. (1991). *Effect of cortisol on testosterone production by immature pig Leydig cells*. J. Ste. Biochem. Biol. 38: 205 – 212.

Málaga, C. Y., Ortiz N. D. A., Hernández-Marín, I., Tovar-José, M., Ayala-Ruíz A. (2005). *Detención de la espermatogénesis*. Gin. Obst. 73: 500 – 508.

McDonald J. and Harrison R. G. (1954). *Effect of low temperatures on rat spermatogenesis*. Ferti. Ster. 5:205-216.

McLachlan, R. I., Wreford, N. G., O'Donnell, L., de Kretser, D. M. (1996). *The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH*. J. of Endocrinol. 148: 1 – 9.

McLachlan, R.I., O'Donnel, L., Meachem, S. J., Stanton, P.G., De Kretser, D.M., Pratis, K., Robertson, D.M. (2002). *Identification of specific sites of hormonal .regulation in spermatogenesis in rats, monkeys and man*. The Endocrine Society. 149 -178.

Meng, J., Holdcraft, R. W., Shima, J. E., Griswold, M. D., Braun, R. E. (2005). *Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 16696 – 16700.

Mieusset , R., Fouda, P. J. Vaysse, P. (1933). *Increase in testicular temperature in case of cryptorchidism in boys*. Vaysse P. Fertil. Ster. 59: 1319–23.

Miller, W. (1988). *Molecular biology of steroid hormone biosynthesis*. Endocrinol. Rev. 9: 295 – 318.

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

Monder, C.; Sakai, R. R.; Miroff, Y., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J. (1994). *Reciprocal Changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: Evidence for a mediating role of testicular 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase*. Endocrinol. 134:1193-1198.

Moralí, G., (1998). *Regulación hormonal de la conducta sexual masculina*. En: Velázquez-Moctezuma, J (1998). Biol. Reprod. UAM-I. 399 – 417.

Munck, A., Guyre, P., Holbrook, N. (1984). *Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions*. *Endocrinol. Rev.* 5: 25 – 44.

Negro-Vilar, A., Johnston, C., Spinedi, E., Valenca, M., Lopez, F. (1987). *Physiological role of peptides and amines on the regulation of ACTH secretion*. *Ann. New. York. Acad. Sci.*512: 218 – 236.

Nelson, W. O. (1951). *Mammalian spermatogenesis effects of experimental cryptorchidism in the rat and non-descent of the testis in man*. *Rec. Prog. Horm. Res.* 6: 29 – 62.

Norman, R. L. (1993). *Effects of corticotrophin-releasing hormone on luteinizing hormone, testosterone and cortisol secretion in intact male rhesus macaques*. *Biol. Reprod.* 49:148 – 153.

O'Donnell, L., McLachlan, R. I., Wreford, N. G., Robertson, D. M. (1994). *Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII-VIII of the rat spermatogenic cycle*. *Endocrinol.* 135: 2608 – 2614.

O'Donnell, L., McLachlan, R. I., Wreford, N. G., de Kretser, D. M., Robertson, D. M. (1996). *Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium*. *Biol. Reprod.* 55: 895 – 901.

Opstad, P.K. (1994). *Circadian rhythm of hormones is extinguished during prolonged physical stress, sleep an energy deficiency in young men*. *Eur. J. Endocrinol.* 131: 56 – 66.

Orchinik, M. P., Licht, M. P., Crews, D. (1988). *Plasma steroid concentrations change in response to sexual behavior in Bufo marinus*. *Horm. Behav.* 22: 338 – 350.

Orr, T. E., Taylor, M. F., Bhattacharyya, A. K., Collins D. C., Mann, D. R. (1994). *Acute immobilization stress disrupts testicular steroidogenesis in adult male rats by inhibiting the activities of 17 α -hydroxylase and 17,20-lyase without affecting the binding of LH/hCG receptors*. *J of Androl.* 15: 302 – 308.

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

Perryman, K. J., Stanton, P. G., Loveland, K. L. (1996). *Hormonal dependency of neural cadherin in the binding of round spermatids to Sertolli cells in vitro*. *Endocrinol.* 137: 3877 – 3883.

Phillips, D.M.; Lakshmi V., Monder C. (1989). *Corticosteroid 11 β -dehydrogenase in rat testis*. *Endocrinol.* 125: 209-216.

- Pratt, W. B. (1990). *Glucocorticoid receptor structure and the initial events in signal transduction*. Prog. Clin. Biol. Res. 322: 119 – 132.
- Prieto-Gómez, B., Velázquez-Paniagua, M. (2002). *Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas*. Rev. Fac. Med. UNAM. 45 (6): 252 – 257.
- Retana-Marquéz, S, Bonilla-Jaime, H., Velazquez-Moctezuma, J. (1998). *Estrés, péptidos opioides y conducta sexual masculina*. Biol. Reprod. UAM – I. 535 – 561.
- Retana-Marquéz, S, Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Martínez-García, R., Velazquez-Moctezuma, J. (2003). *Changes in masculina sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats*. Horm. and Behav. 44: 327 – 337.
- Retana-Marquéz, S, Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Domínguez-Salazar, E., Martínez García, R., Velazquez-Moctezuma, J. (2003). *Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats*. Psychoneuroend. 28: 207 – 227.
- Rivest, S., Rivier, C., (1991). *Effects of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanism*. Biomed. Biochem. 45: 523 – 532.
- Roberts, K. P., Zirkin, B. R. (1991). *Androgen regulation of spermatogenesis in the rat*. In: *The male germ cell: spermatogonium to fertilization*. Robaire B (ed) Ann New York Acad. Sci. 637: 91 – 105.
- Rowley, M. J., Berlin, J. D., Heller, C. G. (1971). *The ultrastructure of four types of human spermatogonia*. Z. Zellforsch. 112: 139 – 157.
- Rusell, L. D. (1977). *Desmosome-like junctions between Sertoli and germ cells in the rat testis*. Am. J. Anat. 148: 301 – 312.
- Russell, L. D. (1993). *Morphological and functional evidence for Sertoli-cell relationships*. In *The Sertoli Cell* (Russell, L.D., Griswold, M.D. Eds.), Cache River Press, Clearwater, FL. pp 40 – 86
- Rusell, L. D., Clermont, Y. (1977). *Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats*. Anat. Rec. 187: 347 – 366.
- Rusell, L.D., Griswold, M.D. (1993). *The Sertoli Cell*. Cache River Press; Clearwater, FL. pp 5 – 7.
- Saki, G., Rahim, F., Alizadeh, K. (2009). *Forced swimming stress effect on sperm fertilization*. J. Horm. Reprod. Sci. 2; 72 – 75.

- Salpolsky, R. M. (1985). *Stress-induced suppression of testicular function in the wild baboon: role of glucocorticoids*. *Endocrinol.* 116: 2273 – 2278.
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C., McEwen, B. S. (1986). *The neuroendocrinology of stress and aging: The glucocorticoid cascade hypothesis*. *Endocrinol. Rev.* 7: 622 – 629.
- Sapolsky, R. M. (ed). (1992). *Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death*. MIT Press, Cambridge, Mass, pp 429.
- Sasagawa, I., Yazawa, H., Suzuki, Y., Nakada, T. (2001). *Stress and testicular germ cell apoptosis*. *Arc. of. Androl.* 47: 211 – 216.
- Schedlowski, M., Flüge, T., Richter, S., Tewes, U., Schmidt, R. E., Wagner, T. (1995). *β – endorphin, but not substance –P, is increased by acute stress in humans*. *Psychoneuroendocrinol.* 20: 103 – 110.
- Scheiman, R. I., Gualberto, A., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A., Baldwin, A. S. (1995). *Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kB by activated glucocorticoid receptors*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 943 – 953.
- Schultz, R., Isola, J., Parvinen, M., Honkaniemi, J., Wikström A. Ch., Gustafsson, J. A., Pelto-Huikko, M. (1993). *Localization of the glucocorticoid receptor in testis an accessory sexual organs of male rat*. *Molecular and cellular Endocrinol.* 95: 115 – 120.
- Selye, H. (1936). *A syndrome produced by diverse noxious agents*. *Nature* 138: 32 – 36.
- Selye, H., (1946). *The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation*. *J. Clin. Endocrinol.* 6: 117 – 230. In: Johnson, E.O., Kamilaris, T. C. Chrousos, G. P., Gold, P. W. (1992). *Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis*. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16, 115 – 130.
- Shan, J., Hardy, D. O., Catterall, J. F., Hardy, M. P. (1995). *Effects of luteinizing hormone (LH) and androgen on steady state levels of messenger ribonucleic acid for LH receptors, androgen receptors, and steroidogenic enzymes in rat Leydig cell progenitors in vivo*. *Endocrinol.* 136: 1686 – 1693.
- Sharpe, R. M (1994) *Regulation of Spermatogenesis*. In: Knobil, E., Neil, J. (eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven. Press, New York, pp. 1395.
- Shetty, J., Marathe, G.K., Dighe, R. R. (1996). *Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat*. *Endocrinol.* 137: 2179 – 2182.
- Singh, J., O'Neill, C., Handelsman, D. J. (1995). *Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice*. *Endocrinol.* 136: 5311 – 5321.

- Sinha Hikim, A. P., Swerdloff, R. S. (1999). *Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis*. J. Reprod.Fertl. 4: 38 – 47.
- Skandhan, K. P., Rajahariprasad, A. (2007). *The process of spermatogenesis liberates significant heat and the scrotum has a role in body thermoregulation*. Med. Hyp. 68: 303 – 307.
- Skinner, M. K., Fritz, I. B. (1985). *Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions*. Proc. Nall. Acad. Sci. U.S.A. 82: 114 – 118.
- Skinner, M. K., Norton, J. N., Mullaney, B. P., Rosselli, M., Whaley, P. D., Anthony, C. T. (1991). *Cell-cell interactions and the regulation of testis function*. In: *The male germ cell: spermatogonium to fertilization*, Robaire B (ed.). Ann New York Acad. Sci. 637: 354 – 363.
- Slaunwhite, W. R, Jr., Samuels, L. T. (1956). *Progesterone as a precursor of testicular androgens*. J. Bio. Chem. 220: 341 – 352.
- Sofikitis, N., Ono, K., Yamamoto, Y., Papadopoulos, H., Miyagawa, I. (1999). *Influence of the male reproductive tract on the reproductive potential of round spermatids abnormally released from the seminiferous epithelium*. Horm. Reprod. 14: 1998 – 2006.
- Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P., Baltogiannis D., Giannakis, D., Pardalidis, N. (2006). *Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis*. J. Ster. Biochem. and Mol. Biol. 109: 323-330.
- Steinberger, E. (1971). *Hormonal control of mammalian spermatogenesis*. Physiol. Rev. 51: 1 – 22.
- Steinberger, E. (1978). *The etiology and pathophysiology of testicular dysfunction in man*. Fertil. Androl. Ster. 29: 481 – 491.
- Sun, Y. T., Irby, D. C., Robertson, D. M., de Kretser, D. M. (1989). *The effects of exogenously administered testosterone on spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats*. Endocrinol. 125: 1000 – 1010.
- Swerdloff, R. S., Wang, C. (1996). *Clinical evaluation of Leydig cell function*. In *The Leydig Cell* (Payne, A. H., Hardy, M. P., Russel, L. D, Eds), Cache River Press, Vienna, IL. 663 – 694.
- Taylor, G., Weiss, J., Rupich, R., (1987). *Male rat behavior, endocrinology and reproductive physiology in a mixed-sex, socially stressful colony*. Physiol. Behav. 39: 429 – 433.
- Tsigos, C., Chrousos G. P. (2002). *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress*. J. of Psych. Res. 53, 865 – 871.

Van Vugt, D. A., Sylvester, P. W., Ayisworth, C. F., Meites, J. (1982). *Counteraction of gonadal steroid inhibition of LH by naloxone*. *Neuroendocrinol.* 34: 274 – 278.

Vigueras-Villaseñor, R. M., Molina-Ortiz, D., Reyes-Torres, G., Santamaría del Ángel, D., Moreno-Mendoza, N. A., García-Cruz, M. E., Cuevas-Alpuche, O., Rojas-Castañeda, J. C. (2009). *Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes*. *Acta Histochem* 111: 127—137

Ville C. A., Solomon E. P., Martin C. E., Martin D. W., Berg L. R., Davis W. P. (1992). *Reproducción Humana en el hombre*. Biol. 2ª. ed. pp. 1092.

Walker, W. H. (2003). *Non-genomic actions of androgen in Sertolli cells*. *Curr. Top. Dev. Biol.* 56: 25 – 53.

Wamsteeker, J. I., Bains, J. S.(2010). *A synaptocentric view of the neuroendocrine response to stress*. *Eur. J. of Neurosci.* 32: 2011–2021.

Watanabe, T., Morimoto, A., Sakata, Y., Wada, M., Murakami, N. (1991). *The effect of chronic exercise on the pituitary-adrenocortical response in conscious rats*. *J. Physiol.* 439: 691 – 699.

Weber, M-A., Groos, S., Hopfl, U., Spielmann, M., Aumüller, G., Konrad, L. (2000). *Glucocorticoid receptor distribution in rat testis during postnatal development and effects of dexamethasone on immature peritubular cells in vitro*. *Androl.* 32: 23-30.

Welsh, M., Sharpe, R. M., Walker, M., Smith, L. B., Saunders, P.T. (2009). *New insights into the role of androgens in Wolffian duct stabilization in male and female rodents*. *Endocrinol.* 150: 2472 – 2480.

Woodward, C., Emery, P. W. (1988). *Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography*. *J. Chrom.* 419: 280 - 284.

Wu, X., Wan, S., Lee, M. M. (2007). *Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development*. *J. of Cell. Physiol.* 213: 429 – 433.

Xu, Q., Lin, H. Y., Yeh, S. D., Wang, R. S., Chen, Y. T., Zhan, C., Altuwajjri, S., Chen, L. M., Chuang, K. H., Chiang, H. S., Yeh, S., Chang, C. (2007). *Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells*. *Endocrinol.* 32: 96 – 106.

Yates, E., Marsh, D., Maran, J. (1980). *The adrenal cortex*. In : Mount-castle, V., ed. *Medical physiol.* 14th ed. St. Louis : C.V. Mosby. 1558-1601.

Yavetz, H., Harash, B., Paz, G., Yogev, A., Jaffa, A., Lessing, J. B. (1992). *Homonnai ZT. Cryptochidism: incidence and sperm quality in infertile men*. *Androl.* 24: 293 – 297.

Yazawa, T., Sasagawa, I., Nakada, T. (2000). *Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats*. Horm. Reprod. 15: 1917 – 1920.

Yazawa, T., Yamamoto, T., Kubokawa, K., Nakayama, Y., Fujimoto, K., Ito, R., Shin-ichi, A. (2001). *Cold suppression of follicle-stimulating hormone activity on proliferation and survival of newt spermatogonia*. Gen. and Comp. Endocrinol. 122: 296 – 303.

Yin, Y., Hawkins, K. L., DeWolf, W. C., Morgentaler, A. (1997). *Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice*. J. Androl. 18: 159 – 165.

Zhang, Z., Short, T. Meehan, D. M., de Kretser, D. M., Renfree, M. B., Loveland, K. L. (2004). *Functional analysis of the cooled rat testis*. J. of Androl. 25(1): 57 -68.

Zirkin, B. R. (1998). *Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH*. Cell. Dev. Biol. 9: 417 – 421.

JURADO DEL EXAMEN


Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Presidenta

Departamento Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa


Dra. María Elena Ayala Escobar

Secretaria

Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
Universidad Nacional Autónoma de México


Dra. Rosa María Vigueras Villaseñor

Vocal

Laboratorio de Biología de la Reproducción
Instituto Nacional de Pediatría


Dra. Irma Jiménez Morales

Vocal

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa.