



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**POSGRADO EN MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**“EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO EN EL ESTADO OXIDANTE DEL EPIDÍDIMO Y  
SUS CONSECUENCIAS EN LA CALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES  
EPIDIDIMARIOS”**

**TESIS**

**Para obtener el grado de**

**MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**PRESENTA**

**Biól. Ana Alejandra Flores González  
2202800675**

[afganaflores@gmail.com](mailto:afganaflores@gmail.com)

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez**

[rems@xanum.uam.mx](mailto:rems@xanum.uam.mx)

**JURADO:**

**Presidenta:**

**Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas**

[liz.juarez@xanum.uam.mx](mailto:liz.juarez@xanum.uam.mx)

**Secretaria:**

**Dra. María del Refugio Denise Clavijo Cornejo**

[dence.cc@gmail.com](mailto:dence.cc@gmail.com)

**Vocales:**

**Dra. Edith Arenas Ríos**

[editharenas2000@yahoo.com.mx](mailto:editharenas2000@yahoo.com.mx)

**Dr. José Gerardo Perera Marín**

[pererag@unam.mx](mailto:pererag@unam.mx)

24 de mayo de 2023, Ciudad de México

## CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México; a 05 de mayo de 2023

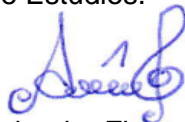
Comisión Académica de la Maestría en

Biología de la Reproducción Animal

Presente

La que suscribe **Ana Alejandra Flores González** alumna con número de matrícula **2202800675**, de la Maestría en **Biología de la Reproducción Animal** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación titulado **“Efecto del estrés crónico en el estado oxidante del epidídimo y sus consecuencias en la calidad de los espermatozoides epididimarios”** a desarrollar en el laboratorio de Neuropsicoendocrinología del Departamento de Biología de la Reproducción y en el laboratorio de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa (UAM-I), en conjunto con el Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, en la División de Enfermedades Musculoesqueléticas y Reumáticas. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

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



Ana Alejandra Flores González

Nombre completo y firma autógrafa

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe **Ana Alejandra Flores González**, alumna de la **Maestría en Biología de la Reproducción Animal**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“Efecto del estrés crónico en el estado oxidante del epidídimo y sus consecuencias en la calidad de los espermatozoides epididimarios”**

Declaro que:

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

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 05 de mayo de 2023.

Atentamente



Ana Alejandra Flores González

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Efecto del estrés crónico en el estado oxidante del epidídimo y sus consecuencias en la calidad de los espermatozoides epididimarios**

**TESIS**

Para obtener el grado de

Maestra en Biología de la Reproducción Animal

**PRESENTA**

**Bióloga Ana Alejandra Flores González**

Directora:

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez

Asesoras:

Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas

Dra. María del Refugio Denise Clavijo Cornejo

Ciudad de México, mayo de 2023

## **COMITE TUTORAL**

### **Directora:**

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez  
Profesora titular  
Laboratorio de Neuropsicoendocrinología  
Departamento de Biología de la Reproducción  
División Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa

### **Asesora:**

Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas  
Profesora asociado D. T.C  
Laboratorio de Neuropsicoendocrinología  
Departamento de Biología de la Reproducción  
División Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa

### **Asesora:**

Dra. María del Refugio Denise Clavijo Cornejo  
Investigadora en Ciencias Médicas C  
División de enfermedades Musculoesqueléticas y Reumáticas  
Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

## **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

**Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas**

Profesora asociado D. T.C

Laboratorio de Neuropsicoendocrinología

Departamento de Biología de la Reproducción

División Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

**Dra. María del Refugio Denise Clavijo Cornejo**

Investigadora en Ciencias Médicas C

División de enfermedades Musculoesqueléticas y Reumáticas

Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

**Dra. Edith Arenas Ríos**

Profesora-Investigadora. Titular "C" T.C.

Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide

Departamento de Biología de la Reproducción

División Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

**Dr. José Gerardo Perera Marín**

Departamento de Reproducción

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Universidad Nacional Autónoma de México

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana perteneciente al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo proporcionado para realizar el presente trabajo a través de la beca número: 1080605.

## JURADO DE EXAMEN DE GRADO

El jurado designado por la Comisión de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó la Tesis titulada: “**Efecto del estrés crónico en el estado oxidante del epidídimo y sus consecuencias en la calidad de los espermatozoides epididimarios**” con fecha 24 de mayo de 2023.



---

**Presidenta**

**Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas**

Departamento de Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa



---

**Secretaria**

**Dra. María del Refugio Denise Clavijo Cornejo**

División de enfermedades Musculoesqueléticas y Reumáticas  
Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra



---

**Vocal**

**Dra. Edith Arenas Ríos**

Departamento de Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa



---

**Vocal**

**Dr. José Gerardo Perera Marín**

Departamento de Reproducción  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Universidad Nacional Autónoma de México



## **Dedicatoria**

A mis padres María Alejandra González Ramírez y Benito Flores Olguín por darme las herramientas para forjar mi carácter. Por la educación recibida en casa, por darme la libertad de elegir y la oportunidad de tener acceso a una formación académica. Gracias por brindarme tanto como les fue posible y por ser mi guía pese a las adversidades que cada uno ha tenido que afrontar.

A mi hermano Cesarín, por cuidarme y brindarme su amor, a su manera y a pesar de las circunstancias, ¡eres muy valiente hermano!

A Citlaly y Sandy Solórzano, las hermanas pequeñas que nunca tuve. Gracias por ser mis confidentes y creer ciegamente en mí.

Al Sr. Juan Bárcenas Mejía y a la Sra. María Elena Cabrera Flores por sus palabras de apoyo y aliento para mantener la voluntad, levantarme y seguir cuando creía que no podía más.

A Juan Bárcenas Cabrera por su infinito amor y apoyo incondicional durante la maestría. Gracias por tu comprensión y paciencia, por tu fe infinita y sobre todo por tomarme de la mano en todo momento.

## Agradecimientos

A la UAM, unidad Iztapalapa, por la invaluable oportunidad que me brindó para estudiar la Maestría en Biología de la Reproducción Animal. Realizar este posgrado es una meta personal y profesional que anhele durante muchos años.

A la Dra. María del Socorro Retana Márquez, por darme la confianza y la oportunidad de desarrollar el presente estudio en el Laboratorio de Neuropsicoendocrinología de la Reproducción. Gracias por dirigir este proyecto, por su experiencia, su disciplina, compromiso y su valioso tiempo para que finalizara satisfactoriamente el trabajo de tesis.

A la Dra. Lizbeth Juárez Rojas y a la Dra. Denise Clavijo Cornejo por su amable apoyo y asesoría para llevar a cabo el trabajo de laboratorio y la redacción de la tesis. Gracias a las dos por su apoyo moral, su paciencia, el tiempo brindado y sus valiosos consejos.

Al laboratorio de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa por el apoyo que me dio para realizar la técnica de Western Blot. Agradezco particularmente al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, al Dr. Benjamín y a Mary.

A mis compañeros de la maestría Beda, Miriam, Yesenia y Julio. Los admiro y les agradezco haber compartido días buenos y no tan buenos. Las risas no faltaron pese a la distancia y la pandemia. Agradezco en especial a Beda porque me escuchó y me acompañó en mis tristezas y alegrías.

A Yoshiki, Toshi, Pata, Heath, Sugizo, Taiji† y Hide†. Gracias por inspirarme, porque en su arte descubrí euforia, voluntad, pasión, lágrimas y esperanza. Gracias por hacerme compañía 24/7.

## ABREVIATURAS

•OH	Radical hidroxilo
11βHSD	11β-hidroxyesteroide deshidrogenasa
17β-HSD	17 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa
3β-HSD	3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
4HNE	4-hidroxinonenal
8OHdG	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
A	Adrenalina
ABP	Proteína de unión a andrógenos
AC	Adenilato ciclasa
ACs	Adenil ciclasa soluble
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> , A <sub>4</sub>	Tipos de espermatogonias A
AMPc	Adenosina 3'5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
APO	Área preóptica
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
AVP	Arginina-vasopresina
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CAT	Catalasa
CRH	Hormona liberadora de corticotropinas
Cu <sup>+</sup>	Cobre
DAG	Diacilglicerol
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diclorofluorescina
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHE	Dihidroetidio
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DMH	Núcleo dorsomedial hipotalámico
DPA	Ácido docosapentaenoico
ERA	Elemento de respuesta a andrógenos
ERO	Especies reactivas del oxígeno
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FADH <sub>2</sub>	Flavina adenina dinucleótido reducido

Fe <sup>2+</sup>	Hierro
FSH	Hormona estimulante de los folículos
G6PD	Glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa
GADPH	Gliceraldeído fosfato deshidrogenasa.
GC	Glucocorticoides
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GPX	Glutación peroxidasa
GPx4	Glutación peroxidasa 4
GPx5	Glutación peroxidasa 5
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación transferasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HCO <sub>3</sub>	Bicarbonato
HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
HHT	Eje hipotálamo-hipófisis-testículo
HO <sub>2</sub>	Radical perhidroxilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IP3	Inositol trifosfato
KISSR	Receptores a Kisspeptina
LC	Locus coeruleus
LC-NA	Locus coeruleus-noradrenalina
LH	Hormona luteinizante
LH-R	Complejo LH-Receptor
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MDA	Malonaldehído
MPOA	Área Preóptica Media
NA	Noradrenalina
NAc	Núcleo arcuato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NADPH oxidasa/NOX	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidasa
NO•	Óxido nítrico
NOX5	NADPH oxidasa 5
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Radical superóxido
OGG1	8-oxoguanina glicosilasa 1
OONO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
P450scc	Enzima que escinde la cadena lateral del colesterol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PKA	Proteína cinasa-A

PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
POA	Área preóptica media
POMC	Proopiomelanocortina
PRDX	Peroxirredoxinas
PTP	Fosfotirosina fosfatasa
PVN	Núcleo paraventricular
QT-PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real
R•	Radical lipídico
RA	Receptor de andrógenos
RFRP3	Péptidos relacionados con la RF amida
RG	Receptor a glucocorticoides
RO•	Radical alcoxilo
ROH	Hidroperóxido lipídico reducido a alcohol
ROO•	Radical peroxilo
ROOH	Hidroperóxido lipídico
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
SDS	Dodecil sulfato de sodio
-SH	Grupo tiol
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
SOD	Superóxido dismutasa
SOD1	Superóxido dismutasa 1
SOD2	Superóxido dismutasa 2
SOD3	Superóxido dismutasa 3
SOH	Ácido sulfénico
-SOH	Grupo sulfenilo
-SS-	Puentes disulfuro
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis
STC	Tabiques de tejido conectivo
T	Testosterona
TBS	Solución salina tamponada con Tris
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
Δ4	Delta 4

## RESUMEN

En el testículo y el epidídimo el estrés crónico genera estrés oxidante, debido a que causa incremento en la producción de peróxido de hidrógeno, peroxidación lipídica y disminución de la actividad de algunas enzimas antioxidantes. Sin embargo, hasta el día de hoy se desconoce de qué manera se modifica el estado oxidante del epidídimo por efecto del estrés crónico y cómo altera la maduración de los espermatozoides epididimarios. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del estrés crónico sobre la respuesta antioxidante del epidídimo y su repercusión en la calidad de los espermatozoides epididimarios de la rata adulta. Se utilizaron ratas macho (n=20) de la cepa Wistar, de tres meses de edad y peso corporal de 300 a 350 g. Los animales se asignaron a uno de los siguientes grupos: grupo control (n=10) y b) grupo de estrés crónico (n=10). Los animales del grupo control se manipularon únicamente para registrar diariamente su peso corporal. Los animales de estrés crónico se estresaron por inmersión en agua fría, durante 50 días consecutivos. Al finalizar los 50 días de estrés, se obtuvieron muestras de sangre y se extrajeron los testículos, los epidídimos, las vesículas seminales y la próstata. Las glándulas accesorias se pesaron. Se determinaron las concentraciones séricas de corticosterona y testosterona. La cauda del epidídimo derecho se utilizó para evaluar la movilidad, la viabilidad, la concentración y la morfología espermática. El epidídimo izquierdo se dividió en las regiones anatómicas: caput, corpus y cauda, para evaluar la producción de peróxido y superóxido, la peroxidación lipídica, el contenido de las enzimas y la expresión del ARNm para SOD, CAT y GPx4. Los resultados muestran que el estrés crónico por inmersión en agua fría generó menor ganancia de peso corporal, menor peso de los testículos, de las vesículas seminales y de la próstata. La concentración sérica de corticosterona fue mayor, en tanto que la concentración de testosterona fue menor que en los machos control. La producción de peróxidos fue mayor en el corpus del epidídimo, mientras que la producción de superóxidos se incrementó en todas las regiones del conducto epididimario con la exposición al estrés crónico. La concentración de peróxidos lipídicos se incrementó en el corpus y en la cauda del epidídimo. El contenido de SOD disminuyó en las tres regiones del epidídimo, en tanto que el contenido de CAT y GPx-4 fue menor únicamente en el corpus del epidídimo, tras la exposición al estrés crónico. Asimismo, el estrés crónico sólo causó incremento de la expresión del ARNm de la proteína GPx-4 exclusivamente en el corpus del epidídimo. En cuanto a la calidad de los espermatozoides, la movilidad, la viabilidad y la concentración fueron menores que en el grupo control, mientras que el porcentaje de los espermatozoides anormales fue mayor en los machos estresados crónicamente. Estos resultados muestran que el estrés crónico por inmersión en agua fría genera estrés oxidante en el epidídimo, debido al aumento diferencial de las especies reactivas de oxígeno en el caput, el corpus y la cauda, asociado a la reducción en el contenido de las enzimas SOD, CAT y GPx4. Estos datos correlacionan con el aumento en la concentración sérica de corticosterona y con la disminución de testosterona. Estas alteraciones afectan la calidad espermática, lo que puede contribuir a la infertilidad en el macho.

## ABSTRACT

In the testis and epididymis, the chronic stress generates oxidative stress, because it causes increased production of hydrogen peroxide, lipid peroxidation, and decreased activity of some antioxidant enzymes. However, to this day it is unknown how the oxidative state of the epididymis is modified by chronic stress and how it alters the maturation of epididymal sperm. The objective of this work was to study the effect of chronic stress on the antioxidant response of the epididymis and its impact on the quality of epididymal spermatozoa in adult rats. Male rats (n=20) of the Wistar strain, three months old and with a body weight of 300 to 350 g, were used. The animals were assigned to one of the following groups: control group (n=10) and b) chronic stress group (n=10). Animals in the control group were only handled to record their body weight daily. Chronic stress animals were stressed by immersion in cold water for 50 consecutive days. At the end of the 50 days of stress, blood samples were obtained, and the testicles, epididymis, seminal vesicles, and prostate were removed. The accessory glands were weighed. Serum corticosterone and testosterone concentrations were determined. The cauda of the right epididymis was used to assess sperm motility, viability, concentration, and morphology. The left epididymis was divided into anatomical regions: caput, corpus, and cauda, to assess peroxide and superoxide production, lipid peroxidation, enzyme content, and mRNA expression for SOD, CAT, and GPx4. The results show that chronic stress due to immersion in cold water generated lower body weight gain, lower weight of the testicles, seminal vesicles and prostate. Serum corticosterone concentration was higher, while testosterone concentration was lower than in control males. Peroxide production was highest in the epididymal corpus, while superoxide production was increased in all regions of the epididymal duct with exposure to chronic stress. The concentration of lipid peroxides increased in the corpus and in the cauda of the epididymis. SOD content decreased in all three regions of the epididymis, whereas CAT and GPx-4 content was lower only in the epididymal corpus, after exposure to chronic stress. Likewise, chronic stress only caused an increase in the mRNA expression of the GPx-4 protein exclusively in the epididymal corpus. Regarding sperm quality, motility, viability and concentration were lower than in the control group, while the percentage of abnormal sperm was higher in chronically stressed males. These results show that chronic stress caused by immersion in cold water generates oxidative stress in the epididymis, due to the differential increase in reactive oxygen species in the caput, corpus and cauda, associated with the reduction in the content of SOD enzymes, CAT and GPx4. These data correlate with the increase in serum corticosterone concentration and with the decrease in testosterone. These alterations affect sperm quality, which can contribute to infertility in the male.

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1	DEFINICIÓN DE ESTRÉS.....	1
1.2	SISTEMA DE ESTRÉS.....	2
1.3	CLASIFICACIÓN DE LOS ESTRESORES.....	4
1.4	SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO.....	5
1.4.1	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo.....	5
1.4.2	Esteroidogénesis.....	7
1.4.3	Espermatogénesis.....	8
1.4.4	Maduración espermática.....	11
1.4.5	Control endócrino del epidídimo por andrógenos.....	14
1.5	EFFECTO DEL ESTRÉS EN LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA MASCULINA.....	16
1.6	RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	18
1.7	PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO POR LOS ESPERMATOZOIDES EN EL EPIDÍDIMO.....	19
1.8	PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA MADURACIÓN ESPERMÁTICA.....	21
1.9	EFFECTO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO.....	23
1.9.1	Peroxidación lipídica.....	23
1.9.2	Daño en el ADN.....	25
1.10	SISTEMA ANTIOXIDANTE EN EL EPIDÍDIMO.....	25
1.10.1	Superóxido dismutasa (SOD).....	26
1.10.2	Catalasa (CAT).....	27
1.10.3	Glutación peroxidasa (GPx).....	27
1.10.4	Peroxiirredoxinas.....	29
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	31
<b>3</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	35
<b>4</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	35
<b>5</b>	<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	36
<b>6</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	36
<b>7</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	36
7.1	OBJETIVOS PARTICULARES.....	36



<b>8</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
8.1	MODELO BIOLÓGICO .....	37
8.2	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	37
8.3	ESTRÉS CRÓNICO POR INMERSIÓN EN AGUA FRÍA .....	38
8.4	REGISTRO DEL PESO CORPORAL .....	39
8.5	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	39
8.6	ANÁLISIS ESPERMÁTICO.....	40
8.6.1	Movilidad.....	40
8.6.2	Viabilidad .....	40
8.6.3	Concentración .....	41
8.6.4	Morfología.....	41
8.7	DETERMINACIÓN DE CORTICOSTERONA Y TESTOSTERONA .....	41
8.7.1	Obtención de muestras de sangre.....	41
8.7.2	Extracción de las hormonas.....	42
8.7.3	Cuantificación de corticosterona y testosterona.....	42
8.8	PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	43
8.8.1	Producción de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	43
8.8.2	Producción de anión superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) .....	43
8.8.3	Contenido de proteínas totales .....	44
8.9	PEROXIDACIÓN LIPÍDICA .....	44
8.10	CONTENIDO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	45
8.10.1	Extracción de proteínas.....	45
8.10.2	Preparación de las proteínas.....	46
8.10.3	Preparación de los geles.....	46
8.10.4	Electroforesis de las proteínas totales .....	46
8.10.5	Transferencia de las proteínas totales .....	47
8.10.6	Anticuerpos primarios, secundarios y revelado .....	47
8.11	EXPRESIÓN DE ARNm DE LAS PROTEÍNAS SOD1, CAT Y GPX-4.....	48
8.11.1	Extracción de ARN por el método del trizol.....	48
8.11.2	Obtención de ADN complementario .....	49
8.11.3	Diseño de los oligonucleótidos o primers. ....	50
8.11.4	PCR en tiempo real .....	50
<b>9</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	51

<b>10</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	52
10.1	GANANCIA DE PESO CORPORAL.....	52
10.2	PESO DE LOS TESTÍCULOS Y LAS GLÁNDULAS ACCESORIAS.....	53
10.3	CONCENTRACIÓN DE CORTICOSTERONA Y TESTOSTERONA.....	54
10.4	PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	55
10.5	CONCENTRACIÓN DE PERÓXIDOS LIPÍDICOS .....	56
10.6	CONTENIDO DE LAS ENZIMAS SOD1, CAT Y GPx-4 .....	57
10.7	EXPRESIÓN DEL ARNm PARA LAS PROTEÍNAS SOD1, CAT Y GPx-4.....	59
10.8	ANÁLISIS ESPERMÁTICO.....	60
10.9	CORRELACIÓN DE LA CORTICOSTERONA CON LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDANTE. ....	62
10.10	CORRELACIÓN DE LA TESTOSTERONA CON LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDANTE. ....	63
10.11	CORRELACIÓN DE LA CORTICOSTERONA CON LA TESTOSTERONA Y DE LA TESTOSTERONA CON LOS PARÁMETROS DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.	
	64	
<b>11</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	65
11.1	Peso corporal.....	65
11.2	Peso de las glándulas masculinas.....	66
11.3	Corticosterona y testosterona.....	67
11.4	ERO y sistema antioxidante.....	68
11.5	Peróxidos lipídicos.....	69
11.6	Calidad espermática .....	70
<b>12</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	74
<b>13</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	75

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 DEFINICIÓN DE ESTRÉS

El concepto de estrés surgió de las aportaciones de Claude Bernard, Walter Cannon y Hans Selye (Holmes, 1986; Cannon, 1935; Selye, 1936). Claude Bernard acuñó el término milieu intérieur (medio interno) y propuso que los organismos pueden adaptarse a los cambios de su entorno cuando su medio interno se mantiene estable y constante (Fink, 2009; Holmes, 1986). Posteriormente, Walter Bradford Cannon retomó el concepto de Bernard respecto a la estabilidad del medio interno, definió el término reacción de fuga o lucha (Cannon, 1914) y desarrolló el concepto de homeostasis, que se refiere al estado de equilibrio del organismo, manteniendo los parámetros fisiológicos; por ejemplo, la concentración de glucosa en la sangre o la temperatura corporal (Cannon, 1935; Cannon, 1929). Cannon señaló que amenazas como la angustia emocional activarían la médula suprarrenal y el sistema nervioso simpático (Cannon, 1929). Posteriormente, Hans Selye señaló la importancia de la corteza suprarrenal y de los glucocorticoides en la respuesta de estrés (Szabo et al., 2012) y postuló el término síndrome general de adaptación, que se activa en respuesta a los estresores y consiste en tres etapas; la primera denominada fase de alarma, durante la cual se presenta la reacción de fuga o lucha, propuesta por Cannon. La segunda etapa es la de resistencia, durante la cual el organismo activa mecanismos neuroendocrinos para enfrentar al factor de estrés. Finalmente, si el estresor persiste, se presenta la tercera fase o de agotamiento, durante la cual se desarrollan enfermedades que podrían llevar a la muerte del organismo. Selye definió al estrés como la respuesta no específica del organismo frente a cualquier demanda y señaló la diferencia entre este concepto y el de factor estresante, reconociéndolo como aquella situación que genera estrés en cualquier momento (Selye, 1936).

En la actualidad, el concepto de estrés se define como la respuesta del organismo a situaciones incontrolables e impredecibles, conocidas como estresores (Koolhaas et al., 2011), que alteran la homeostasis del organismo (Smith y Vale, 2006; Chrousos y Gold, 1992). Así el estresor es el estímulo que amenaza la homeostasis y la respuesta de estrés es la reacción del organismo que le permite restaurar sus parámetros fisiológicos (Chrousos, 2009).

## 1.2 SISTEMA DE ESTRÉS

Frente a estímulos adversos (conocidos como estresores), que perturban la homeostasis, el organismo responde mediante procesos conductuales y fisiológicos tendientes a neutralizar el efecto de los estresores y a restablecer el equilibrio homeostático (Selye, 1946). La respuesta de estrés es regulada por el sistema de estrés, que está compuesto por estructuras neuroendocrinas del sistema nervioso central (SNC) y por componentes periféricos (Chrousos, 2002). Los componentes centrales incluyen a las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo que producen y liberan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), así como las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (LC) que producen y liberan noradrenalina (NA) (Charmandari et al., 2005) y la hipófisis. Los componentes periféricos incluyen a la corteza de la glándula suprarrenal, la cual secreta glucocorticoides, como resultado de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) e involucra también al sistema eferente simpático adrenomedular, el cual activa a la médula suprarrenal para que se refuerce la liberación de adrenalina (A) y NA (Charmandari et al., 2005; Chrousos, 2002).

Cuando el organismo percibe un estímulo adverso o estresor, se activan las neuronas noradrenérgicas del LC que liberan NA hacia la corteza cerebral, el sistema límbico, el hipotálamo, el tronco cerebral y la médula espinal (Ulrich-Lai y Herman, 2009), lo que contribuye al aumento del estado de alerta y vigilancia del organismo (Johnson, et al., 1992). El LC también estimula a través del sistema nervioso simpático, la secreción de NA y A desde la médula adrenal hacia la

circulación, lo que induce cambios fisiológicos como el aumento en la frecuencia cardiaca, en el flujo sanguíneo y en el metabolismo, todo ello para proporcionar oxígeno y glucosa hacia el cerebro, el corazón y los músculos, órganos que son importantes en la reacción de fuga o lucha (Goldstein y Kopin, 2008; Johnson, et al., 1992). La NA, junto con la A, estimula la secreción de CRH del hipotálamo mediante conexiones neuronales recíprocas entre las neuronas noradrenérgicas del LC y las neuronas parvocelulares del PVN del hipotálamo (Charmandari et al., 2005). Las neuronas noradrenérgicas del LC son estimuladas mediante receptores CRH tipo 1, mientras que las neuronas parvocelulares del PVN responden a la A y la NA a través receptores  $\alpha$ 1-noradrenérgicos (Tsigos y Chrousos, 2002). Por otro lado, en respuesta al estrés crónico se activan las neuronas parvocelulares del PVN del hipotálamo, las cuales producen y liberan a la CRH hacia el sistema portahipofisiario a través del cual es transportada hacia la adenohipófisis. Ahí, la CRH estimula a las células conocidas como corticotropos para la síntesis de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (Stephens y Wand, 2012) y su liberación al torrente sanguíneo, a través del cual es transportada hasta la corteza de la glándula suprarrenal, donde estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides (GC), cortisol en humanos y corticosterona en roedores (Charmandari et al., 2005; Stephens y Wand, 2012; Rhodes, 2017). Los GC y la NA liberadas de la glándula suprarrenal, inhiben el almacenamiento de los ácidos grasos y la síntesis de proteínas, estimulan la liberación de glucosa del hígado, de aminoácidos del músculo y ácidos grasos libres del tejido adiposo (Munck, et al., 1984). Los GC son los efectores finales del eje HHA y ejercen retroalimentación negativa en el control de la actividad del eje HHA (Charmandari et al., 2005). En el hipotálamo inhiben la secreción de la CRH y en la hipófisis la secreción de ACTH (Nicolaidis et al., 2015) (Figura 1). Así, los glucocorticoides disminuyen a su nivel basal y limitan el tiempo de exposición del organismo a estas hormonas, minimizando los efectos catabólicos, lipogénicos, anti reproductivos e inmunosupresores de estas hormonas (Charmandari et al., 2005).

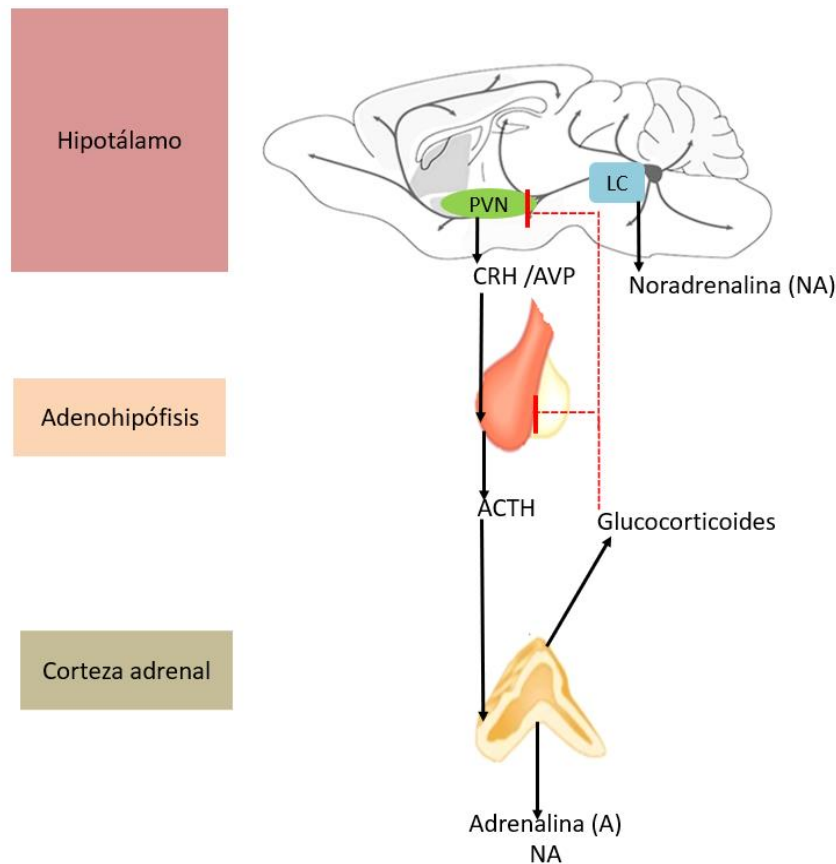


Figura 1. Componentes centrales y periféricos involucrados en el sistema de estrés. Las líneas continuas representan efectos estimulantes y las líneas discontinuas representan efectos inhibitorios de los glucocorticoides. (Adaptado de Charmandari et al., 2012).

### 1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS ESTRESORES

La respuesta de estrés depende de la naturaleza o calidad del estresor, de su intensidad y duración, así como de las condiciones en las que se encuentra el organismo (Sutanto y de Kloet, 1994). En función de su calidad, los estresores pueden ser físicos, metabólicos, inmunológicos o psicológicos (Tilbrook et al., 2000). En animales de experimentación como los roedores, se recurre al uso de estresores físicos, como son las bajas temperaturas (Baffi y Palkovits, 2000); estresores psicológicos como el aislamiento (Bartolomucci et al., 2003); y estresores mixtos como el ruido, la inmovilización, el nado forzado (Dayas et al., 2001) y la inmersión en agua fría (Retana-Márquez et al., 2003b), donde existe la combinación de estrés psicológico y físico. De acuerdo con su duración, el estrés

puede ser agudo, ya que la exposición al estresor es única y el tiempo de exposición es de unos cuantos minutos a unas horas (Pacak et al., 1998); estrés crónico, cuando la exposición al estresor es prolongada, por un tiempo mayor a seis horas y se extiende hasta varios días, semanas, meses o años (Justel et al., 2009; Retana-Márquez et al., 1996). El estrés agudo genera un aumento en la concentración de la ACTH en el plasma sanguíneo a los 5 minutos de exposición al estresor, en tanto que, para la corticosterona, el incremento en la concentración se presenta entre los 30 y los 45 minutos (Jones y Gilham, 1988).

#### 1.4 SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO

El sistema reproductor masculino consta de dos testículos, dos epidídimos, dos conductos deferentes, dos vesículas seminales y la próstata (Gurung et al., 2022). Los testículos tienen como función la producción de espermatozoides dentro de los túbulos seminíferos y la síntesis de andrógenos, particularmente testosterona (T) en las células de Leydig, que se localizan por fuera de los túbulos seminíferos. Estas funciones requieren del control hormonal de las gonadotropinas: la hormona estimulante de los folículos (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Durairajanayagam et al., 2015). La LH estimula la síntesis de T en las células de Leydig (Payne y Hales, 2004) y la FSH estimula junto con la T, el proceso de espermatogénesis (Jin y Yang, 2014).

##### 1.4.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo

La síntesis de T y la espermatogénesis dependen del control neuroendocrino del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT). Las neuronas kisspeptinérgicas, localizadas en el núcleo arcuato (NAc) del hipotálamo, hacen sinapsis con las neuronas GnRH, ubicadas en el área preóptica media (POA) del hipotálamo (Griffin y Wilson, 2003; Pinilla et al., 2012), donde estimulan la síntesis de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), a través de sus receptores a Kisspeptina (KISSR) (McCartney y Marshall, 2013). Estas neuronas envían proyecciones axonales a la eminencia media, donde liberan a la GNRH hacia el

sistema porta hipofisiario, el cual transporta a la GnRH hasta los gonadotropos de la adenohipófisis (Ehlers y Halyorson, 2013) para estimular la síntesis y liberación de las gonadotropinas, la LH y la FSH (Manjithaya y Dighe, 2006). En la adenohipófisis, la GnRH se une a receptores específicos acoplados a proteína G, ubicados en la membrana de los gonadotropos. La unión del ligando-receptor activa a la proteína G $\alpha$ q, cuya subunidad  $\alpha$  activa a la fosfolipasa C (PLC). En la membrana plasmática la PLC rompe al fosfatidilinositol difosfato, generando dos segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP3). El IP3 estimula la liberación de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) desde el retículo endoplásmico liso, esto aumenta la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y activa a la proteína cinasa C (PKC). La PKC activa a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Por otro lado, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular estimula la liberación de gonadotropinas, en tanto que otras proteínas cinasas como las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2) y la proteína cinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina (CaMKII) estimulan la transcripción de genes que codifican la subunidad  $\beta$  de las gonadotropinas (Durán-Pastén y Fiordelasio, 2009; Ferris y Shupnik, 2006). La LH y la FSH son liberadas al torrente sanguíneo y transportadas a los testículos. En los testículos, la LH se une a receptores acoplados a proteína G ubicados en la membrana de las células de Leydig para estimular la síntesis de T (Payne y Hales 2004), mientras que la FSH se une a receptores acoplados a proteína G que se localizan en la membrana de las células de Sertoli (Wahlström et al., 1983) y estimula la síntesis de la proteína de unión a andrógenos (ABP), activina A y B, inhibina B y factores de crecimiento necesarios para el desarrollo de las células germinales (O'Donnell et al., 2006). Las activinas estimulan la secreción de la GnRH en el hipotálamo y en la adenohipófisis la secreción de LH y FSH. La inhibina B inhibe la secreción de la FSH a nivel de la adenohipófisis (McCartney y Marshall, 2013; Mason et al., 1985). La T inhibe la secreción de Kisspeptina en el NAc, inhibiendo indirectamente a las neuronas GnRH en el hipotálamo; en la hipófisis, inhibe la síntesis de la LH (Sheckter et al., 1989), (Figura 2).



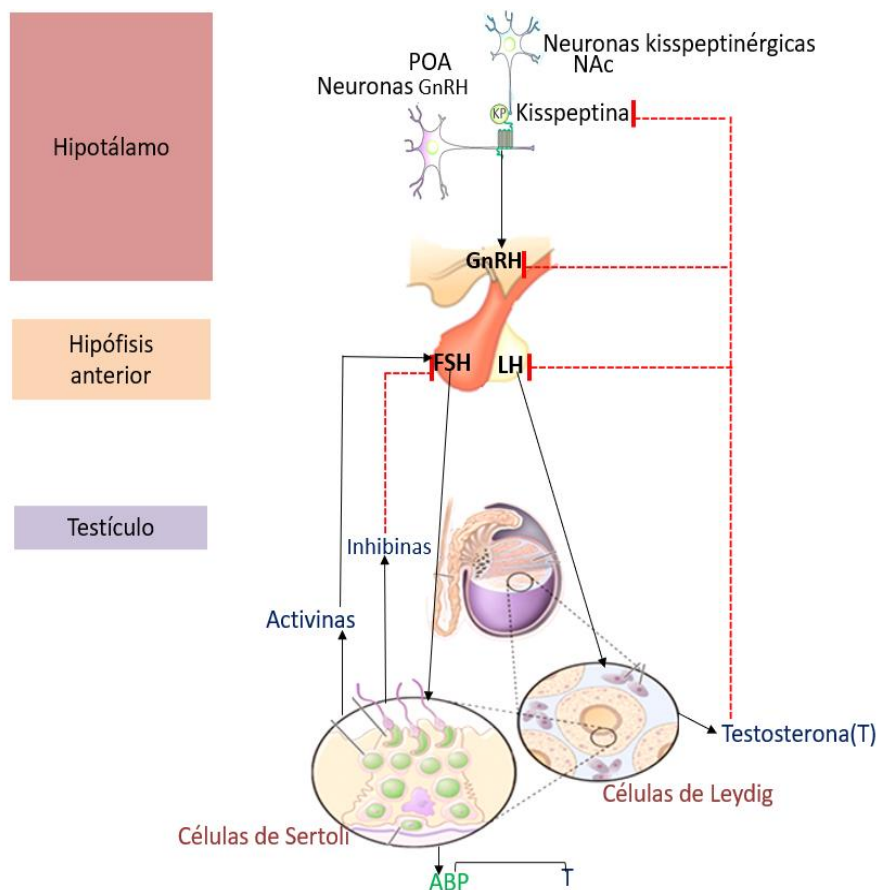


Figura 2. Control neuroendocrino del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT). Las hormonas producidas por el hipotálamo y la hipófisis ejercen efectos positivos en la función de los testículos. La T y las inhibinas, ejercen efectos de retroalimentación negativos en la secreción de la GnRH, la FSH y la LH. (Adaptado de Shah et al., 2021).

#### 1.4.2 Esteroidogénesis

La esteroidogénesis es el proceso biológico mediante el cual se sintetizan hormonas esteroideas a partir del colesterol (Baquedano et al., 2018). Las hormonas esteroideas se sintetizan principalmente en la glándula suprarrenal, que produce el mineralocorticoide aldosterona, así como GC (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) y en las gónadas que producen hormonas sexuales esteroideas; estrógenos como el estradiol, progestágenos como la progesterona (en hembras) y andrógenos (en machos) (Chakraborty et al., 2021) principalmente T, que es producida por las células de Leydig (Schiffer et al., 2018).

La síntesis de T está bajo el control de la liberación pulsátil de la LH, la cual es controlada a su vez por la liberación pulsátil de la GnRH del hipotálamo (Stocco y McPhaul, 2006). La LH se une a su receptor, acoplado a proteínas Gs, en la membrana plasmática de las células de Leydig (Ascoli et al., 2002). El complejo LH-Receptor (LH-R) activa a la proteína G, cuya subunidad alfa estimula a la enzima adenilato ciclasa (AC) para que sintetice 3',5'-monofosfato cíclico intracelular (AMPC) a partir de ATP. El AMPC se une a la subunidad inhibidora para liberar a la subunidad activadora de la enzima proteína cinasa A (PKA) (Dufau y Catt, 1978). La PKA activa a la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), la cual se encuentra en la cara externa de la membrana mitocondrial, se une al colesterol y lo transporta hasta la membrana mitocondrial interna (Selvaraj et al., 2018). La enzima citocromo P450<sub>scc</sub> (enzima que escinde la cadena lateral del colesterol) localizada en la membrana mitocondrial interna convierte el colesterol en pregnenolona. La pregnenolona sale de la mitocondria y es movilizada hacia el retículo endoplásmico liso, donde es convertida a progesterona por la enzima 3 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD). A su vez la pregnenolona es convertida a 17α-hidroxiprogesterona y posteriormente a dehidroepiandrosterona (DHEA) por la enzima 17α-hidroxilasa/17,20 liasa. A continuación, la 3β-HSD convierte la DHEA en androstenediona. Finalmente, la androstenediona es convertida a T por la enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD) (Milosevic et al., 2021). Esta vía, conocida como delta 4 (Δ4) se encuentra en la mayoría de los roedores (Slaunwhite y Samuels, 1956).

#### 1.4.3 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso biológico que produce células germinales masculinas diferenciadas haploides (espermatozoides) a partir de células madre (espermatogonias diploides) y se lleva a cabo en el epitelio seminífero que reviste a los túbulos seminíferos del testículo (Hermo y Robaire, 2002). La espermatogénesis se divide en etapas y ocurre de manera cíclica. En la rata, la

espermatogénesis se divide en XIV etapas o asociaciones celulares que constituyen el ciclo del epitelio seminífero (de Kretser y Kerr, 1994), tiene una duración de 48 a 52 días e involucra cuatro ciclos y medio del ciclo del epitelio seminífero (Clermont, 1972) (Figura 3).

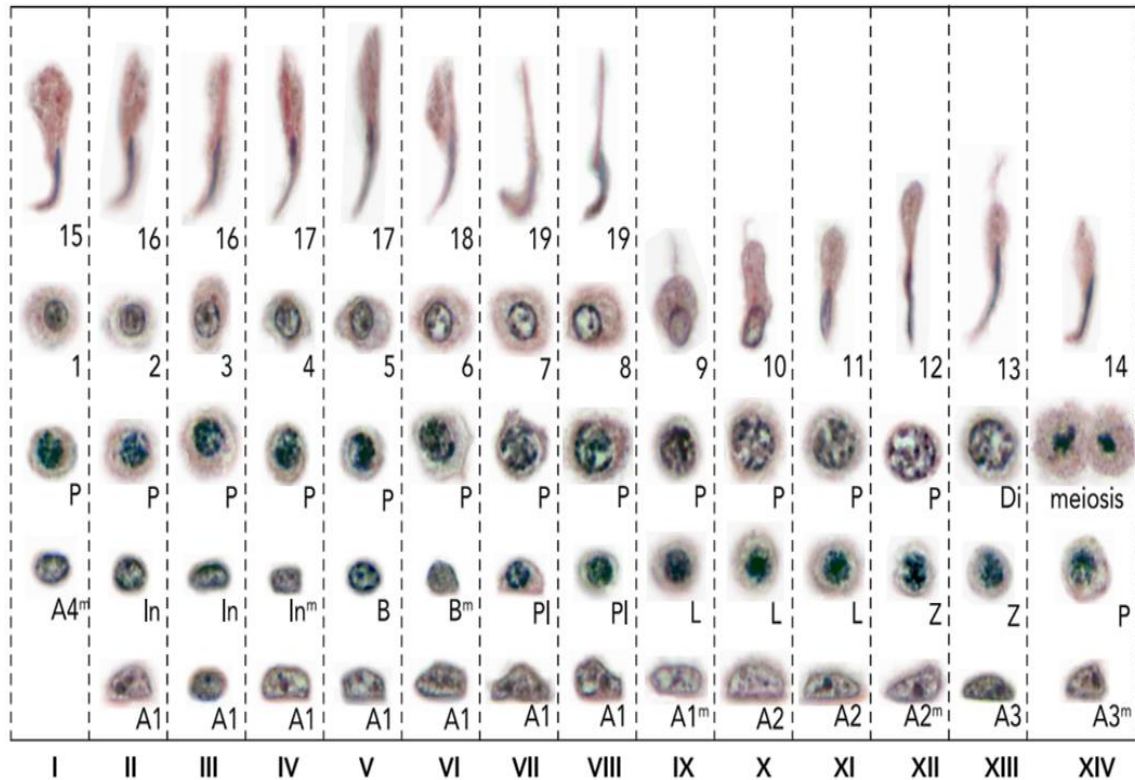


Figura 3. Ciclo del epitelio seminífero de la rata. Etapas del ciclo epitelial seminífero (números romano del I al XIV). En las filas horizontales se observan las células germinales que se encuentran en cada etapa. Tipos de espermatogonias: A, (1-4); In, intermedia; B, tipo B; m, mitosis de las espermatogonias. Espermatocitos primarios: PI, preleptoteno; L, leptoteno; Z, zigoteno; P, paquiteno; Di, diacinesis; meiosis, espermatocito secundario. 1-19, etapas de la espermiogénesis. (Modificado de Xiao, et al., 2014).

El proceso de espermatogénesis se divide en cuatro etapas: la espermatocitogénesis, meiosis, espermiogénesis y espermiación. En la espermatocitogénesis se lleva a cabo la proliferación de las espermatogonias indiferenciadas que se dividen por mitosis para producir más espermatogonias. Algunas de estas maduran y se diferencian en espermatogonias tipo A diferenciadas (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>). Estas se dividen nuevamente por mitosis hasta convertirse en espermatogonias intermedias (In) y posteriormente en

espermatogonias tipo B. Antes de la primera división meiótica, ocurre la síntesis o duplicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Parvinen, et al., 1991). Posteriormente inicia la profase I en los espermatocitos primarios en preleptoteno; la primera profase meiótica se divide en leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno (Hess y de Franca, 2008). El apareamiento y entrecruzamiento genético de cromosomas homólogos ocurre durante el cigoteno de la primera profase, donde se forman el complejo sinaptonémico (formado por un par de cromosomas homólogos) y los nódulos de recombinación (donde se produce el intercambio de material genético). En la metafase I, los cromosomas homólogos se colocan en el plano ecuatorial de las células. Durante el anafase I, los cromosomas homólogos se separan. En la telofase I, se reduce el número de cromosomas y se forman dos células hijas, los espermatocitos secundarios, que inician de inmediato a segunda división meiótica, profase II, metafase II, anafase II y telofase II, en la que se forma una membrana nuclear alrededor de cada par de cromosomas hijos para formar cuatro núcleos haploides. El citoplasma se divide y se originan cuatro espermatidas redondas haploides (de Kretser y Kerr, 1994; Hess y de Franca, 2008), las cuales se transformarán en espermatozoides durante la espermiogénesis (de Kretser y Kerr, 1994). En la espermiogénesis, las espermatidas experimentan cambios morfológicos y funcionales para diferenciarse en espermatozoides. La diferenciación de espermatidas a espermatozoides involucra la formación de gránulos pro-acrosómicos, que derivan del aparato de Golgi, los cuales se fusionan y forman el acrosoma, la reducción en el tamaño del núcleo, la condensación de la cromatina (de Kretser y Kerr 1994), la formación de la pieza media con las mitocondrias y la formación del flagelo a partir de los centriolos (Figura 4).

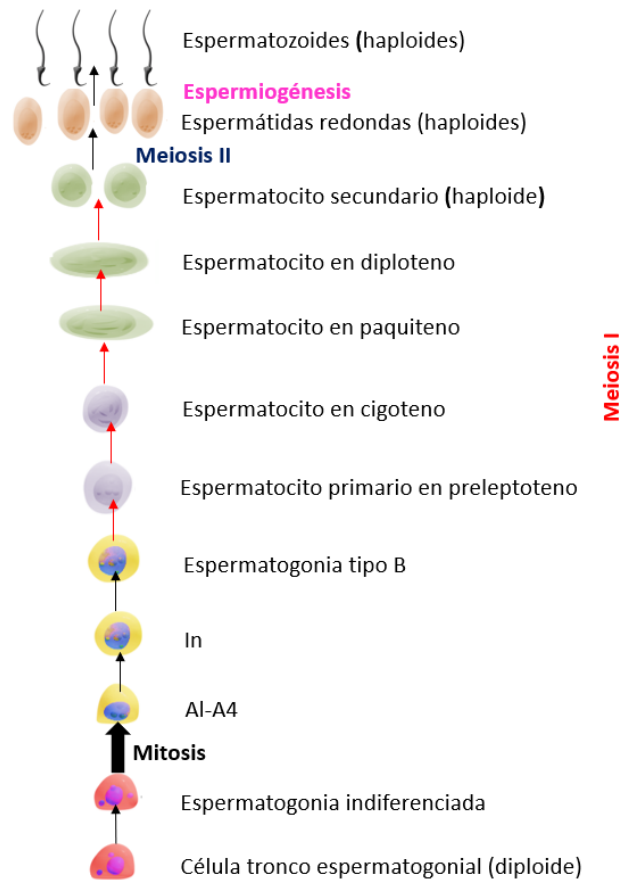


Figura 4. Células germinales en la espermatogénesis de la rata. (Adaptado de; Xiao, et al., 2014).

Los espermatozoides formados son liberados hacia el lumen del epitelio seminífero y transportados desde los túbulos seminíferos hasta la red testicular y enseguida son transportados a través de los conductos eferentes, que desembocan en el epidídimo, donde continúan con su proceso de maduración (Robaire et al., 2006).

#### 1.4.4 Maduración espermática

Los espermatozoides adquieren la habilidad de moverse hacia adelante conforme avanzan a lo largo del epidídimo (Robaire et al., 2006; Hermo y Robaire, 2002). El epidídimo o conducto epididimario es un órgano tubular con una longitud que varía de acuerdo con la especie. En la rata la longitud es de 3 m, de 5 a 7 m en el

humano y hasta 80 m en el caballo (Robaire y Hinton, 2015; Arrotia et al., 2012; Sostaric et al., 2008). El conducto epididimario se divide en cuatro regiones anatómicas: el segmento inicial, la cabeza (*caput* o región cefálica), el cuerpo (*corpus* o región media), y la cola (*cauda* o región caudal) (Robaire y Hinton, 2015), (Figura 5).



Figura 5. Anatomía del epidídimo de rata (Modificado de Garcia et al., 2012).

Las regiones anatómicas se dividen en segmentos intrarregionales compuestos de tabiques de tejido conectivo (STC), estas estructuras brindan un microambiente adecuado para la maduración de los espermatozoides (Robaire et al., 2006; Turner et al. 2003). El segmento inicial está constituido de células epiteliales alargadas con estereocilios, el *caput* está revestido por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con microvellosidades, mientras que el *corpus* y la *cauda* están constituidos por epitelio de tipo columnar simple y microvellosidades (Abe et al., 1984). El epitelio epididimario está compuesto por diversos tipos celulares: las células principales se encuentran a lo largo del conducto epididimario, comprenden hasta el 80% de todo el epitelio epididimario, absorben fluidos que provienen del testículo y secretan diversas proteínas al medio intraluminal. Estas

proteínas son comunes a diferentes especies e incluyen a la lactoferrina, la actina, la  $\beta$ -galactosidasa, la lipocalina 5, la enzima glutatión peroxidasa 5, la prostaglandina D2 sintasa, el glutatión S-transferasa, la transferrina y la clusterina (Dacheux et al., 2006; Dacheux y Dacheux, 2013). Las células basales se encuentran en el *caput*, *corpus* y *cauda*, están en contacto con la membrana basal y las células principales, su función es la de regular la acidificación del lumen a través de la producción de óxido nítrico. Las células claras se encuentran en el *caput*, *corpus* y en mayor proporción en la *cauda*, su función es endocítica y se relacionan con la captación y eliminación de la gota citoplasmática desprendida de los espermatozoides en maduración (Robaire y Hilton, 2015). Las células estrechas y apicales predominan en el segmento inicial y a lo largo del epidídimo, ambos tipos celulares participan en la acidificación del fluido luminal (Robaire y Hilton, 2015; Cornwall, 2009), (Figura 6). El pH ácido (6.5) mantiene a los espermatozoides quiescentes y previene la iniciación prematura de la reacción acrosomal (Shum et al., 2009; Levine y Kelly, 1978). En cuanto a las células halo, éstas se encuentran en todo el epitelio epididimario, son las células inmunológicas del epidídimo, eliminan espermatozoides anormales o almacenados por periodos prolongados en la cauda del epidídimo (Robaire y Hinton, 2015; Cornwall, 2009; Setchell et al., 1994). Durante su paso por el epidídimo los espermatozoides están en contacto directo con el fluido luminal epididimario, que es un medio enriquecido modificado, producto de las actividades de secreción y absorción de los distintos tipos celulares del epitelio epididimario, por lo que forma un ambiente luminal único para que se lleve a cabo el proceso de maduración de los espermatozoides (Cornwall, 2009). El ambiente luminal epididimario y los espermatozoides en proceso de maduración se encuentran protegidos por la barrera hemato-epididimaria, formada por una red de uniones estrechas apicales entre las células epiteliales adyacentes del epidídimo. La barrera hemato-epididimaria aísla el ambiente luminal de la sangre y previene el contacto directo de las células inmunológicas con los espermatozoides, evitando la destrucción autoinmune (Toshimori 2003; Klinefelter 2002; Setchell et al., 1994; Cornwall, 2009).

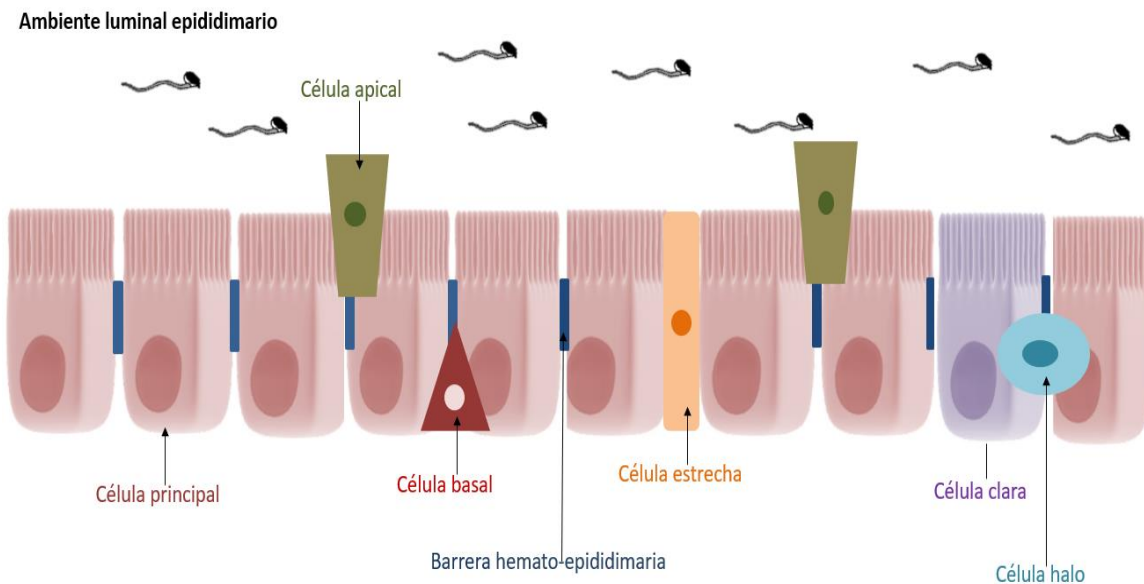


Figura 6. Distribución esquemática de los principales tipos de células en el epidídimo de rata. Se observa de izquierda a derecha: las células principales, las células basales, las células estrechas, células claras y finalmente las células halo. (Adaptado de Zhou et al., 2018).

El proceso de maduración de los espermatozoides implica cambios estructurales y funcionales durante su paso por el epidídimo. Estos cambios incluyen: modificaciones en la membrana plasmática en cuanto a su composición lipídica (Aveldano et al., 1992), en la distribución y glicosilación de las proteínas (Cooper, 2011); en el núcleo se lleva a cabo la compactación de la cromatina mediante la formación activa de puentes disulfuro (-SS-) en las protaminas unidas al ADN (Seligman et al., 1994); la migración de la gota citoplásmica del cuello a la pieza media del flagelo; el incremento en la concentración de AMPc; la fosforilación de proteínas y la oxidación de grupos sulfhidrilo (Kaneko et al., 2002; Ijiri et al., 2011).

#### 1.4.5 Control endócrino del epidídimo por andrógenos

Los andrógenos mantienen la estructura y el adecuado funcionamiento de las células en el epidídimo (Ribeiro et al., 2015), particularmente de T que es sintetizada y secretada por las células de Leydig (Miller y Auchus 2011). Las células principales del segmento inicial, el *caput*, el *corpus* y la *cauda* del



epidídimo responden a la T, que proviene del torrente sanguíneo o del fluido testicular unida a la ABP (Robaire et al., 2006; French y Ritzén, 1973). En las células principales del epidídimo la T se reduce a 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) en el citoplasma, por medio de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa (Turner et al., 1984). La DHT se une al receptor para andrógenos (RA) (Robaire y Hamzeh, 2011), miembro de la superfamilia de receptores de nucleares (Li y Al-Azzawi, 2009) que, en el epidídimo, se localiza en las células principales, basales y claras, particularmente en el *caput* y *corpus* (Yamashita, 2004). Tras la unión receptor-ligando el RA se dimeriza, fosforila y transloca al núcleo (Mangelsdorf y Evans, 1995). Luego el dímero se une al elemento de respuesta a andrógenos (ERA) y actúa como factor de transcripción para modular la expresión de genes (Avila et al., 1998), estimulando la síntesis de proteínas específicas (Figura 7).

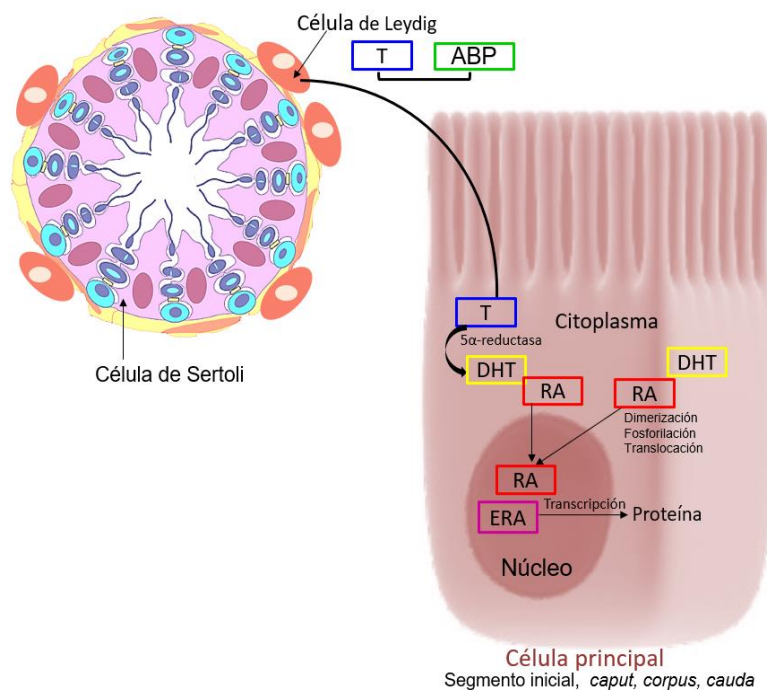


Figura 7. Regulación endócrina del epidídimo por la T. Las células principales responden a la T del torrente sanguíneo o del fluido testicular unida a la ABP. En las células principales del epidídimo la T es reducida a DHT por la 5 $\alpha$ -reductasa en el citoplasma. La DHT se une al RA. Tras la unión de la DHT, el RA pasa por una serie de cambios conformacionales que incluyen dimerización, fosforilación y translocación al núcleo. El dímero se une al ERA y actúa como factor de transcripción para modular la expresión génica (Adaptado de Hernández-Rodríguez et al., 2016 y de Robaire y Hamzeh, 2011).

## 1.5 EFECTO DEL ESTRÉS EN LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA MASCULINA

La exposición crónica a los estresores incrementa la actividad del eje HHA y al mismo tiempo inhibe la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT) (Selye, 1946). Esto se debe a la acción de las hormonas del eje HHA secretadas durante el estrés: la CRH, la ACTH, las  $\beta$ -endorfinas y los glucocorticoides que inhiben la actividad del eje HHT en todos sus niveles (Charmandari et al., 2005). En el hipotálamo, la secreción de la GnRH en las neuronas del Área Preóptica Media (MPOA) es inhibida directamente por la CRH (Rivier y Rivier, 1986) mediante conexiones entre las neuronas secretoras de CRH y las neuronas secretoras de GnRH (MacLusky et al., 1988) o indirectamente a través de los péptidos opioides endógenos, las  $\beta$ -endorfinas, que derivan de la pro-opiomelanocortina (POMC) (Bidzinska et al., 1993).

En la hipófisis, los GC inhiben directamente la secreción de la LH al disminuir la capacidad de respuesta de los gonadotropos a la GnRH (Hagino et al., 1969). Además, en las células de Leydig, los GC disminuyen su respuesta a la LH mediante la reducción de sus receptores a LH (LH-R) (Rabin et al., 1990). Los GC también pueden alterar la secreción de T al inhibir la transcripción de genes que codifican para enzimas que participan en la esteroidogénesis (Hardy et al., 2005; Payne y Sha, 1991) como la  $3\beta$ -HSD y la 17 beta-hidroxiesteroide  $17\beta$ -HSD (Hales y Payne, 1989), reduciendo los niveles de estas enzimas.

La inhibición en la síntesis de T en las células de Leydig, mediada por los GC durante el estrés, puede producirse cuando la actividad de la enzima  $11\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $11\beta$ HSD1) es baja, ya que esta enzima metaboliza e inactiva a los GC, regulando así los niveles intracelulares de GC (Hu, 2008; Hardy et al., 2005).

Los GC pueden inducir además la apoptosis en las células de Leydig (Hardy, et al., 2005; Chen et al., 2012) mediante un mecanismo regulado por el receptor para GC (GR) presente en el citoplasma de las células de Leydig (Sasagawa et al., 2001). La apoptosis en estas células se relaciona con la activación del sistema Fas y de la caspasa 3 activa, causando la pérdida del potencial de

membrana mitocondrial y favoreciendo el aumento de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Gao et al., 2003).

Existe además un péptido hipotalámico conocido como hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH) o RFRP3 en mamíferos, el cual también está involucrado en la inhibición del eje HHT durante el estrés. El RFRP3 se expresa en las neuronas del núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH) de la rata. Las fibras neuronales se extienden al área preóptica (APO), donde hacen contacto con las neuronas GnRH (Smith y Clarke, 2010) que presentan receptores para RFRP3. El RFRP3 inhibe la síntesis y liberación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las gonadotropinas en varias especies de mamíferos, como la rata (Johnson et al., 2007), la oveja (Clarke et al., 2009) y el humano (Tsutsui, 2010). Por otro lado, los GC liberados durante el estrés aumentan la expresión de la RFRP3 en el DMH de ratas adultas (Kirby, 2009). Los GC actúan sobre los GR en las neuronas RFRP3 del hipotálamo aumentando la transcripción del gen para RFRP3 y su expresión en el DMH. El RFRP3, liberado de las terminales axónicas de este núcleo hipotalámico, inhibe a su vez la liberación de la GnRH, mediante un mecanismo postsináptico directo, hiperpolarizando a las neuronas GnRH (Wu et al., 2009) y disminuyendo la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH (Kirby et al., 2009; Murakami et al., 2008), (Figura 8).

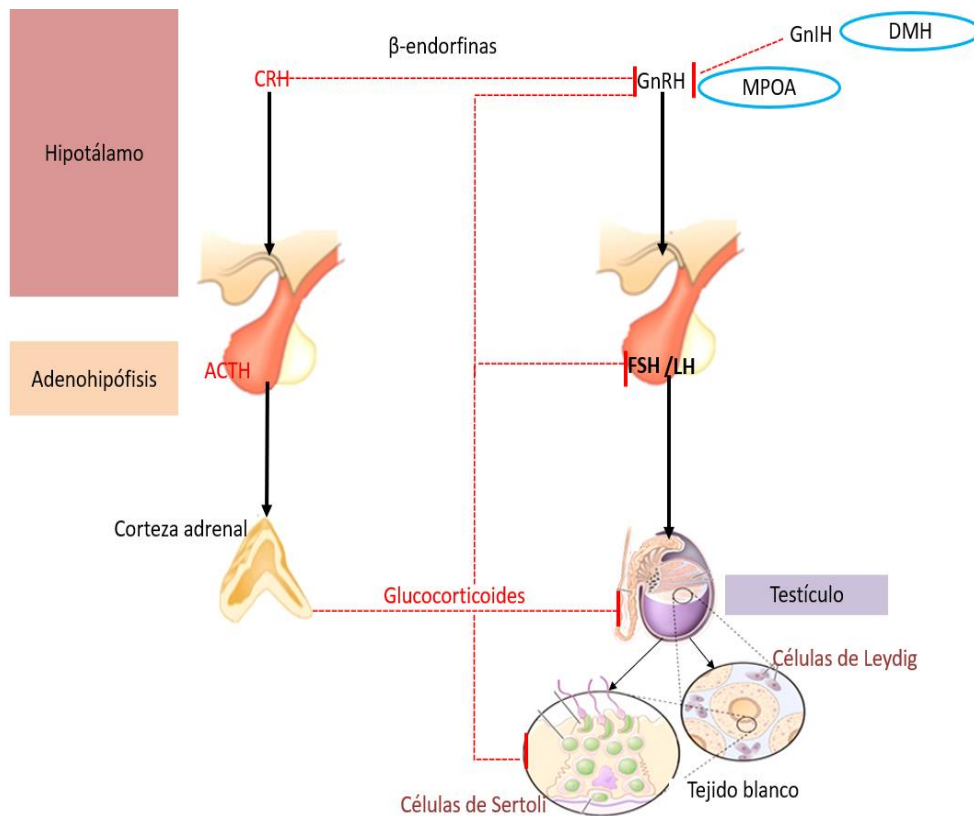


Figura 8. Relación entre el eje HHA y el eje HHT. Las líneas continuas representan efectos estimulantes y las líneas discontinuas representan efectos inhibitorios de los glucocorticoides. (Adaptado de Johnson et al., 1992).

## 1.6 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Un radical libre es una molécula que tiene uno o más electrones ( $e^-$ ) no apareados en sus orbitales más externos (Kohen y Nyska 2002; Halliwell y Gutteridge, 1999), que los hace muy inestables y roban electrones de otras moléculas, como: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos a través de reacciones oxidantes que causan daño tisular (Kohen y Nyska, 2002). El oxígeno tiende a la formación de radicales ya que, en su forma molecular ( $O_2$ ), transporta dos  $e^-$  no apareados y, al aceptar un electrón, el  $O_2$  se reduce para formar el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (De Lamirande y O'Flaherty, 2008; Aitken et al., 2013). Los radicales libres que se generan del oxígeno, se conocen como especies reactivas de oxígeno (ERO) e incluyen al anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), al radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), al radical perhidroxilo ( $HO_2$ ) y el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) (Halliwell, 2006; Pryor et al., 2006). Existen especies no

radicales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el ozono ( $O_3$ ) (Kohen y Nyska, 2002). Aunque el  $H_2O_2$  no es un radical libre, se considera un oxidante importante, debido a que puede generar radicales ( $\cdot OH$ ), altamente reactivos, a través de su interacción con los iones hierro y cobre, mediante la reacción de Fenton (Agarwal et al., 2006; Pryor et al., 2006).

El estrés oxidante es la pérdida del balance entre el sistema oxidante y el sistema antioxidante y ocurre cuando la producción de ERO excede la capacidad antioxidante, lo que causa aumento en la generación de daño oxidante (Turner y Lysiak, 2008; Wang et al., 2003).

## 1.7 PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO POR LOS ESPERMATOZOIDEOS EN EL EPIDÍDIMO

Se han identificado dos mecanismos involucrados en la producción de ERO en los espermatozoides del epidídimo: 1) En la mitocondria (fuente principal en la producción de ERO), la producción es modulada por la actividad de una oxidorreductasa (diaforasa), dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) (Henkel, 2011), 2) la activación del sistema nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) también conocido como NOX acoplado en la membrana plasmática (Agarwal et al., 2014; Henkel, 2011; Vernet et al., 2001).

La mitocondria genera la mayor parte de la energía de la célula, a través de la fosforilación oxidativa, proceso en el que los  $e^-$  pasan a través de una serie de moléculas transportadoras de  $e^-$  dispuestas en complejos enzimáticos multiproteicos denominados cadena de transporte de  $e^-$  o cadena respiratoria mitocondrial. Los  $e^-$  provienen de la nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y de la flavina adenina dinucleótido reducido ( $FADH_2$ ), producidos en el ciclo de Krebs, después de la oxidación de nutrientes como la glucosa. El  $O_2$  que se inspira en los pulmones es el aceptor final de  $e^-$ . Sin embargo, el  $O_2$  difunde libremente a través de las membranas, por lo que en su forma  $^1O_2$  puede encontrarse alrededor de la cadena respiratoria mitocondrial, reducirse y formar  $O_2^{\cdot-}$  en el complejo I (NADH-deshidrogenasa) y III (citocromo bc1). Parte del  $O_2^{\cdot-}$

producido en el espacio intermembranal es transportado al citoplasma mediante canales de aniones dependientes de voltaje. La enzima superóxido dismutasa (SOD) transforma al  $O_2^{\bullet-}$ , generado en la matriz mitocondrial, en  $H_2O_2$  (Aitken et al., 2012; Königsberg, 2008), (Figura 9).

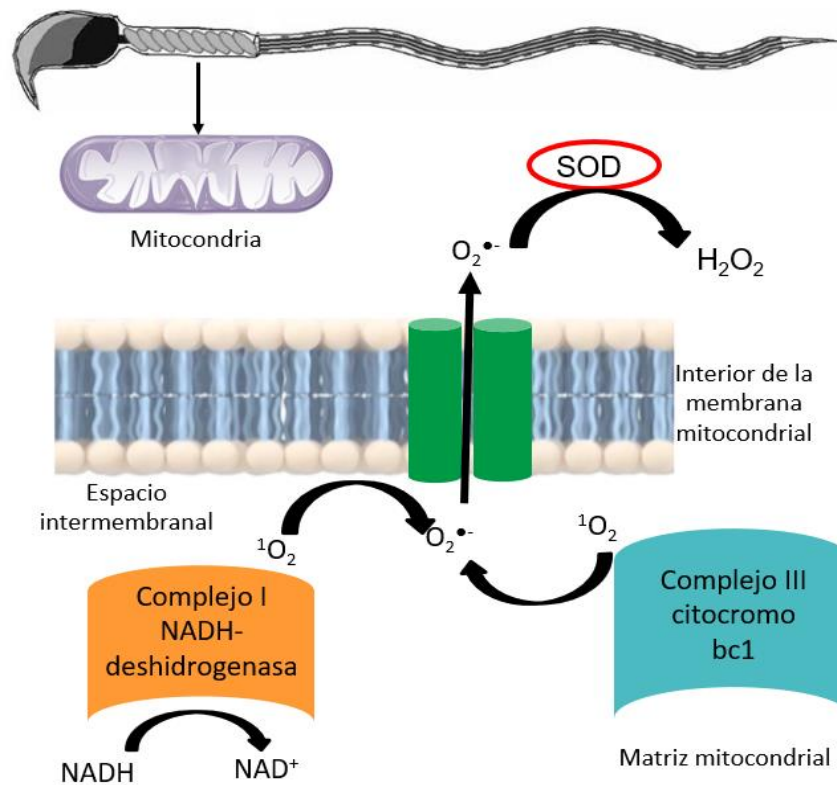


Figura 9. La mitocondria es la fuente principal de la producción de ERO por los espermatozoides es la mitocondria. (Adaptado de Castellini et al., 2021).

La NOX, está compuesta por la glicoproteína gp91phox unida a la proteína no glicosilada p22phox formando un complejo conocido como flavocitocromo b558 que está anclado a la membrana plasmática. El complejo posee dos grupos hemo y un grupo FAD. En el citoplasma, la NOX está compuesta por las subunidades citosólicas p40phox, p47phox y p67phox junto con la proteína GTPasa Rac (Königsberg, 2008). La activación de la enzima NOX puede ser inducida por DAG, hormonas como la angiotensina II, un miembro del grupo ERK1/2 p38MAPK o de la familia Akt (Covoy y Moran, 2012; Königsberg, 2008). A continuación, la subunidad p47phox se fosforila, lo cual genera un cambio conformacional que

induce la unión de las subunidades citosólicas junto con RAC y su translocación a la membrana plasmática, donde se ensamblan al complejo flavocitocromo b558 (Königsberg, 2008; Bedardy y Krause, 2007). En el citoplasma se produce el intercambio de GDP por GTP. La enzima NOX se activa al ensamblarse las proteínas citosólicas, las proteínas de la membrana y Rac (Covoy y Moran, 2012; Königsberg, 2008). Los  $e^-$  se transfieren del NADPH hacia el FAD y, posteriormente, a los grupos hemo (Königsberg, 2008; García-Triana et al., 2001). Cuando el  $O_2$  recibe un  $e^-$  se reduce para formar  $O_2^{\bullet-}$  (Covoy y Moran, 2012; Königsberg, 2008; Bedardy y Krause, 2007). El anión  $O_2^{\bullet-}$  dismuta en  $H_2O_2$  por la enzima superóxido dismutasa (SOD) que por interacción con iones metálicos  $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$ , genera radicales  $\cdot OH$  (Königsberg, 2008; Agarwal et al., 2006; Pryor et al., 2006) (Figura 10).

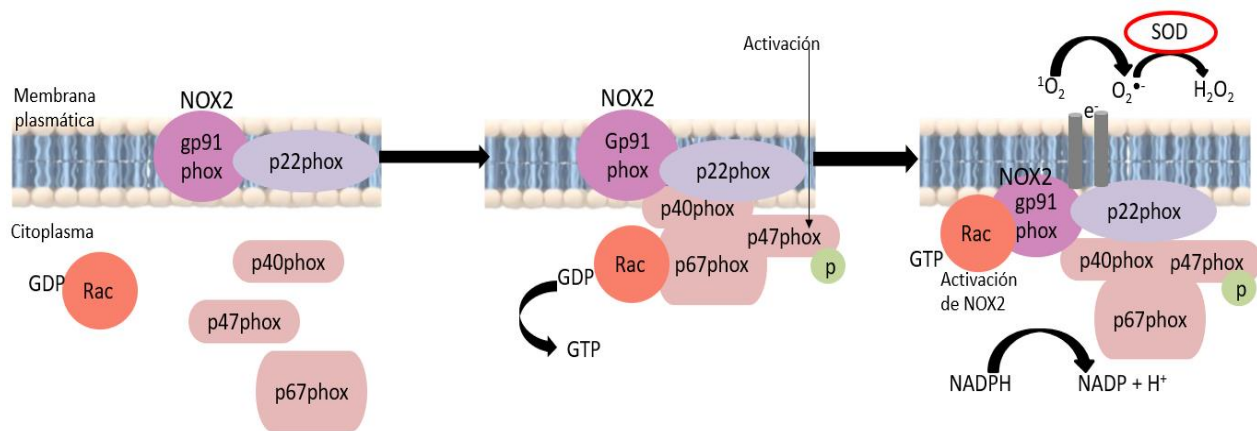


Figura 10. Ensamblaje y activación de la enzima NOX. (Adaptado de Juárez-Rojas et al., 2022)

## 1.8 PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA MADURACIÓN ESPERMÁTICA

Las ERO producidas por los espermatozoides durante su trayecto por el epidídimo, en niveles bajos y controlados, participan en el proceso de maduración espermática. Durante la diferenciación de espermátidas a espermatozoides se lleva a cabo la compactación inicial de la cromatina (de Kretser y Kerr 1994). En la espermiogénesis las histonas son reemplazadas por protaminas (proteínas ricas en residuos de cisteína) (Kerr et al., 2006) con la formación de puentes disulfuro

(-SS) mediante la oxidación de los grupos tiol (-SH) en los residuos de cisteína (Kaneko et al., 2002; Kerr et al., 2006). La compactación final de la cromatina se lleva a cabo en el epidídimo (Aitken y de Juliis, 2010; Dutta et al., 2019). La formación de -SS- inicia en el *caput* y termina en la *cauda* (Thompson et al., 2013). Los -SH de la cisteína son oxidados por el  $H_2O_2$  y se convierten en grupos sulfenilo (-SOH). Los -SOH son oxidados nuevamente por el  $H_2O_2$  y forman -SS- con un residuo tiol de otra cisteína unida al ADN (Figura 11).

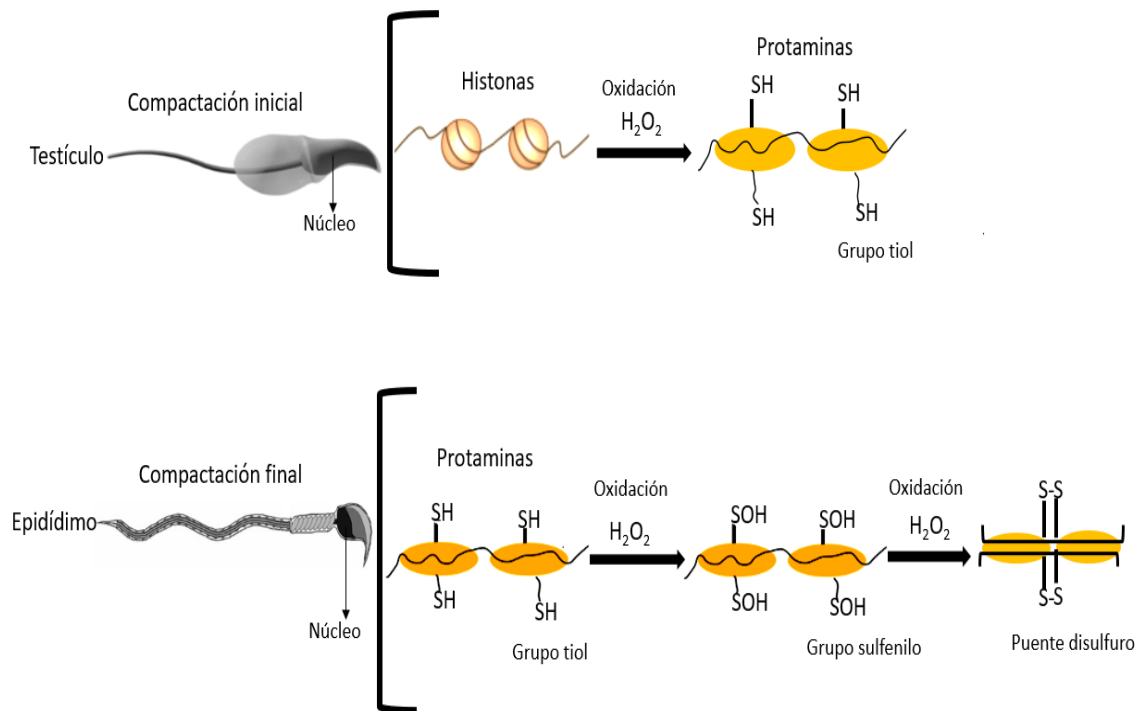


Figura 11. Compactación de la cromatina (Adaptado de Juárez-Rojas et al., 2022).

El  $O_2^{\bullet-}$  y el  $H_2O_2$  intervienen en la activación de la movilidad progresiva de los espermatozoides en el epidídimo (Du Plessis., 2015; Chen et al., 2013). Los iones de calcio ( $Ca^{2+}$ ) y bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) componentes del fluido luminal epididimario regulan la concentración intracelular de AMPc que genera la adenil ciclasa soluble (ACs), presente en la membrana plasmática de los espermatozoides (Hess et al., 2005; Ijiri et al., 2013). La ACs cataliza la conversión de ATP en AMPc (Pereira et al., 2017). Por otro lado, los iones bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) y el  $O_2^{\bullet-}$  activan a la ACs e incrementan la producción de AMPc, el cuál activa a la PKA (Dutta et al., 2019; Ijiri et al., 2013). La PKA fosforila residuos de tirosina en las proteínas de anclaje a la



cinasa A (AKAPS) y a la proteína dineína cuya actividad de ATPasa promueve el batido flagelar mediante el deslizamiento alternado de microtúbulos en toda la longitud del flagelo (Dacheux y Dacheux, 2013). Adicionalmente, la PKA activa la a la proteína tirosina cinasa (PTK), la activación depende del  $H_2O_2$  generado por la NOX en la membrana plasmática de los espermatozoides (Ghani et al. 2013). La fosfotirosina fosfatasa (PTP) desfosforila a la PTK e inhibe la fosforilación de la dineína y de los residuos de tirosina en las AKAPS (Dutta et al., 2019), (Figura 12).

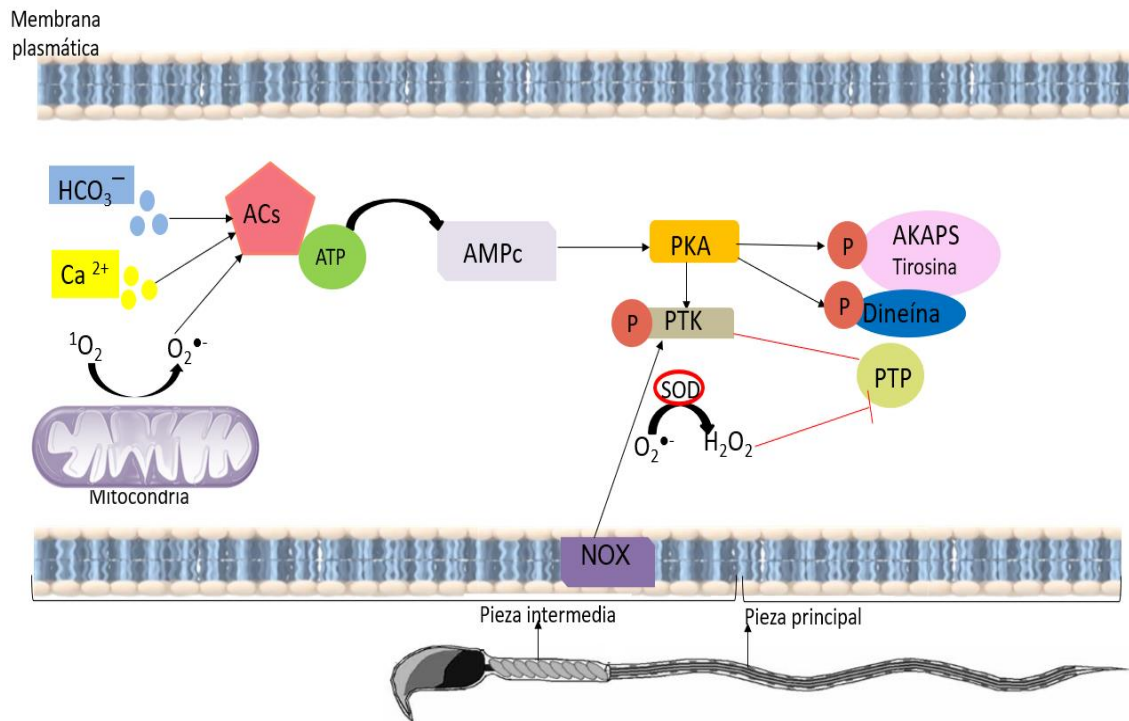


Figura 12. Activación de la movilidad progresiva en los espermatozoides en el epidídimo (Adaptado de Juárez-Rojas et al., 2022).

## 1.9 EFECTO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO

### 1.9.1 Peroxidación lipídica

Durante su trayecto por el epidídimo, los espermatozoides son susceptibles al daño oxidante, debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en su membrana plasmática, principalmente el ácido docosapentaenoico (DPA), en roedores, y el ácido docosahexaenoico (DHA) en los humanos (Collodel et al.,

2020) y son vulnerables a las ERO (Vernet et al., 2004). El incremento en la producción de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  y  $\cdot OH$  puede dañar las estructuras celulares mediante la peroxidación lipídica (Pryor et al., 2006). Las ERO sustraen un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado y generan un radical lipídico ( $R^{\bullet}$ ) que, al reaccionar con el  $O_2$ , forma un radical peroxilo ( $ROO^{\bullet}$ ). Los  $ROO^{\bullet}$  promueven la propagación de las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica al sustraer átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos insaturados cercanos y generando  $R^{\bullet}$  lipídicos nuevos e hidroperóxidos lipídicos ( $ROOH$ ); éstos se descomponen en radicales alcoxilo ( $RO^{\bullet}$ ) y  $ROO^{\bullet}$ , que contribuyen a la propagación del daño oxidante (Yin y Xu, 2011; Mates, 2000). La peroxidación lipídica genera aldehídos como el malondialdehído, el 4-hidroxinonenal (4HNE) y la acroleína (Jones et al., 1978; Moazamian et al., 2015). El 4HNE puede formar aductos (unión de dos moléculas mediante enlaces covalentes) con la proteína dineína del axonema y afectar la movilidad de los espermatozoides (Baker et al., 2015; Moazamian et al., 2015). Además, el 4HNE tiene la capacidad de unirse covalentemente a los centros nucleofílicos de proteínas como la enzima succinato deshidrogenasa, en la cadena respiratoria mitocondrial (Aitken et al., 2012, 2013), lo que causa la interrupción en el transporte y la fuga de  $e^-$ . La generación de aldehídos lipídicos y de ERO mitocondriales también contribuye a la propagación del daño oxidante (de Lamirande y Lamothe, 2009; Aitken et al., 2013), (Figura 13).

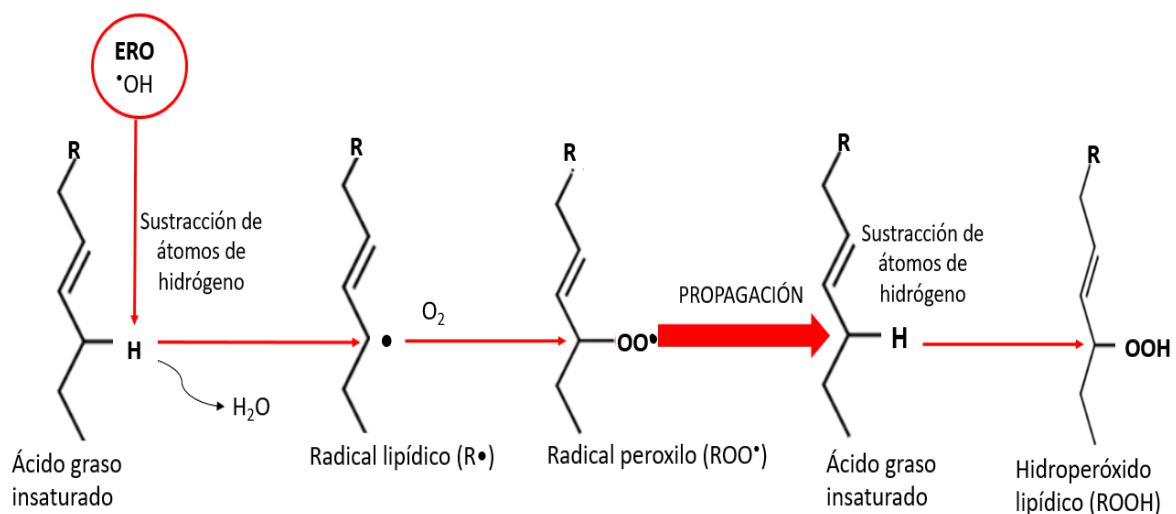


Figura 13. Peroxidación lipídica. (Adaptado de Aitken et al., 2016).

### 1.9.2 Daño en el ADN

El  $\cdot\text{OH}$  tiene la capacidad de disociar átomos de hidrógeno de la molécula del ADN o puede unirse a las bases nitrogenadas formando aductos. La guanina es la base nitrogenada más susceptible de ser oxidada por el  $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$  y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). La adición  $\cdot\text{OH}$  al C8 del segmento de guanina forma el 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8OHdG), producto principal de la oxidación de la adenosina mediada por el  $\cdot\text{OH}$  (Königsberg, 2008). En el núcleo y en las mitocondrias, los espermatozoides presentan la enzima 8-oxoguanina glicosilasa 1 (OGG1), que puede escindir y liberar al 8OHdG en el espacio extracelular; no obstante, los espermatozoides carecen de componentes posteriores para la reparación por escisión de bases (BER) como la endonucleasa apurínica 1 (APE1). Lo que genera sitios abásicos (AP) en aquellos lugares que han sido afectados por la formación del 8 OHdG (Smith et al., 2013). Los sitios abásicos desestabilizan el esqueleto de ribosa-fosfato, esto favorece una reacción de eliminación o de apertura del anillo de la unidad de ribosa y la consiguiente ruptura de la cadena. La oxidación de las bases del ADN es potencialmente mutagénica (la formación de 8 OHdG resulta en mutaciones de transversión G:C→T:A después de la replicación del ADN), si la lesión no se repara (Wood et al., 1992), y contribuye indirectamente a su fragmentación (Aitken, et al., 2016; Ohno et al., 2014; Wood et al., 1992).

### 1.10 SISTEMA ANTIOXIDANTE EN EL EPIDÍDIMO

El epidídimo dispone de un sistema de defensa antioxidante compuesto por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y las peroxirredoxinas, además de la glutatión-S-transferasa, la tiorredoxina y tiorredoxina reductasa la indolamina-2,3-dioxigenasa (Vernet et al., 2004) así como antioxidantes no enzimáticos como la vitamina C, la hipotaurina, la taurina, la L-carnitina, el alfa-tocoferol, el ácido ascórbico, el ácido úrico, el piruvato y la albúmina (Alvarez y Storey, 1983; Halliwell y Gutteridge, 1989) que protegen a los

espermatozoides del daño oxidante a medida que recorren el conducto epididimario (Figura 14).

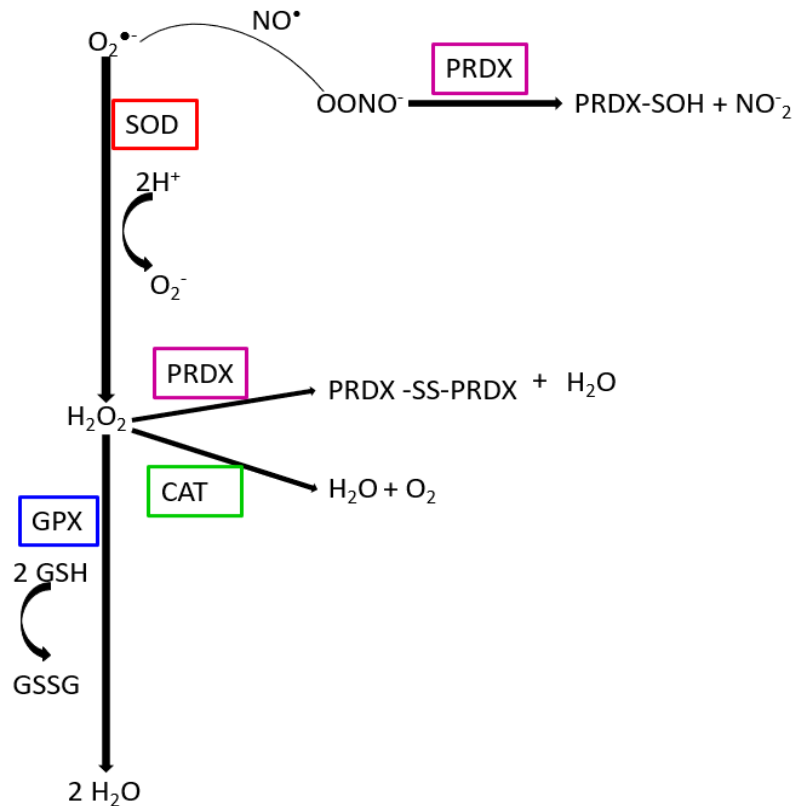


Figura 14. Sistema enzimático antioxidante en el epidídimo. El  $O_2^{\bullet-}$  es modulado por la SOD que lo convierte en  $H_2O_2$  y en  $O_2^{\bullet-}$ . La CAT, las PRDX y la GPx reducen al  $H_2O_2$  mediante reacciones que producen  $H_2O$  y  $O_2$ . Las PRDX también regulan al  $ONOO^-$  (Adaptado de O'Flaherty, 2019).

### 1.10.1 Superóxido dismutasa (SOD)

La enzima SOD dismuta al  $O_2^{\bullet-}$  y produce  $O_2$  y  $H_2O_2$  (O'Flaherty, 2014; Vernet et al., 2004). En el conducto epididimario, el ARNm de la isoforma SOD 1 (Cu/Zn) se expresa en niveles muy altos sin variaciones en las cuatro regiones anatómicas del epidídimo (Jervis y Robaire, 2001). En la cauda epididimaria la presencia de la SOD se relaciona con la protección de los espermatozoides ante el estrés oxidante durante su almacenamiento en esta región (Perry et al., 1993), ya que los espermatozoides poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana plasmática mientras que el contenido de sus enzimas antioxidantes es bajo debido a la pérdida del citoplasma (Tramer et al., 1998), (Figura 14).

### 1.10.2 Catalasa (CAT)

La catalasa es una enzima oxidorreductasa que reduce el  $H_2O_2$  en oxígeno y agua (Pryor et al., 2006) en los peroxisomas (O'Flaherty, 2014). En el epitelio del epidídimo la expresión del ARNm de la enzima CAT es muy baja (Zini y Schlegel, 1996; Bauché et al., 1994) por lo que la CAT no parece ser un participante importante en el control del estrés oxidante en el epidídimo (Vernet et al., 2004), (Figura 14).

### 1.10.3 Glutación peroxidasa (GPx)

La familia de la enzima glutación peroxidasa (GPx) se compone de 8 isoformas diferentes (GPx1 a GPx8) (Chabory et al., 2009; Sies et al., 1997), que reducen el  $H_2O_2$  utilizando como agente reductor el glutación reducido (GSH) y generando glutación oxidado (GSSG) (O'Flaherty, 2014).

El epitelio epididimario expresa las isoformas citosólicas GPx1 y GPx3 (Zini y Schlegel 1997; Schwaab et al., 1995). La actividad de la GPx1 es mayor en presencia de  $H_2O_2$  o de hidroperóxido de terc-butilo. La expresión de la GPx3 en el *caput* es baja e independiente de andrógenos. Mientras que la actividad de la GPx3 es regulada por andrógenos en el *corpus* y la *cauda* del epidídimo, región en donde se expresa en mayor medida (Schwaab et al., 1998). La isoforma citosólica, fosfolípido hidroperóxido glutación peroxidasa 4 (PHGPx4 o GPX4), se presenta particularmente en las células principales del epidídimo (Noblanc et al., 2011). La GPX4 se presenta en la cabeza, en la pieza media y en el núcleo de los espermatozoides epididimarios de la rata. En el núcleo, la GPX4 ejerce actividad tiol oxidasa en las protaminas mayormente en los espermatozoides de la región caudal, esto puede contribuir en la condensación nuclear durante el tránsito de los espermatozoides por el conducto epididimario. Lo que sugiere la participación de la isoforma en la maduración de los espermatozoides, a través del metabolismo de hidroperóxidos y oxidación de tioles, además de su función antioxidante (Godeas et al., 1997), (Figura 14).

La enzima glutatión peroxidasa 5 (GPx-5) es regulada por andrógenos y se caracteriza por la ausencia del residuo de selenocisteína en su sitio catalítico (Ghyselinck et al., 1993), que es reemplazado por un residuo de cisteína (Perry et al., 1992). La GPx-5 es secretada por las células principales en el *caput* del conducto epididimario hacia su luz. La GPx-5 se asocia a la membrana plasmática de los espermatozoides durante su recorrido por el conducto epididimario (Okamura et al., 1997; Vernet et al., 1997) a través de vesículas extracelulares (epididimosomas), unidas a la membrana, que se originan de las células principales del epidídimo mediante secreción apocrina. Esto implica la formación de protuberancias citoplásmicas, que contienen vesículas de varios tamaños en la zona apical de las células principales del epidídimo (Taylor et al., 2013). Cuando las protuberancias citoplásmicas se desprenden, liberan a los epididimosomas al ambiente luminal (Hermo y Jacks, 2002). Los epididimosomas tienen la capacidad de interactuar con los espermatozoides y transferirles proteínas (Sullivan y Saez, 2013). Las proteínas se asocian con dominios superficiales específicos de los espermatozoides, principalmente en la membrana que cubre el acrosoma y la pieza media (Eickhoff et al., 2001).

La GPx5 protege a los espermatozoides del daño oxidante mediado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En estudios *in vitro* se observó que, cuando la GPx5 no está presente en la luz del epidídimo, se favorece el estrés oxidante en la *cauda* epididimaria de ratas que carecen del gen que codifica para la enzima (GPx5<sup>-/-</sup>) (Chabory et al., 2009 a, b). Posteriormente, se demostró que ratas hembra, con fertilidad comprobada, apareadas con ratas macho carentes del gen para la GPx5 mayores un año, presentaron una tasa más alta de aborto espontáneo e incremento en defectos del desarrollo embrionario. Además, los espermatozoides almacenados en la *cauda* del epidídimo de los machos *knock out* para la GPx5<sup>-/-</sup> mostraron oxidación y fragmentación del ADN, asociado a un ligero estado de descompactación de los núcleos (Chabory et al., 2009 a, b).

#### 1.10.4 Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas (PRDX) constituyen una familia de peroxidases dependientes de tiol (-SH) (Wood et al., 2003; Rhee et al., 2005), poseen uno (isoforma PRDX6) o dos (isoformas PRDX1 a 5) residuos de cisteína (Cys) en su sitio activo. (Manevich y Fisher, 2005; Chen et al., 2000; Rhee et al., 2001; Fisher et al., 1999). Las seis isoformas de la familia PRDX se han estudiado en el ratón, en la rata y en el jabalí (Godoy et al., 2011; van Gestel et al., 2007; Fuji et al., 2001). Las PRDX actúan como reguladores del  $H_2O_2$  y peroxinitrito ( $OONO^{\cdot}$ ), resultado de la asociación de  $O_2^{\cdot-}$  y óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) (Fernandez y O'Flaherty, 2018; Rhee, 2016; O'Flaherty, 2014; Rhee 2012), (Figura 14).

La actividad peroxidasa de las PRDX es regulada por el estado de oxidación de los -SH en los sitios activos Cys (O'Flaherty, 2019). El aumento en la producción de  $H_2O_2$  promueve la oxidación de los -SH en el sitio activo 2-Cys (PRDX, isoforma 1 a 5) y 1-Cys (PRDX6), lo que inactiva la actividad peroxidasa de las PRDX (Peskin et al., 2007; Baty et al., 2005; Dubuisson et al., 2004; Peshenko y Shichi, 2001; Rhee et al., 2001). Para que la enzima pueda continuar eliminando  $H_2O_2$  los -SH oxidados en el sitio activo Cys deben reducirse nuevamente. La actividad peroxidasa se restaura mediante el sistema tiorredoxina (TRX)/tiorredoxina reductasa (TRD) (que utiliza NADPH como equivalentes reductores) en las PRDX isoformas 1 a 5 (Figura 15 A) y mediante la glutatión-S-transferasa pi (GSTpi)/GSH para la PRDX6 (Figura 15 B). Si la producción de  $H_2O_2$  se incrementa aún más, las PRDX se hiperoxidan y forman complejos de alto peso molecular que contienen dióxido de azufre ( $SO_2$ ). Sólo las isoformas 1 a 5 hiperoxidadas pueden restaurarse a su estado reducido y activo mediante reacciones enzimáticas mediadas por sulfirredoxina o sestrina que utilizan ATP y GSH (Figura 15 A). La PRDX6 hiperoxidada no puede reducirse y, por lo tanto, permanece irreversiblemente inactiva (O'Flaherty, 2019; O'Flaherty y de Souza, 2011; Gong et al., 2012; Woo et al., 2005), (Figura 15 B).

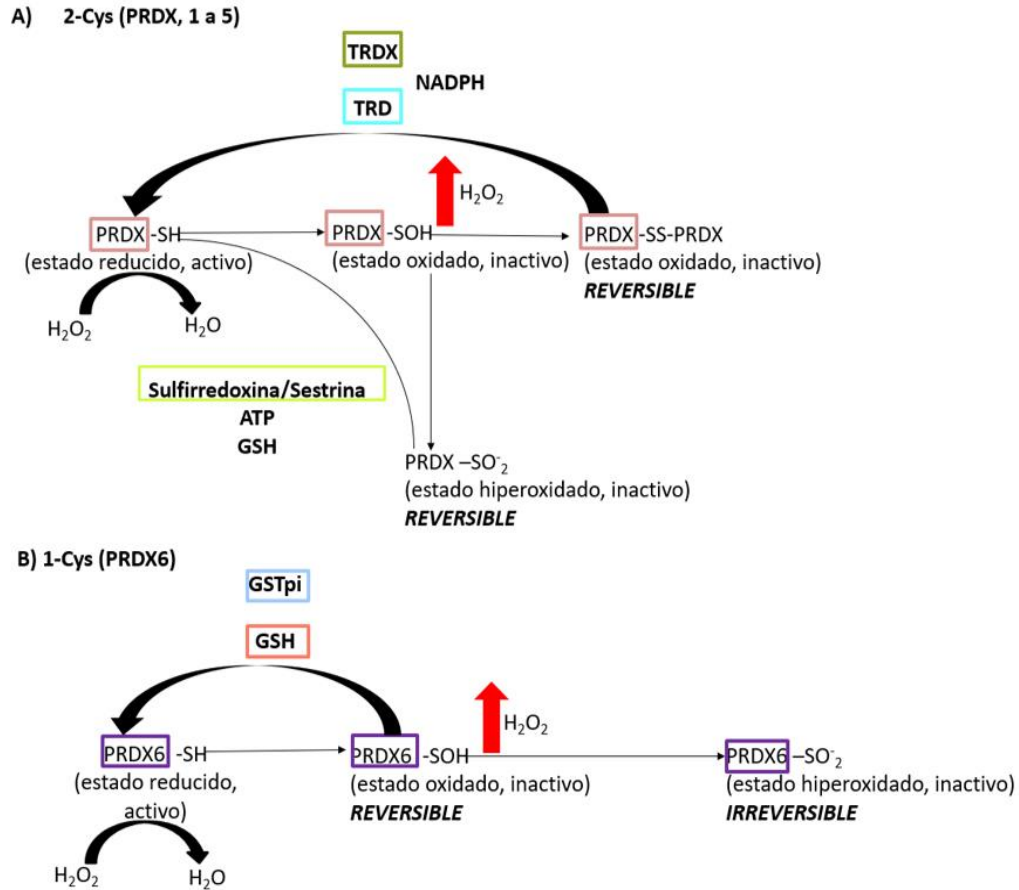


Figura 15. Reactivación de la actividad peroxidasa de las PRDX. A) PRDX isoformas 1 a 5. B) PRDX isoforma 6 (Adaptado de O'Flaherty, 2019).

A excepción de la isoforma 5, las PRDX se encuentran en gran medida en las células principales, basales y estrechas del epitelio del *caput* y *cauda* del epidídimo de rata (O'Flaherty, 2014; O'Flaherty y de Souza, 2011). En los espermatozoides de humano, la PRDX1 y PRDX3 se expresan en la pieza media; la PRDX2 se presenta en la región acrosómica; la PRDX4 en la forma p27 se encuentra en la membrana plasmática, el citosol y el acrosoma, en tanto que la forma p31 se localiza en la cabeza, particularmente en el acrosoma (O'Flaherty y de Souza, 2011); la PRDX5 se encuentra en la región acrosómica y la PRDX6 se expresa en la región post-acrosomal y la pieza principal (Shi et al., 2018). La PRDX6 es importante en la compactación de la cromatina. Cuando los -SH de las PRDX son oxidados por  $H_2O_2$  se genera ácido sulfénico (SOH) que, al interactuar con otro -SH, forma puentes -SS- (Ozkosem et al., 2016).



En estudios in vitro se observó que en los espermatozoides de la región caudal de ratones que carecen del gen que codifica para la Prdx6<sup>-/-</sup> mostraron incrementó en la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), la formación de 8OHdG, la oxidación de proteínas mediante S-glutationilación y formación de grupos carbonilo, fragmentación del ADN y baja compactación de la cromatina asociada a bajos niveles de protaminación y un alto porcentaje de -SH libres. Además, la movilidad de los espermatozoides de la cauda epididimaria fue menor. También se demostró que ratas macho carentes del gen para la Prdx6 con edad de 2, 8 y 20 meses apareadas con hembras fértiles de 8 meses de edad, produjeron un menor número de camadas, menor tamaño de camada y menor número total de crías por macho. Las crías engendradas por los machos Prdx6<sup>-/-</sup> requirieron más días para alcanzar el peso adecuado y ser destetadas (Ozkosem et al., 2015; Ozkosem et al., 2016).

## **2 ANTECEDENTES**

Aproximadamente el 16 % de las parejas a nivel mundial presenta problemas de infertilidad. Del total de los casos, el 50% se asocia con factores masculinos (Cui et al., 2016). Aunque se desconoce la etiología específica de la infertilidad masculina, las alteraciones en la función del sistema reproductor masculino por el estrés oxidante contribuyen con el 30-80% de los casos (Tremellen, 2008), por lo que actualmente se considera una de las principales causas de infertilidad en los varones.

Los testículos y el epidídimo producen enzimas antioxidantes que los protegen del daño oxidante; sin embargo, existen diversos factores que pueden generarlo, tales como: los contaminantes ambientales entre ellos los ftalatos, la 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), además de metales tóxicos como el plomo, manganeso, cadmio, cromo y mercurio (Sengupta, 2013); el consumo de tabaco, de alcohol y de otras drogas; la radiación por radiofrecuencia del espectro

electromagnético, emitida por los teléfonos móviles (Aitken et al., 2016; Birben et al., 2012; Agarwal et al., 2008) y enfermedades como el cáncer (Turner, 2001).

Otro de los factores que se ha relacionado recientemente con el estrés oxidante y la función reproductiva masculina es el estrés. Al respecto, se ha determinado que el aumento en la secreción de los GC durante la respuesta de estrés favorece el incremento en los niveles intracelulares de ERO (Agarwal et al., 2008; Tremellen, 2008; Iwasaki y Gagnon, 1992). Los GC, junto con las catecolaminas liberadas por la glándula suprarrenal durante la respuesta de estrés, facilitan la liberación de glucosa mediante la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la lipólisis (Teague et al., 2007) y aumentan la tasa metabólica, lo que incrementa la producción espontánea de ERO (Teague et al., 2007).

El incremento en la secreción de GC durante la respuesta de estrés inhibe la secreción de T en las células de Leydig. En un estudio realizado en ratas expuestas a estrés por inmersión en agua fría o choques eléctricos en las patas, se observó la disminución significativa en la concentración plasmática de T y un aumento significativo en la concentración plasmática de corticosterona (Retana-Márquez et al., 2003). La disminución en la concentración plasmática de T se atribuye a los GC que afectan la producción de T en las células de Leydig. De la misma manera, la exposición de ratas a estrés crónico impredecible durante 21 días consecutivos indujo apoptosis en las células de Leydig (Chen et al., 2012) mediante un mecanismo regulado por el receptor para glucocorticoides (RG), ubicado en el citoplasma de las células de Leydig (Sasagawa et al., 2001).

El estrés por inmersión en agua fría durante 20 a 50 días consecutivos genera la pérdida de células germinales y daño en el epitelio seminífero (Retana-Márquez et al., 2014; Juárez-Rojas et al., 2017) lo que muestra que el estrés afecta indirectamente al epitelio seminífero (Hou et al., 2014) mediante la disminución en la concentración plasmática de T (McAllan, 1998), lo que podría alterar el proceso de espermatogénesis. El estrés por nado forzado (15 minutos) seguido de estrés por inmovilización (1 hora) durante 60 días en ratas macho adultas, disminuye la concentración de espermatozoides en la cauda epididimaria e incrementa las

anormalidades de los espermatozoides; además, se observó pérdida de células germinales, principalmente espermatogonias tipo A, espermatocitos primarios en paquiteno, espermatidas redondas y alargadas (Nirupama et al., 2013). El estrés crónico impredecible durante 35 días consecutivos en ratas macho jóvenes (45–60 días de edad) genera la disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos y en el número de células germinales (Hou et al., 2014). Asimismo, el estrés crónico por inmersión en agua fría disminuye la concentración plasmática de T que se asocia a la pérdida y degeneración de las células germinales, principalmente espermatidas redondas y espermatocitos primarios (Juárez-Rojas et al., 2017). El estrés crónico por inmersión en agua fría induce la activación de la apoptosis en las células testiculares mediante las vías apoptóticas, tanto intrínseca como extrínseca (Juárez-Rojas et al., 2015).

El estrés psicológico en los hombres puede inhibir la función reproductiva masculina, afectando la calidad espermática al disminuir la concentración, el volumen y la movilidad de los espermatozoides (Nordkap et al., 2016; Eskiocak et al., 2006).

El estrés puede generar también estrés oxidante, incrementando la producción de ERO, la peroxidación lipídica y disminuyendo la actividad de las enzimas antioxidantes como la SOD, la CAT y la GPx4 en los testículos (García-Díaz et al., 2015; Al-Damegh, 2014; Nirupama et al., 2013; Priya y Reddy, 2012). Además, el estrés crónico por inmersión en agua fría durante 50 días consecutivos incrementa la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la concentración de peróxidos lipídicos y disminuye la actividad de las enzimas antioxidantes SOD1, CAT y GPx-4 en el testículo. Asimismo, aumenta la concentración sérica de corticosterona y reduce la concentración de T. También disminuye la movilidad, la concentración y la viabilidad de los espermatozoides de la *cauda* del epidídimo (García-Díaz et al., 2015). En un estudio donde se administró corticosterona sintética (3 mg/kg/día) en ratas macho, se observó el incremento en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en la concentración de peróxidos lipídicos en el testículo. La actividad de la SOD y CAT disminuyó y la concentración circulante de corticosterona aumentó (Dhanabalan y

Mathur 2009). La administración de la misma dosis de corticosterona sintética también incrementa la producción de  $H_2O_2$  y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y disminuye la actividad de la SOD y CAT (Dhanabalan et al., 2015).

Se ha observado que los efectos del estrés crónico son irreversibles, ya que, cuatro meses después de exponer ratas macho adultas a estrés crónico por nado forzado (15 minutos) y estrés por inmovilización (1 hora) durante 60 días, el número de espermatogonias tipo A, de espermátocitos primarios en paquiteno, de espermátidas redondas y alargadas se mantuvo disminuido, y el porcentaje de anomalías en los espermatozoides se mantuvo elevado, en comparación con los animales del grupo control. Asimismo, la actividad de las enzimas SOD, CAT y GST se mantuvo baja en los testículos de las ratas después de cuatro meses de haber sido expuestas a los estresores por 60 días, en comparación con las ratas del grupo control. (Nirupama et al., 2013).

Con respecto al epidídimo, existen pocos estudios sobre los efectos del estrés crónico en el estado oxidante del epidídimo y las repercusiones que podría tener en los espermatozoides en proceso de maduración dentro de este órgano. En este sentido, se ha reportado que el estrés crónico por inmovilización (5 horas/día) durante 15 días en ratas macho, incrementa la producción de  $H_2O_2$  y de peróxidos lipídicos en el *caput*, *corpus* y *cauda* del epidídimo y además reduce la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en las tres regiones del conducto epididimario. Asimismo, incrementa la concentración de corticosterona sérica y disminuye la concentración de T. La movilidad, la viabilidad y la concentración de espermatozoides en la *cauda* del epidídimo también disminuye. Estos datos muestran que el estrés crónico por inmovilización induce daño oxidante en el epidídimo, causando aumento de la peroxidación lipídica y en la producción de  $H_2O_2$ , así como disminución en la actividad de las enzimas SOD y CAT (Dhanabalan et al., 2011).

### **3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La respuesta de estrés causa aumento en la producción de ERO, peroxidación lipídica y disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en el testículo y en el epidídimo, causando una condición de estrés oxidante en ambos órganos. El estrés oxidante se ha relacionado con el aumento en la concentración sérica de corticosterona y la disminución de T, lo que causa la disminución en la movilidad, la viabilidad y la concentración de los espermatozoides epididimarios. Sin embargo, actualmente no existen investigaciones que evalúen la expresión del ARNm y el contenido de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx4, así como la producción de otras ERO como el  $O_2^{\bullet-}$  en el conducto epididimario.

### **4 JUSTIFICACIÓN**

Los cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos que experimentan los espermatozoides durante su trayecto por el epidídimo en el proceso de maduración son necesarios para que adquieran su movilidad progresiva y la capacidad para llevar a cabo la reacción acrosomal y fertilizar al ovocito. Por ello, cualquier alteración en la maduración espermática podría generar problemas en la función reproductiva masculina. La investigación actual en cuanto al estrés y su relación con el estrés oxidante se ha centrado en los efectos sobre los testículos. Sin embargo, en la actualidad existen pocas investigaciones enfocadas en determinar la relación directa entre el estrés crónico y el estrés oxidante generado en el epidídimo, lo que podría alterar el proceso de maduración de los espermatozoides. Por lo anterior, es importante estudiar los efectos del estrés crónico en el estado oxidante del epidídimo, evaluando el contenido de ERO, de las enzimas antioxidantes, así como la expresión de los ARNm, ya que el estrés oxidante podría causar baja calidad de los espermatozoides epididimarios y ser un factor importante en la infertilidad masculina.

## **5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿De qué manera el estrés crónico genera estrés oxidante en el epidídimo y cómo afecta ello la calidad de los espermatozoides?

## **6 HIPÓTESIS**

El estrés crónico aumentará la producción de ERO en el epidídimo y disminuirá la expresión del ARNm y el contenido de las enzimas antioxidantes, lo que provocará daño oxidante que se verá reflejado en la disminución de la calidad de los espermatozoides epididimarios.

## **7 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto del estrés crónico en la respuesta oxidante del epidídimo y su repercusión en la calidad de los espermatozoides epididimarios de la rata adulta.

### **7.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar el estado oxidante del epidídimo en machos estresados crónicamente.
2. Evaluar los efectos del estrés crónico en el sistema antioxidante del epidídimo.
3. Determinar los efectos del estrés crónico en la calidad de los espermatozoides epididimarios.
4. Evaluar la activación del eje HHA y su efecto en el eje HHT durante el estrés crónico.

## 8 MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Neuropsicoendocrinología del Departamento de Biología de la Reproducción y en el laboratorio de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa (UAM-I), en conjunto con el Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, en la División de Enfermedades Musculoesqueléticas y Reumáticas.

La manipulación de los organismos y el método de eutanasia se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), así como con los lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa.

### 8.1 MODELO BIOLÓGICO

Se utilizó un total de 20 ratas macho albinas de la cepa Wistar, de tres meses de edad y peso corporal de 300 a 350 g. Se colocaron 10 animales por caja (50 X 30 X 20 cm) y se aclimataron durante una semana. Se mantuvieron en condiciones habituales de bioterio, con temperatura controlada de  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa de 60% y con un ciclo de luz-oscuridad invertido 12:12 horas. La luz se encendió a las 21:00 h y se apagó a las 9:00 h. El trabajo experimental se realizó en la fase activa de los animales, es decir, la fase de oscuridad. El consumo de alimento y agua fue ad libitum para todos los animales.

### 8.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales ( $n=20$ ) se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos de trabajo: a) el grupo control ( $n=10$ ) y b) el grupo de estrés crónico ( $n=10$ ). Los animales del grupo control se manipularon únicamente para registrar diariamente su peso corporal. Los animales del grupo de estrés crónico se sometieron a estrés por inmersión en agua fría, 15 minutos al día, durante 50 días consecutivos. La figura 16 muestra el esquema del diseño experimental.

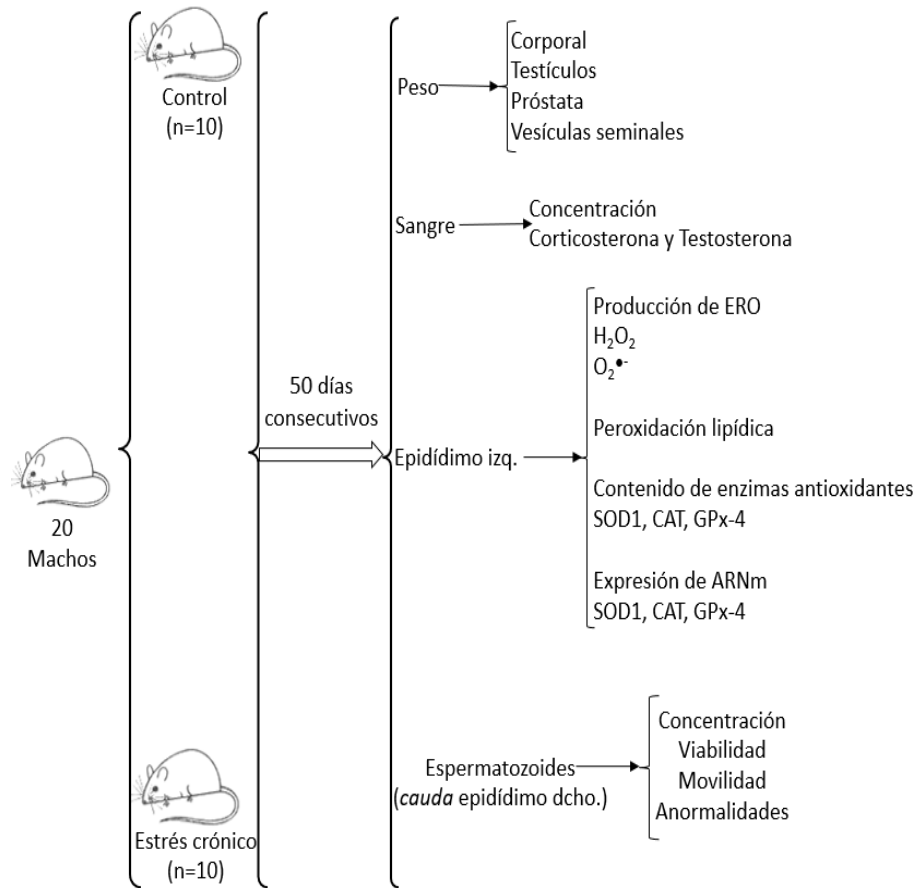


Figura 16. Esquema representativo del diseño experimental

### 8.3 ESTRÉS CRÓNICO POR INMERSIÓN EN AGUA FRÍA

La inducción de estrés crónico se llevó a cabo en la fase oscura del ciclo de luz-oscuridad, entre las 9:00 y las 10:00 h. Para ello, las ratas del grupo de estrés crónico se colocaron de manera individual en un tanque de agua a una temperatura de 15°C, a una profundidad de 15.5 cm, durante 15 minutos por día. Los animales permanecieron en posición vertical de pie sobre sus patas traseras y por encima del nivel del agua. Este procedimiento se realizó durante 50 días consecutivos (Figura 17).





Figura 17. Rata macho sometida a estrés crónico por inmersión en agua fría.

#### 8.4 REGISTRO DEL PESO CORPORAL

El peso corporal de los machos del grupo control y del grupo de estrés crónico se registró de manera rutinaria a las 8:30 h desde el inicio hasta el final del experimento.

#### 8.5 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Al finalizar los 50 días, los animales de ambos grupos se anestesiaron mediante la aplicación vía intraperitoneal, de una dosis de pentobarbital sódico (25 mg/kg de peso corporal). Se realizó una incisión en la línea media del abdomen de los animales, se extrajeron los testículos, los epidídimos, las vesículas seminales y la próstata. Se pesaron las glándulas accesorias. La cauda del epidídimo derecho se colocó en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.03 mM y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.47 mM, pH 7.4) a 37°C. Se realizó un corte a la región caudal para liberar los espermatozoides y que estos se distribuyeran homogéneamente en la solución amortiguadora para su análisis. El epidídimo izquierdo se dividió en fragmentos de acuerdo con las regiones anatómicas: caput, corpus y cauda para evaluar la producción de peróxidos y

superóxidos. Se almacenaron las tres regiones del epidídimo a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se utilizaron para determinar la peroxidación lipídica, el contenido de enzimas antioxidantes y la expresión de genes SOD1, CAT y GPx4 mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Además, se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca para evaluar las concentraciones de corticosterona y T.

## 8.6 ANÁLISIS ESPERMÁTICO

### 8.6.1 Movilidad

Se colocaron  $10\ \mu\text{L}$  del homogenizado de los espermatozoides sobre un portaobjetos, previamente atemperado a  $37^{\circ}\text{C}$  y se cubrieron con un cubreobjetos ( $50 \times 24\ \text{mm}$ ) previamente atemperado. La preparación se analizó en un microscopio de campo claro con el objetivo 40X para el conteo de 200 espermatozoides con un contador manual. Se registraron los espermatozoides que presentaron movilidad progresiva y no progresiva. Los espermatozoides restantes se contabilizaron como inmóviles. La movilidad se expresó como el porcentaje de espermatozoides móviles del total de espermatozoides contados.

### 8.6.2 Viabilidad

Se colocaron  $10\ \mu\text{L}$  del homogenizado de los espermatozoides sobre un portaobjetos previamente atemperado a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se colocaron  $10\ \mu\text{L}$  de colorante (preparado con 1% de eosina, 5% de nigrosina y 2.9 % de citrato de sodio) sobre la muestra y se cubrió con un cubreobjetos  $50 \times 24\ \text{mm}$  previamente atemperado a  $37^{\circ}\text{C}$ . El portaobjetos se colocó en un microscopio de campo claro con el objetivo de 40X y se contaron 200 espermatozoides con un contador manual. Los espermatozoides que no se tiñeron se consideraron vivos y los que se tiñeron de rosa se consideraron muertos. El resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides vivos.

### 8.6.3 Concentración

Se determinó con una cámara de recuento celular (Neubauer-improved, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany). Para ello se tomaron 25  $\mu\text{L}$  del homogenizado de espermatozoides y se colocaron en 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada; de esta mezcla se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se colocaron en uno de los extremos de la cámara hasta la cuadrícula central. Se colocaron otros 10  $\mu\text{L}$  en el otro extremo de la cámara hasta la segunda cuadrícula central. El conteo de los espermatozoides se realizó en 8 subcuadros específicos, en un microscopio de campo claro con el objetivo de 40X. Se contaron los espermatozoides cuyas cabezas se encontraban dentro de los subcuadros pequeños. Para calcular la concentración de los espermatozoides se usó la siguiente fórmula: el número de espermatozoides contados X el factor de dilución (21) X el número de subcuadros que se contaron (8) X la profundidad de la cámara de Neubauer (10, 000) / el número de cuadrículas que se usaron (2). La concentración se expresó en millones por mililitro.

### 8.6.4 Morfología.

Se evaluó en la muestra previamente utilizada para determinar la viabilidad. Se contaron 500 espermatozoides al azar en diferentes campos, en un microscopio de campo claro con el objetivo 40X. La morfología se expresó en porcentaje.

## 8.7 DETERMINACIÓN DE CORTICOSTERONA Y TESTOSTERONA

### 8.7.1 Obtención de muestras de sangre

Se obtuvieron de 3 a 4 mL de sangre de cada animal mediante punción cardíaca. La sangre se depositó en tubos de ensayo y se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos para separar el suero, este se colocó en tubos de ensayo nuevos y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para determinar posteriormente la concentración sérica de corticosterona y T por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

### 8.7.2 Extracción de las hormonas

La extracción de la corticosterona y la T se realizó de acuerdo con una modificación del método reportado por Woodward y Emery (1987). A 1 mL de suero se le añadieron 100 µL de hidróxido de sodio 0.03 M y 5 mL de éter dietílico-diclorometano (proporción V/V 60:40); la mezcla se agitó durante 2 minutos en vórtex y se centrifugó durante 5 minutos a 2500 rpm. Se obtuvo la fase orgánica y se agregó 1 mL de agua grado HPLC, se agitó en vórtex durante dos minutos y se centrifugó nuevamente por 5 minutos. Se separó la fase orgánica (3 mL) y se dejó evaporar a temperatura ambiente. Los residuos se redisolviaron en 100 mL de una mezcla de metanol y agua (65:35 v/v).

### 8.7.3 Cuantificación de corticosterona y testosterona

La pre- columna (Symmetry C18, tamaño de la partícula de 3.5 µm, tamaño de la pre-columna 2.1 x 10 mm; Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA) y la columna (Symmetry C18, tamaño de la partícula de 5 µm, tamaño de la columna 2.0 X 150 mm; Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA) se equilibraron con acetonitrilo-agua grado HPLC (65:35 v/v), a una velocidad de flujo de 0.4 mL/min. Las separaciones se hicieron en la columna a una temperatura de 40° C.

Se utilizó un sistema controlador Waters 600 MS para separar la fase móvil y las hormonas se evaluaron con un detector ultravioleta (486 Waters UV absorbance detector), a una absorbancia de 245 nm. Para calibrar se usaron estándares que cubrieron el rango de 0-500 µg/dL para la corticosterona y 0-30 ng/mL para la T. Se calculó la regresión lineal de las hormonas y se utilizó para determinar las concentraciones de las muestras. La curva de regresión lineal para la corticosterona fue:  $y = -0.6464 + 0.01655x$ , ( $r^2=0.99986$ ). La regresión lineal para la T fue de  $y = 0.774 + 0.2181x$ , ( $r^2=0.99893$ ). El límite de detección del ensayo para la corticosterona fue de 0.5 µg/dL y para la T fue de 0.05 ng/mL.

## 8.8 PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

### 8.8.1 Producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Se determinó mediante la fluorescencia de la diclorofluoresceína (DCF); la técnica tiene como base la oxidación de la sonda 2',7'- diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA, SIGMA) que no es fluorescente, pero en presencia de peróxido se convierte en un producto verde fluorescente (DCF).

Se pesó 0.1 g para cada una de las regiones epididimarias: *caput*, *corpus* y *cauda* y se homogenizaron en 300 µL de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Se tomaron 200 µL del homogenizado, se colocaron en una microplaca, se agregó la DCFH-DA (10 µM) y se incubaron a 37 °C en la oscuridad. Luego de 30 minutos de incubación se registró la fluorescencia de la DCF en un espectrofotómetro DTX 880 detector multimodal fluorescente (Beckman Coulter) a 480 nm de excitación y 520 nm de emisión. Se recuperaron 200 µl del homogenizado para determinar la cantidad de proteínas totales contenidas en cada una de las muestras usando el método del ácido bicinonínico (BCA) y el uso de un lector de microplacas (iMark, Bio-Rad). Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia que se normalizaron con la cantidad de proteína contenida en cada muestra.

### 8.8.2 Producción de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

Se determinó mediante la reacción del compuesto dihidroetidio (DHE) que es una sonda permeable que emite fluorescencia azul dentro de la célula si no ha sido oxidado, al reaccionar con el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) genera 2-hidroetidio que está cargado positivamente lo que permite que se una al ADN y emita una fluorescencia roja.

Se pesaron 0.1 g para cada una de las regiones epididimarias: *caput*, *corpus* y *cauda*, se homogenizaron en 600 µL de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Se tomaron 100 µL del homogenizado, se colocaron en una microplaca, se agregaron 100 µL de DHE (10 µM) y se incubaron a 37 °C en la oscuridad.

Después de 15 minutos de incubación se registró la fluorescencia del DHE en un espectrofotómetro DTX 880 detector multimodal fluorescente (Beckman Coulter) a 485 nm de excitación y 560 nm de emisión. Se recuperaron los 100  $\mu$ L del homogenizado y posteriormente se determinó la cantidad de proteínas totales contenidas en cada muestra a través del método del ácido bicinconínico (BCA) en un lector de microplacas (iMark, Bio-Rad). Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia.

### 8.8.3 Contenido de proteínas totales

Se determinó mediante la técnica del ácido bicinconínico (BCA). Se utilizó el kit BCA (Pierce). Para determinar las concentraciones desconocidas de las proteínas se compararon diluciones en serie (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000  $\mu$ g/mL) de concentraciones conocidas de proteínas estándar de albúmina sérica bovina (BSA). En una microplaca se colocaron 25  $\mu$ L de cada una de las diluciones y 5  $\mu$ L de cada una de las muestras obtenidas en la técnica de producción de peróxido y superóxido. Se agregaron 20  $\mu$ L de agua libre de nucleasas a cada muestra. La microplaca se incubó a 37 °C en la oscuridad durante 30 minutos. Se determinó el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (iMark, Bio-Rad). Las concentraciones de las proteínas desconocidas se determinaron interpolando los valores elaborados a partir de una curva estándar de los valores de BSA.

## 8.9 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La peroxidación de lípidos se determinó con base en la cantidad de sustancias reactivas al ácido-2-tiobarbitúrico (TBARS) y se expresó en equivalentes de malondialdehído (MDA). El MDA es producto de la peroxidación de lípidos y al reaccionar con el ácido-2-tiobarbitúrico (TBARS) forma un complejo color rosa. Se pesaron 0.05 g de cada una de las regiones epididimarias: *caput*, *corpus* y *cauda*. El tejido se colocó en microtubos rotulados para cada región y se homogenizó con 500  $\mu$ L de agua desionizada usando un pistilo de propileno. Se

tomaron 300  $\mu\text{L}$  del homogenizado y se vació en microtubos nuevos, se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de Tris HCl 150 mM pH 7.4 y 200  $\mu\text{L}$  de solución reactiva TCA-TBA- HCl (ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico, ácido clorhídrico). Se incubó en baño maría a 85°C durante 45 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se dejaron enfriar los microtubos a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Se recuperaron 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se colocaron en un pocillo individual de una microplaca. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 535 nm en un espectrofotómetro DTX 880 detector multimodal fluorescente (Beckman Coulter). Se conservaron 200  $\mu\text{L}$  del homogenizado para determinar la cantidad de proteínas totales contenidas en cada muestra mediante el método del ácido bicinconínico (BCA). Los resultados se expresaron como equivalentes de malonaldehído (MDA).

## 8.10 CONTENIDO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

### 8.10.1 Extracción de proteínas

Para obtener las proteínas se usaron muestras de *caput*, *corpus* y *cauda* conservados a -80°C. Una vez descongeladas las muestras, el tejido se homogenizó en su totalidad con 300  $\mu\text{L}$  de PBS (pH 7.4) mediante disrupción mecánica. Se centrifugó a 12, 000 rpm durante 30 segundos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se homogenizó por completo en 300  $\mu\text{L}$  de Buffer de lisis [T-PER Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific, Complete Mini protease Inhibidor cocktail; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.01M, 1,4 dithiothreitol (DTT) 0.2 M, fluoruro sódico (NaF) 0.01M y metavanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) 0.2M] con un homogenizador mecánico. Se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes de cada muestra y se colocaron en tubos nuevos rotulados para cada región epididimaria, y se conservaron en hielo. A partir de los sobrenadantes obtenidos se cuantificó la concentración de las proteínas totales en el espectrofotómetro (The Thermo Scientific NanoDrop 2000c) en un rango de

absorbancia de 280 nm.

#### 8.10.2 Preparación de las proteínas

Se colocaron 3  $\mu$ L de buffer de muestra (SDS Protein Gel Loading Solution 2x, Quality Biological, Inc) en tubos de microcentrífuga rotulados previamente para cada región del epidídimo y se agregó el volumen de la proteína equivalente a 100  $\mu$ g de proteínas totales de cada una de las muestras, los tubos se incubaron a baño maría por 5 minutos a 95°C.

#### 8.10.3 Preparación de los geles

Se prepararon 10 mL de gel concentrador al 4%, con 3.05 mL de agua desionizada estéril, 1.25 mL de Tris-base 0.5 M pH 6.8, 50  $\mu$ l de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10%, 650  $\mu$ L de acrilamida-bis, 5  $\mu$ L de tetrametiletilendiamina (TEMED) y 25  $\mu$ L de persulfato de amonio. Para el gel de corrida se prepararon 10 mL al 10% usando 4.02 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris-base 1.5 M pH 8.8, 100  $\mu$ L de SDS al 10%, 3.33 mL de acrilamida-bis, 10  $\mu$ L de TEMED y 50  $\mu$ L de persulfato de amonio.

#### 8.10.4 Electroforesis de las proteínas totales

Los geles preparados previamente se colocaron en una cámara de electroforesis vertical (Bio-Rad) y se agregó buffer de electroforesis (Tris-base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 1%). Se colocó en los carriles del gel 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular y en cada uno de los pocillos restantes cada una de las muestras. La electroforesis se corrió a 120 V durante 90 minutos. Una vez finalizado el periodo de corrida se recuperaron los geles y se colocaron en buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%). Para la transferencia de las proteínas se montó papel filtro, membrana difluoruro de polivinilideno (PVDF) en contacto con el gel y nuevamente papel filtro previamente sumergidos en buffer de transferencia.



#### 8.10.5 Transferencia de las proteínas totales

Una vez listos todos los componentes, se colocaron en el sistema de transferencia Bio-Rad, se cubrió completamente con buffer de transferencia frío. La transferencia se corrió a 120 V durante 90 minutos a una temperatura de 4°C.

#### 8.10.6 Anticuerpos primarios, secundarios y revelado

Una vez transcurridos los 90 minutos se sacaron las membranas de la cámara con el lado de transferencia hacia arriba y se bloquearon con leche descremada al 5% disuelta en TBS-Tween 20 (NaCl 137 Mm, Tris-base 20 Mm, Tween-20 0.05%, pH 7.6) durante 20 minutos, en agitación suave. Al finalizar, se lavaron las membranas tres veces con TBS-Tween 20 para eliminar el exceso de leche. Después de los lavados se incubaron las membranas con su respectivo anticuerpo primario: mouse monoclonal anti-SOD-1 (B-1, cat. n.º sc-271014, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA); mouse monoclonal anti-CAT (Cat. n.º C0979, Sigma-Aldrich); mouse monoclonal anti-GPx-4 (E-12, cat. n.º sc-166570, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) a una dilución 1:1000 (10 µL de anticuerpo, disuelto en 10 mL de TBS-Tween 20, respectivamente) a una temperatura de 4°C, en agitación suave y durante toda la noche. Al finalizar el tiempo de incubación de los anticuerpos primarios se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos con TBS-Tween 20 y posteriormente se incubaron con su anticuerpo secundario horse anti-mouse IgG antibody, peroxidase (Cat. No. PI-2000-1, Vector Laboratories) a una dilución 1:10,000 (1 µL de anticuerpo secundario disuelto en 10 mL de TBS-Tween 20, respectivamente) a temperatura ambiente durante 120 minutos y agitación suave. A continuación, se lavó 3 veces la membrana con TBS-Tween durante 10 minutos. Para revelar las membranas se utilizó el kit Clarity Western ECL Subs, (BioRad) el cual se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante: en un tubo de microcentrífuga se colocaron 1000 µL del sustrato luminiscente y 500 µL de peróxido de hidrógeno. Las membranas se colocaron en la placa reveladora dentro del fotodocumentador (KODAK Gel Logic 1500 Imaging System) para determinar la intensidad de las

bandas de las proteínas de interés. Para corroborar la carga completa de proteínas las membranas se incubaron con  $\beta$ -actina (mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin-peroxidase, cat. n.º A3854, Sigma-Aldrich) a una dilución 1:10,000 (1  $\mu$ L de  $\beta$ -actina disuelto en 10 mL de TBS-Tween 20).

## 8.11 EXPRESIÓN DE ARNm DE LAS PROTEÍNAS SOD1, CAT Y GPX-4

### 8.11.1 Extracción de ARN por el método del trizol.

Se usaron muestras de *caput*, *corpus* y *cauda* conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se descongelaron las muestras y se homogenizaron con 300  $\mu$ L de PBS (pH 7.4) con un pistilo de propileno. Se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 140  $\mu$ L de cloroformo y se dejaron en reposo nuevamente durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron a 13,300 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó la fase acuosa, tomando sólo la parte traslúcida y se transfirió a tubos nuevos rotulados previamente. A cada tubo se le agregaron 700  $\mu$ L de isopropanol frío y se homogenizaron mediante inversión y se dejaron reposar toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 13,300 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 700  $\mu$ L de etanol al 75%, se homogenizaron en vórtex durante 15 segundos y se centrifugaron nuevamente a 13,300 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se decantó el sobrenadante. La adición de etanol al 75%, el homogenizado en el vórtex, la centrifugación y la eliminación del sobrenadante se repitió 2 veces. Al finalizar el procedimiento se secó el pellet sobre una superficie estéril. Se resuspendió en agua libre de ARNsas (20 a 100  $\mu$ L). Se analizó la concentración y pureza del ARN extraído en el espectrofotómetro NanoDrop, absorbancia 260 nm y longitud de onda 260-280 nm.

### 8.11.2 Obtención de ADN complementario

Se empleó el método de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en transcripción inversa) y se utilizó el kit de transcripción inversa QuantiTect (Qiagen). En un microtubo individual para el ARN extraído de cada una de las muestras se añadieron los elementos que se observan en la tabla 1 y se incubaron en el equipo termociclador Rotor-Gene (Qiagen) durante 2 minutos a 42°C. La muestra se dejó reposar durante 2 minutos en hielo.

Tabla 1. Componentes para la reacción de eliminación del ADN genómico.

Componente	Volúmen
gADN Wipeout Buffer, 7x	2 µL
ARN	0.65 µg
Agua libre de ARNsas	Hasta un volumen total de 14 µL

Se preparó la mezcla de transcripción inversa de acuerdo con los componentes señalados en la tabla 2 para la síntesis de ADN complementario (ADNc) para cada una de las muestras y se incubó en el equipo termociclador Rotor- Gene (Qiagen) durante 15 minutos a 42°C y posteriormente 3 minutos a 95°C. El ADNc sintetizado se almacenó a -20° para su uso posterior en el PCR en tiempo real.

Tabla 2. Componentes para la reacción de eliminación del ADN genómico.

Componente	Volúmen
Reverse-transcription master mix	1 µL
Quantiscript RT Buffer, 5X	4 µL
RT Primer Mix	1 µL
ARN de la reacción anterior	14 µL

### 8.11.3 Diseño de los oligonucleótidos o primers.

Se consultó la página National Center for Biotechnology Information (NCBI) para obtener información de la secuencia de los genes de las proteínas SOD1, CAT y GPx-4. El diseño de los oligonucleótidos o primers específicos para la PCR se realizó en la página Integrated DNA Technologies y se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Diseño de oligonucleótidos para SOD1, CAT, GPX-4 y GAPDH.

	Oligonucleótido forward	Oligonucleótido reverse
SOD1	5'GCGGATGAAGAGAGGCATGT 3'	5' GGGCAATCCCAATCACACCA 3'
CAT	5' AGAGGAAACGCCTGTGTGAG 3'	5' TAGTCAGGGTGGACGTCAGT 3'
GPx-4	5' ATTCCCGAGCCTTTCAACCC 3'	5' TATCGGGCATGCAGATCGAC 3'
Gen constitutivo GAPDH	5' CCGCATCTTCTTGTGCAGTG 3'	5' ACCAGCTTCCCATTCTCAGC 3'

### 8.11.4 PCR en tiempo real

La amplificación del gen para las enzimas SOD1, CAT y GPX-4 se realizó mediante la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real (QT-PCR). Se utilizó el ADNc (1000 µg) obtenido de las muestras de *caput*, *corpus* y *cauda* y los primers específicos para el ARN (10 µM). Para las reacciones de la PCR se utilizó el equipo termociclador Rotor-Gene (Qiagen). Como gen constitutivo se utilizó GADPH. La composición de la solución necesaria para las reacciones de PCR del gen constitutivo GADPH, el gen SOD1 y el gen CAT se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Composición de la solución de PCR utilizada para el gen constitutivo GADPH, gen SOD1 y el gen CAT.

Componente	Volumen por muestra
Sybr mix green	10 $\mu$ L
Primer forward	2 $\mu$ L
Primer reverse	2 $\mu$ L
Agua libre de ARNsas	5 $\mu$ L
ADNc	1 $\mu$ L

La composición de la solución necesaria para la reacción de PCR del gen GPx-4 se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Composición de la solución de PCR para el gen GPx-4

Componente	Volumen por muestra
Sybr mix green	10 $\mu$ L
Primer forward	1 $\mu$ L
Primer reverse	1 $\mu$ L
Agua libre de ARNsas	7 $\mu$ L
cDNA	1 $\mu$ L

Para determinar la expresión relativa del ARNm de cada una de las enzimas se obtuvo una curva estándar con el software del equipo termociclador Rotor-Gene (Qiagen), se interpolaron los datos obtenidos para las muestras del epidídimo y se calculó el ciclo umbral o “cycle treshold” (Ct). Los resultados se expresaron en unidades relativas.

## 9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa GraphPad Prism 8.0. para el análisis estadístico y las gráficas. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media

(EEM). El peso corporal se analizó por regresión lineal. El peso de los testículos y de las glándulas sexuales, así como la concentración sérica de las hormonas se analizaron mediante la prueba t-Student. La producción de peróxido y superóxido, la concentración de peróxidos lipídicos, el contenido de las enzimas antioxidantes y la expresión de ARNm de las proteínas se analizaron por medio de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con la condición experimental y las regiones del conducto epididimario (*caput*, *corpus*, *cauda*) como factores, seguida de la prueba post hoc de Tukey-Kramer. Los parámetros espermáticos se analizaron mediante la prueba ji-cuadrada ( $X^2$ ). La correlación entre la corticosterona y el estrés oxidante (producción de ERO, la peroxidación lipídica y el contenido de las enzimas antioxidantes) así como la correlación de la T con las enzimas antioxidantes y con la calidad espermática se analizaron mediante la correlación de Spearman. El nivel de significancia se fijó en  $p \leq 0.05$ .

## 10 RESULTADOS

### 10.1 GANANCIA DE PESO CORPORAL

Las ratas expuestas a estrés crónico por inmersión en agua fría durante 50 días consecutivos no presentaron pérdida de peso corporal, pero la ganancia de peso en estos animales fue menor en comparación con los machos del grupo control. En la figura 18 se muestran las curvas de ganancia de peso corporal de ambos grupos. Se muestra la ecuación obtenida por regresión lineal, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación para cada curva. El análisis estadístico mostró que la pendiente de la curva de ganancia del grupo de estrés es significativamente menor en comparación con la pendiente del grupo control ( $p < 0.0001$ , figura 18).

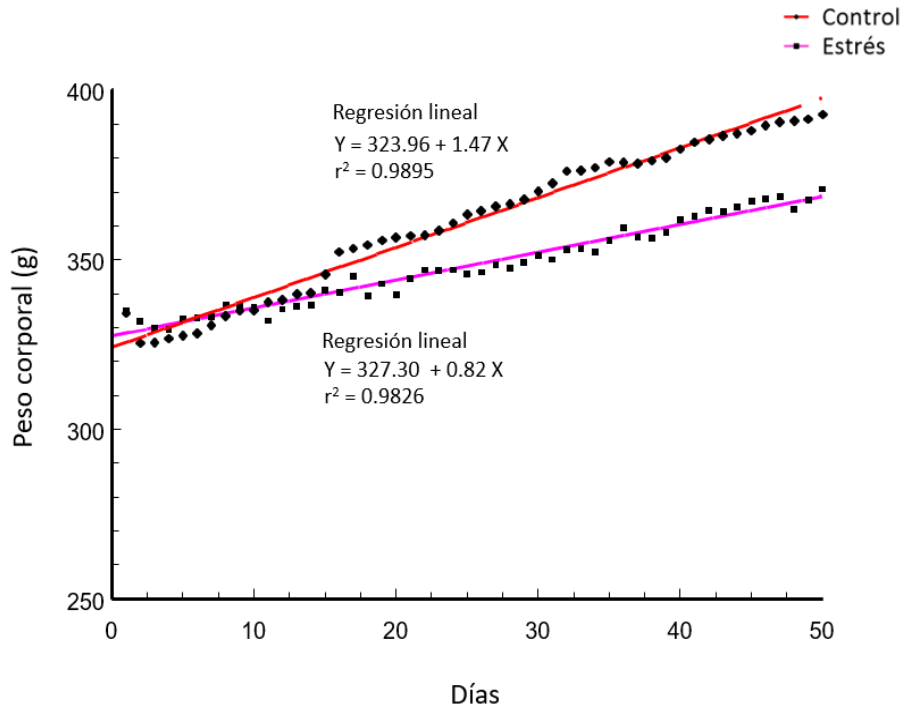


Figura 18. Curvas del peso corporal en los machos del grupo control (línea roja) y del grupo sometido a estrés crónico (línea morada) durante 50 días consecutivos. El seguimiento del peso corporal se llevó a cabo diariamente. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM. (n=10). La pendiente de la curva del grupo de estrés es significativamente diferente comparada con la pendiente de la curva del grupo control ( $p < 0.0001$ ).

## 10.2 PESO DE LOS TESTÍCULOS Y LAS GLÁNDULAS ACCESORIAS.

Los pesos de los testículos, la próstata y las vesículas seminales fueron significativamente menores después de los 50 días de exposición al estrés crónico, al compararse con el grupo control ( $p < 0.05$ ; figura 19).

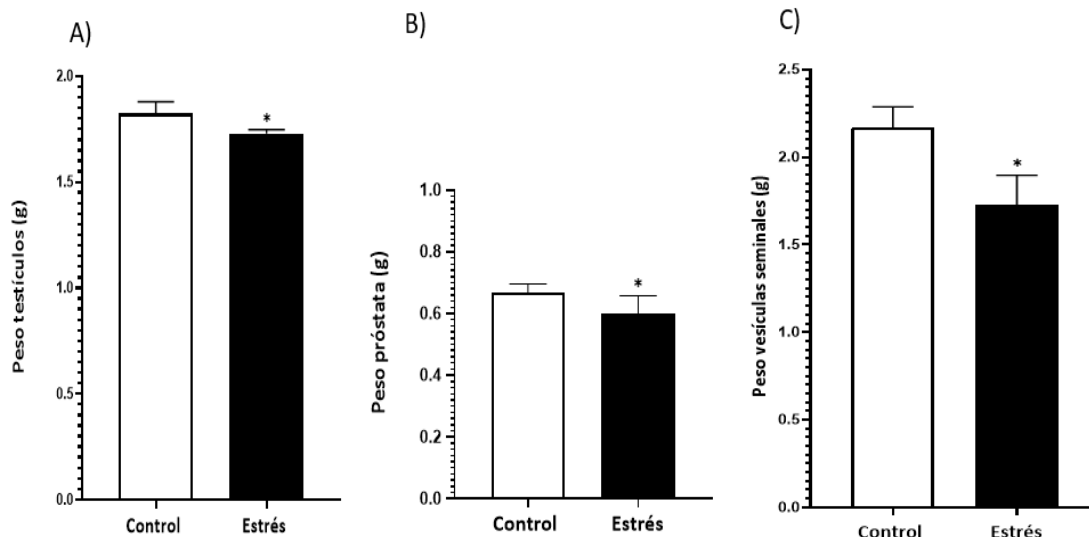


Figura 19. Peso de los testículos (A), la próstata (B) y las vesículas seminales (C) de las ratas control y las ratas estresadas durante 50 días consecutivos. \* $p < 0.05$  es significativamente menor comparado con el grupo control. Prueba t-Student. Los datos muestran la media  $\pm$  EEM. (n=10).

### 10.3 CONCENTRACIÓN DE CORTICOSTERONA Y TESTOSTERONA.

La concentración sérica de corticosterona en los machos del grupo de estrés crónico fue de  $465.5 \pm 39.1 \mu\text{g/dL}$ , significativamente mayor a la concentración de la hormona en los machos del grupo control ( $186.2 \pm 20.0 \mu\text{g/dL}$ ), ( $p < 0.05$ ; figura 20A). En contraste, la concentración de T resultó significativamente menor ( $0.21 \pm 0.06 \text{ ng/mL}$ ) en el suero de los machos expuestos a estrés crónico en comparación con el grupo control ( $2.47 \pm 0.27 \text{ ng/mL}$ ) ( $p < 0.05$ ; figura 20B).



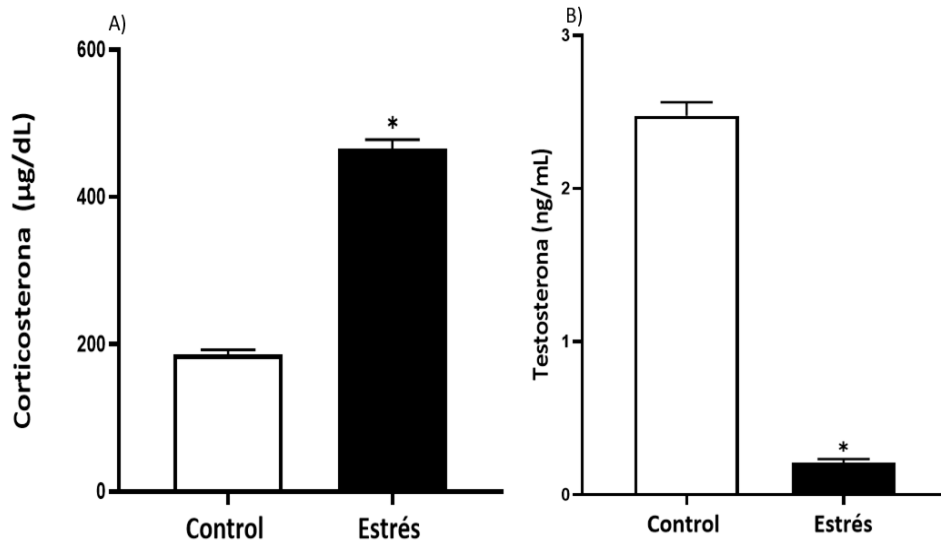


Figura 20. Concentración sérica de corticosterona (A) y testosterona (B) en las ratas del grupo control y del grupo expuesto a estrés crónico durante 50 días consecutivos. Los datos expresan µg/dL y ng/mL, respectivamente. La concentración sérica de corticosterona resultó mayor mientras que la concentración de testosterona fue menor en el grupo de estrés crónico (\* $p < 0.05$ ). Prueba t-Student. Los datos muestran la media  $\pm$  EEM. (n=10).

#### 10.4 PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

En este estudio se observó que la exposición a estrés crónico durante 50 días consecutivos incrementa significativamente la producción de  $H_2O_2$  en el *corpus* del conducto epididimario, sin embargo, la producción de  $H_2O_2$  no fue significativa en la región del *caput* y la *cauda* del epidídimo ( $p < 0.05$ , figura 21A). Con relación a la producción del  $O_2^{\bullet-}$ , la exposición a estrés crónico por inmersión en agua fría indujo un incremento significativo en las tres regiones del epidídimo, en comparación con el grupo control ( $p < 0.05$ ; figura 21B).

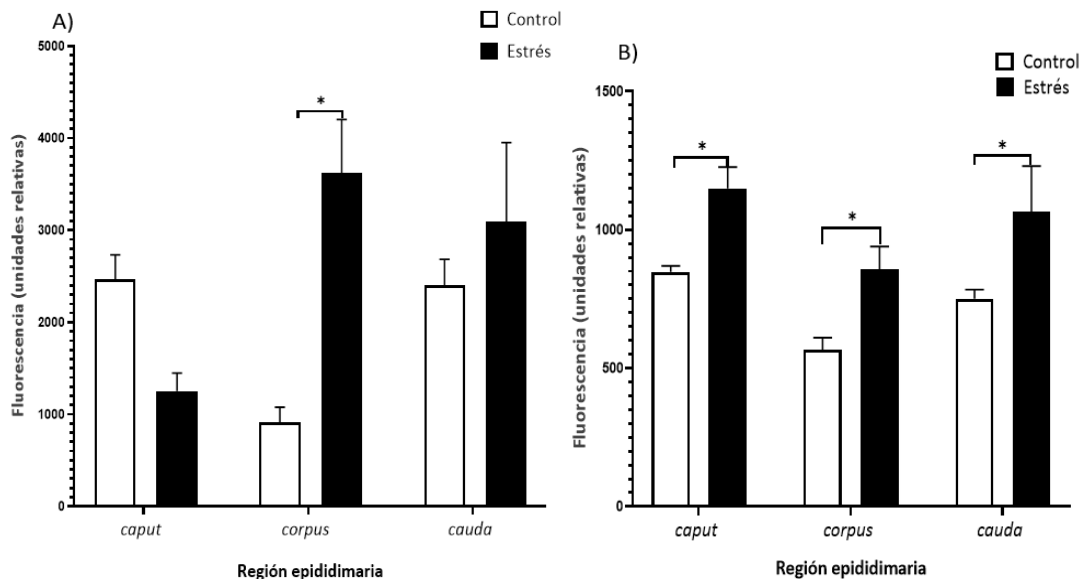


Figura 21. Producción de ERO en las regiones epididimarias en animales del grupo control y del grupo de estrés crónico durante 50 días consecutivos. (A) La producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aumentó significativamente sólo en el *corpus* del epidídimo del grupo de estrés crónico. (B) El incremento en la producción de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) fue significativo en las tres regiones del conducto epididimario en el grupo de estrés crónico (\*p<0.05). ANOVA de dos vías, seguida de Tukey-Kramer. Los datos muestran la media ± EEM.

## 10.5 CONCENTRACIÓN DE PERÓXIDOS LIPÍDICOS

La concentración de peróxidos lipídicos aumentó significativamente en el *corpus* epididimario, donde se obtuvo el valor de  $93.4 \pm 29.2$  nmol/mg proteína, mientras que, en los machos control, el valor observado fue de  $34.9 \pm 3.3$  nmol/mg proteína. El aumento en la producción de lipoperóxidos en el *corpus* del epidídimo se relaciona con el incremento en la concentración de peróxidos lipídicos en la misma región del conducto epididimario.

En la *cauda* epididimaria de las ratas expuestas a estrés crónico, la concentración de peróxidos lipídicos también aumentó significativamente ( $88.1 \pm 26.8$  nmol/mg proteína) con respecto al grupo control ( $33.6 \pm 2.09$  nmol/mg proteína) ( $p < 0.05$ ; figura 22). El incremento en la producción de superóxido en la *cauda* del epidídimo se asocia con el aumento en la concentración de peróxidos lipídicos en la misma región epididimaria.

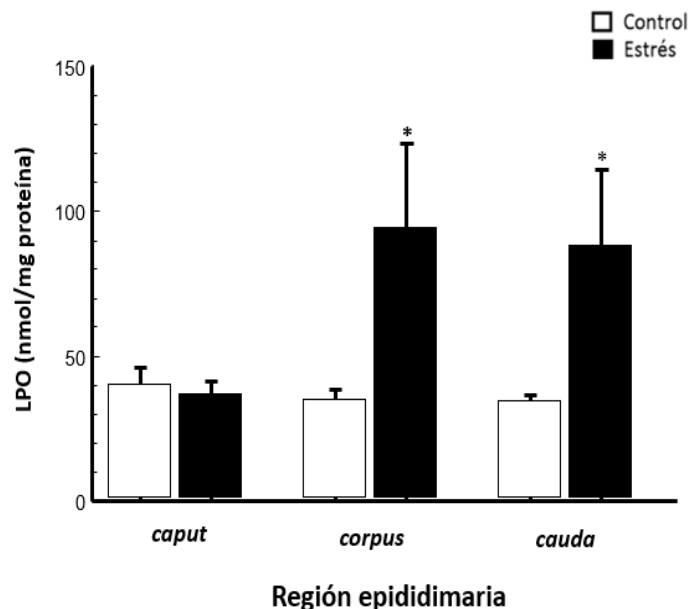


Figura 22. Peroxidación lipídica (LPO) en las regiones epididimarias en ratas del grupo control y del grupo sometido a estrés crónico durante 50 días consecutivos. La concentración de peróxidos lipídicos incrementó significativamente en el *corpus* y la *cauda* del epidídimo del grupo de estrés comparado con el grupo control (\* $p < 0.05$ ). ANOVA de dos vías, seguida de Tukey-Kramer. Los datos muestran la media  $\pm$  EEM. (n= 10).

## 10.6 CONTENIDO DE LAS ENZIMAS SOD1, CAT Y GPx-4

El contenido de la enzima SOD1 disminuyó significativamente en el *caput*, en el *corpus* y en la *cauda* del epidídimo de los machos expuestos a estrés crónico ( $p < 0.05$ ; figura 23). La reducción en el contenido de la enzima SOD1 se asocia con el incremento en la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en las tres regiones del epidídimo. Con respecto a las enzimas CAT y GPx-4, el contenido de ambas enzimas disminuyó significativamente, sólo en el *corpus* del epidídimo tras la exposición al estrés crónico ( $p < 0.05$ ; figura 24 y 25). La disminución del contenido de estas enzimas en el *corpus* del epidídimo se asocia con el incremento en la producción de  $H_2O_2$  y con el aumento en la concentración de peróxidos lipídicos en la misma región.

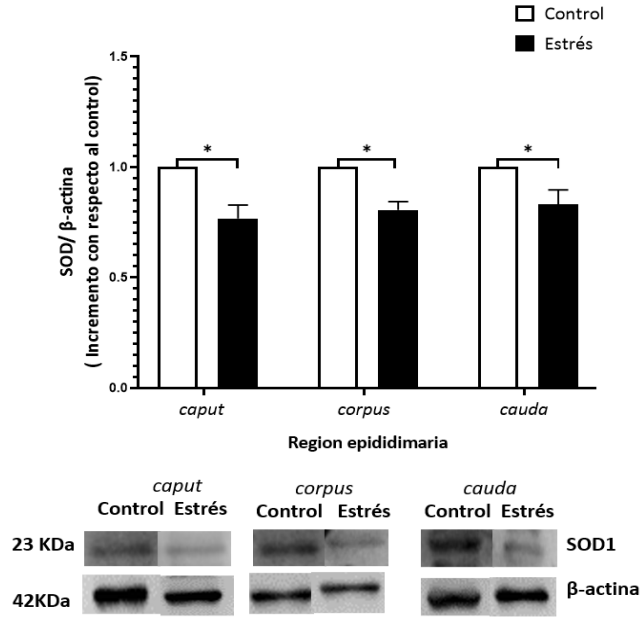


Figura 23. Contenido de la enzima SOD1, en las regiones epididimarias en ratas del grupo control y en ratas del grupo de estrés crónico. El contenido de la enzima disminuyó en las tres regiones del epidídimo de los animales expuestos a estrés crónico (\* $p < 0.05$ ). ANOVA de dos vías, seguida de Tukey-Kramer. Los datos muestran la media  $\pm$  EEM.

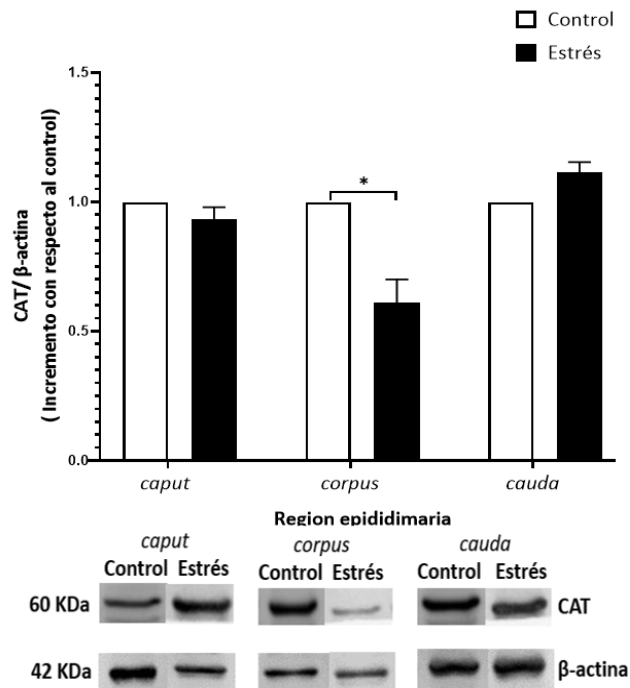


Figura 24. Contenido de la enzima CAT, en las regiones epididimarias en ratas del grupo control y del grupo sometido a estrés crónico durante 50 días consecutivos. Tras la exposición al estrés se observó la reducción significativa de la enzima exclusivamente en el *corpus* del epidídimo (\* $p < 0.05$ ). ANOVA de dos vías, seguida de Tukey-Kramer. Los datos muestran la media  $\pm$  EEM.

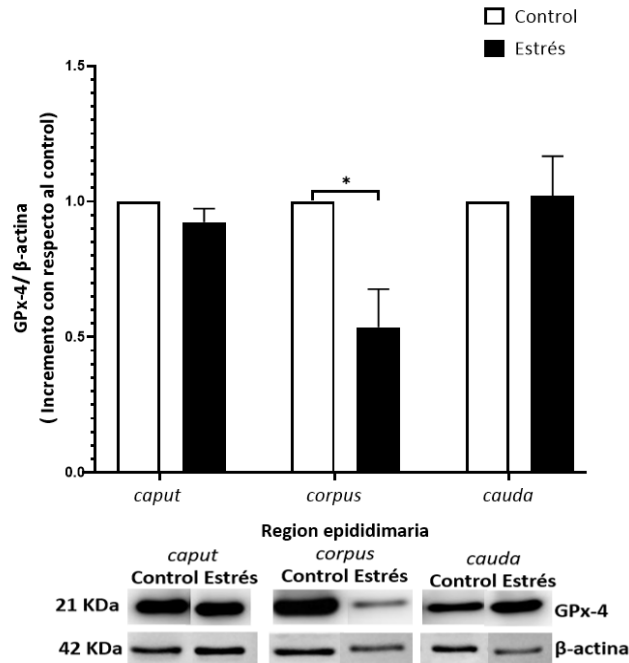


Figura 25. Contenido de la enzima GPx-4, en el conducto epididimario de las ratas del grupo control y del grupo sometido a estrés crónico durante 50 días consecutivos. Se observó la reducción significativa de la enzima únicamente en el *corpus* del epidídimo en el grupo expuesto a estrés crónico en comparación con el grupo control (\* $p < 0.05$ ). ANOVA de dos vías, seguida de Tukey-Kramer. Los datos muestran la media  $\pm$  EEM.

## 10.7 EXPRESIÓN DEL ARNm PARA LAS PROTEÍNAS SOD1, CAT Y GPx-4

La expresión del ARNm para la proteína GPx-4 se incrementó exclusivamente en el *corpus* del conducto epididimario del grupo de estrés crónico, en tanto que, el ARNm para SOD1 y CAT no se modificó en las regiones epididimarias ( $p < 0.05$ ; figura 26).

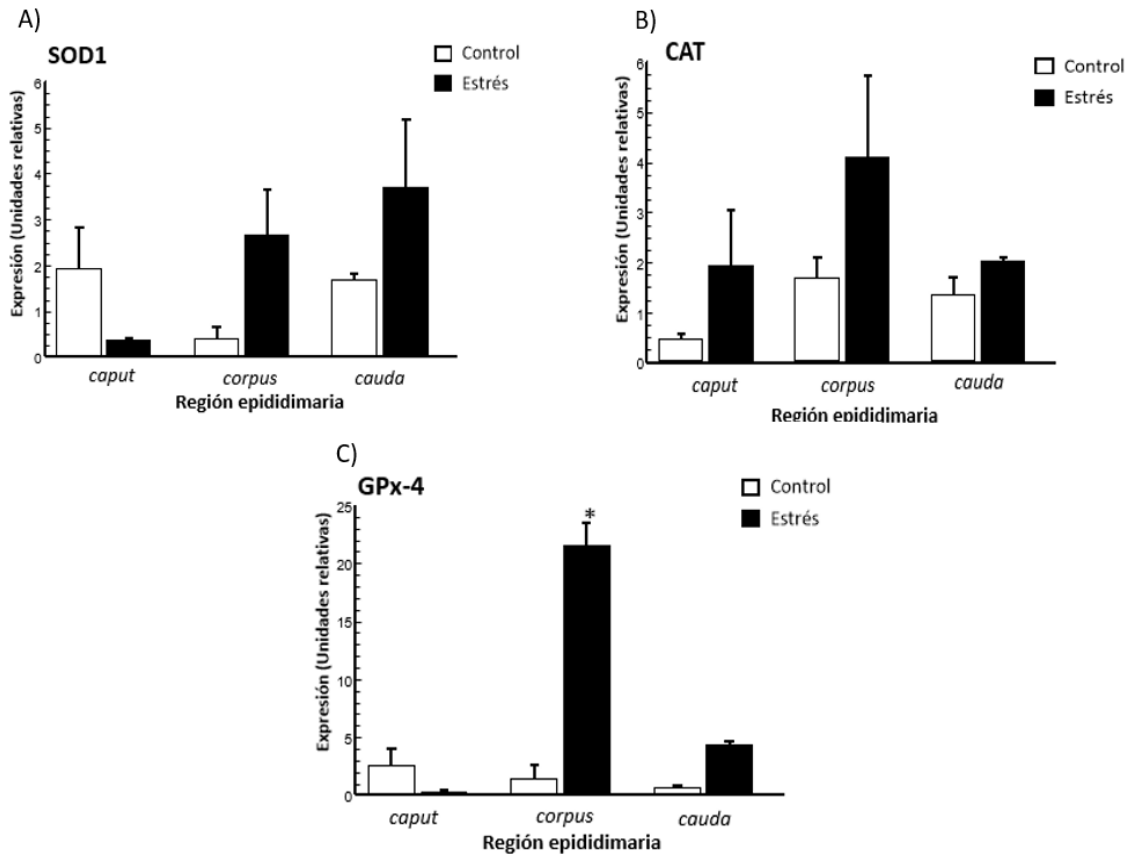


Figura 26. Expresión de los ARNm de las proteínas SOD1 (A), CAT (B) y GPx-4 (C) en las regiones epididimarias en ratas del grupo control y del grupo sometido a estrés crónico durante 50 días consecutivos. Sólo en el *corpus* del epidídimo del grupo de estrés crónico se observó el incremento significativo en la expresión del ARNm de la enzima GPx-4 comparado con el grupo control (\* $p < 0.05$ ). ANOVA de dos vías, seguida de Tukey-Kramer. Los datos muestran la media  $\pm$  EEM.

## 10.8 ANÁLISIS ESPERMÁTICO.

El estrés crónico causó la disminución significativa de la movilidad de los espermatozoides. El porcentaje de movilidad en los machos estresados fue de  $39.6 \pm 1.73$ , mientras que en los machos del grupo control fue de  $89.7 \pm 1.55$  ( $p < 0.05$ ; figura 27A). El porcentaje de espermatozoides vivos observados en los machos estresados crónicamente fue de  $35.2 \pm 1.49$ , significativamente menor comparado con el grupo control que presentó un porcentaje del  $90.8 \pm 0.82$  ( $p < 0.05$ ; figura 27B). Con relación a la concentración espermática, resultó significativamente menor en los animales estresados ( $46.1 \pm 2.02$  millones de espermatozoides por mL) que en los animales del grupo control ( $102.9 \pm 3.81$

millones de espermatozoides por mL), ( $p < 0.05$ ; figura 27C). Con respecto a la morfología, el porcentaje de espermatozoides anormales fue mayor en el grupo de estrés crónico ( $9.07 \pm 0.66$ ), al obtenido en el grupo control ( $1.55 \pm 0.35$ ), ( $p < 0.05$ ; figura 27D).

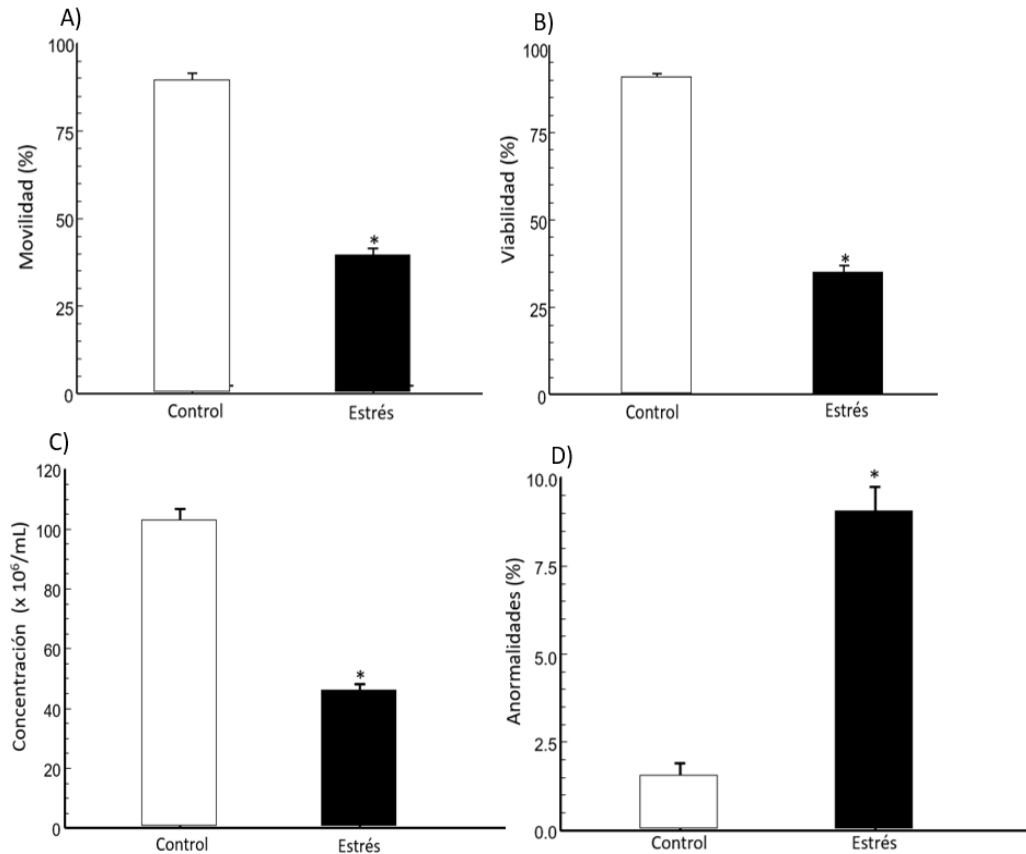


Figura 27. (A) Movilidad progresiva, (B) viabilidad espermática, (C) concentración espermática y (D) anormalidades de los espermatozoides epididimarios en las ratas del grupo control y las ratas sometidas a estrés crónico durante 50 días consecutivos. Todos los parámetros fueron significativamente menores en el grupo de estrés, comparados con el grupo control; a excepción del porcentaje de anormalidades espermáticas, el cuál aumentó significativamente en el grupo de estrés. (\* $p < 0.05$ ). Prueba ji-cuadrado ( $X^2$ ). Los datos muestran la media  $\pm$  EEM.

Las anormalidades espermáticas observadas al microscopio incluyen alteraciones en la cabeza (cabezas en forma de globo, figura 28A; cabezas dobladas sobre el flagelo, figura 28 B-D y cabezas sueltas, figura 28C), alteraciones en la pieza media (pieza media voluminosa, figura 28D) y en el flagelo (figura 28E).

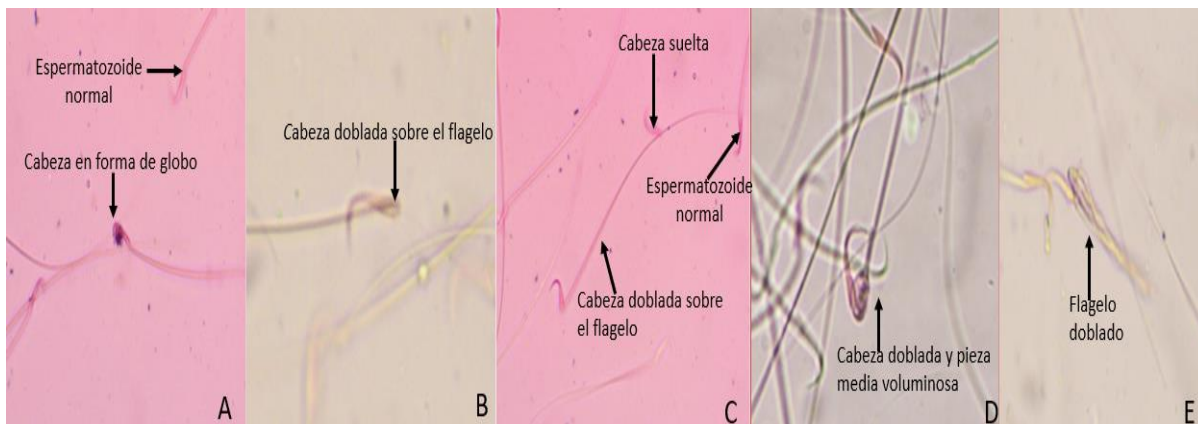


Figura 28. Anormalidades morfológicas de espermatozoides epididimarios. A) Espermatozoide normal y espermatozoide con cabeza en forma de globo; B) cabeza doblada sobre el flagelo; C) Cabeza suelta, espermatozoide normal y cabeza doblada sobre el flagelo; D) cabeza doblada sobre el flagelo y pieza media voluminosa; E) Flagelo doblado. Microscopio de campo claro, 40x.

## 10.9 CORRELACIÓN DE LA CORTICOSTERONA CON LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDANTE.

Al comparar los cambios observados en la concentración sérica de la corticosterona con la producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\bullet-}$ , la peroxidación lipídica y el contenido de las enzimas antioxidantes, se observó una correlación positiva entre el aumento de la corticosterona sérica, debido al estrés crónico durante 50 días consecutivos, con el aumento en la producción de  $H_2O_2$  en el *corpus* del epidídimo, con el incremento en la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en el *corpus*, *caput* y la *cauda* epididimaria y con el aumento en la concentración de peróxidos lipídicos en el *corpus* y la *cauda* del conducto epididimario. El incremento de la corticosterona se correlacionó negativamente con la disminución en el contenido de la enzima SOD en el *caput*, *corpus* y *cauda* epididimaria y con la disminución del contenido de la enzima CAT y GPx4 en el *corpus* del epidídimo. La tabla 6 muestra la correlación entre la corticosterona y los parámetros de estrés oxidante.



Tabla 6. Correlación de Spearman entre el incremento en la corticosterona sérica, la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, la concentración de peróxidos lipídicos (LPO) y el contenido de las enzimas antioxidantes SOD1, CAT y GPx4 durante el estrés crónico por 50 días consecutivos.

Región epididimaria	Parámetro	Estrés crónico, 50 días
<i>caput</i>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	r= -0.2237 (p= 0.34) ns
	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	r= 0.6388 (p= 0.0024)
	LPO	r= 0.0625 (p= 0.79) ns
	SOD1	r= -0.8115 (p= 0.0001)
	CAT	r= -0.3219 (p= 0.1663) ns
	GPx4	r= -0.3733 (p=0.143) ns
<i>corpus</i>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	r= 0.8438 (p= 0.0001)
	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	r= 0.76 (p= 0.0001)
	LPO	r= 0.4012 (p= 0.05)
	SOD1	r= -0.7793 (p= 0.0001)
	CAT	r= -0.848 (p= 0.0001)
	GPx4	r= -0.7786 (p= 0.0001)
<i>cauda</i>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	r= 0.3788 (p= 0.09) ns
	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	r= 0.43 (p= 0.05)
	LPO	r= 0.5999 (p= 0.005)
	SOD1	r= -0.4509 (p= 0.046)
	CAT	r= -0.431 (p= 0.06) ns
	GPx4	r= 0.2898 (p= 0.257) ns

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peróxido de hidrógeno, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> anión superóxido, LPO peróxidos lipídicos.  
 SOD1 superóxido dismutasa 1, CAT catalasa, GPx4 glutatión peroxidasa 4.  
 R (p). p=nivel de significancia (2-colas)  
 ns= no significativo.

#### 10.10 CORRELACIÓN DE LA TESTOSTERONA CON LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDANTE.

Se observó correlación negativa entre la disminución de la T sérica, debido al estrés crónico durante 50 días consecutivos, con el aumento en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el *corpus* del epidídimo, con el incremento en la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en el *caput* y el *corpus* del epidídimo y con el aumento en la concentración de peróxidos lipídicos en la *cauda* del conducto epididimario. La disminución de la T se correlacionó positivamente con la reducción del contenido de la enzima SOD en el *caput*, *corpus* y *cauda* epididimaria y con la disminución del contenido de la enzima CAT y GPx4 en el *corpus* del epidídimo. La tabla 7 muestra la correlación entre la Ty los parámetros de estrés oxidante.

Tabla 7. Correlación de Spearman entre la disminución de la testosterona sérica, la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, la concentración de peróxidos lipídicos (LPO) y el contenido de las enzimas antioxidantes SOD1, CAT y GPx4 durante el estrés crónico por 50 días consecutivos.

Región epididimaria	Parámetro	Estrés crónico, 50 días
<i>caput</i>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	r= -0.0258 (p= 0.9141) ns
	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	r= -0.8135 (p= 0.0001)
	LPO	r= 0.0625 (p= 0.79) ns
	SOD1	r= 0.8866 (p= 0.0001)
	CAT	r= 0.0921 (p= 0.6994) ns
	GPx4	r= 0.4507 (p=0.0461)
<i>corpus</i>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	r= -0.7418 (p= 0.0002)
	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	r= -0.7696 (p= 0.0001)
	LPO	r= -0.2268 (p= 0.3362) ns
	SOD1	r= 0.7899 (p= 0.0001)
	CAT	r= 0.7803 (p= 0.0001)
	GPx4	r= 0.7415 (p= 0.0002)
<i>cauda</i>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	r= -0.4045 (p= 0.0769) ns
	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	r= 1.631 (p= 0.1203) ns
	LPO	r= -0.7963 (p= 0.0001)
	SOD1	r= 0.6867 (p= 0.0008)
	CAT	r= -0.7124 (p= 0.0004)
	GPx4	r= -0.538 (p= 0.0144)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peróxido de hidrógeno, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> anión superóxido, LPO peróxidos lipídicos.

SOD1 superóxido dismutasa 1, CAT catalasa, GPx4 glutatión peroxidasa 4.

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

ns= no significativo.

#### 10.11 CORRELACIÓN DE LA CORTICOSTERONA CON LA TESTOSTERONA Y DE LA TESTOSTERONA CON LOS PARÁMETROS DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.

El aumento en la concentración de la corticosterona se correlacionó negativamente con la disminución de la T en los machos estresados crónicamente. Se observó correlación positiva entre la reducción de la T sérica con la disminución de la movilidad progresiva, la viabilidad y la concentración de los espermatozoides epididimarios. Asimismo, la disminución de T se correlacionó negativamente con el incremento en el porcentaje de espermatozoides anormales. Por otro lado, el incremento en la corticosterona correlacionó positivamente con el

aumento de las anomalías en los espermatozoides ( $r= 0.7086$ ,  $p=0.0005$ ). La tabla 8 muestra la correlación de la corticosterona con la T y la T con los parámetros de la calidad espermática.

Tabla 8. Correlación de Spearman de la testosterona sérica con los parámetros de la calidad espermática en los machos expuestos a estrés crónico.

Parámetro	Estrés crónico, 50 días
Testosterona	$r= -0.6586$ ( $p= 0.0016$ )
Movilidad progresiva	$r= 0.7673$ ( $p= 0.0001$ )
Viabilidad	$r= 0.7912$ ( $p= 0.0001$ )
Concentración espermática	$r= 0.7619$ ( $p= 0.0001$ )
Anormalidades morfológicas	$r= -0.7158$ ( $p= 0.0004$ )

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

## 11 DISCUSIÓN

El paso de los espermatozoides a través de las diferentes regiones del epidídimo es esencial para que continúen con su maduración estructural y funcional después que han sido formados en el proceso de la espermatogénesis (Robaire et al., 2006). Dicho proceso de maduración puede alterarse por efecto del estrés crónico. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el estrés causa alteraciones en diversos aspectos fisiológicos y reproductivos en el macho. Uno de esos procesos es la ganancia de peso corporal.

### 11.1 Peso corporal

La ganancia de peso corporal en los machos estresados de manera crónica fue significativamente menor a partir del día 10 y hasta el día 50 de estrés. En investigaciones previas (Retana-Márquez et al., 2003b; Bazhan et al., 2007; Solomon et al., 2007; Calvez et al., 2011; Nirupama et al., 2013; García-Díaz et al., 2015), se observó que, en roedores sometidos a situaciones diversas de estrés, la ganancia de peso corporal es menor que en los machos no estresados. Este

efecto puede atribuirse a la CRH, pues se ha demostrado que la exposición prolongada a los estresores aumenta la liberación de este neuropéptido en el hipotálamo (Ottenweller, et al., 1992). Además de su papel neuroendocrino en la estimulación del eje HHA, esta hormona actúa también como un neuropéptido hipotalámico anorexigénico, ya que inhibe la ingesta de alimentos al inhibir la liberación del neuropéptido Y (NPY), el cual es orexigénico, es decir, estimula la ingesta de alimento (White, 1993). Dicha inhibición reduce la ingesta de alimento (Tempel y Leibowitz, 1994) y, como resultado, ocasiona disminución en la ganancia de peso corporal. Asimismo, en el núcleo paraventricular, la CRH parece mediar los efectos de la hormona leptina, considerada también anorexigénica, la cual se incrementa por efecto del estrés (Konishi et al., 2006) y, junto con la insulina, contribuyen a la reducción de la ingesta de alimento (González-Jiménez y Río-Valle, 2012).

#### 11.2 Peso de las glándulas masculinas.

El estrés crónico durante 50 días consecutivos también afectó los pesos de los testículos, la próstata y las vesículas seminales, pues éstos fueron significativamente menores que en los machos control. Se ha demostrado que la exposición continua a los estresores disminuye el peso de las gónadas, de la próstata y de las glándulas accesorias (Priya y Reddy, 2012; Retana-Márquez et al., 2014; Nirupama et al., 2013; García-Díaz et al., 2015; Ribeiro et al., 2018). El menor peso en los testículos puede explicarse por los efectos que el estrés tiene en la estructura y función de los testículos; los cuales incluyen la pérdida de células debido a la descamación de células germinales, las cuales son desprendidas del epitelio seminífero y liberadas hacia la luz de los túbulos seminíferos, así como apoptosis en las células testiculares, principalmente espermatocitos y espermátidas redondas (Juárez- Rojas et al., 2015). El bajo peso testicular también puede explicarse por la disminución en la concentración plasmática de T a causa del estrés. Esto debido a que la CRH puede inhibir directamente la secreción de la GnRH en el hipotálamo, mediante conexiones sinápticas entre las neuronas CRH del núcleo paraventricular con las neuronas

GnRH del APOm (Rivier y Rivier, 1986). Además, los GC secretados durante el estrés pueden inhibir directamente la liberación de LH en la hipófisis (Almeida et al., 1998), así como disminuir el receptor para LH en las células de Leydig (Bambino y Hsueh, 1981) y la síntesis de T en las células de Leydig, además de inducir apoptosis en esas células testiculares (Hardy et al., 2005). La disminución de T causada por el estrés crónico es responsable de la reducción del peso de las glándulas sexuales accesorias masculinas, debido a la disminución del área epitelial en la próstata y en las vesículas seminales (Retana-Márquez et al., 2014; Lamsaard et al., 2021), ya que esta hormona es necesaria, tanto para la diferenciación como el desarrollo y el adecuado funcionamiento de las glándulas accesorias (McAllan, 1998; Luke y Coffey 1994; Prins, 1989).

### 11.3 Corticosterona y testosterona

Con respecto a la respuesta de estrés, en este estudio se observó que la exposición crónica a la inmersión en agua fría causó el incremento significativo de la concentración sérica de corticosterona. Estos resultados confirman lo observado en trabajos previos, en los que se muestra que el estrés crónico activa al eje HHA, incrementando la concentración de corticosterona sérica, inhibiendo al mismo tiempo al eje HHT, disminuyendo en consecuencia los niveles de T en el suero (Retana-Márquez et al., 2003<sup>a</sup>). En las células de Leydig, la corticosterona liberada durante el estrés inhibe la transcripción de genes que codifican para enzimas que participan en la síntesis de la T (Orr et al., 1994), como son la 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD), que cataliza la conversión de pregnenolona a progesterona; la 17 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD), que convierte la pregnenolona en 17 hidroxipregnenolona y la  $17\alpha$ -hidroxilasa/ $17$ - $20$  liasa, necesaria en la síntesis de hormonas sexuales (tanto andrógenos como estrógenos) y la enzima citocromo P450<sub>scc</sub>, la cual cataliza el rompimiento de la cadena lateral del colesterol (C27) para producir pregnenolona (C21) (Hales y Payne, 1989). La actividad de los GC en las células de Leydig depende del metabolismo del glucocorticoide, pues los niveles intracelulares de corticosteroides son regulados por la enzima  $11\beta$ -hidroxesteroide

deshidrogenasa en sus dos isoformas (11 $\beta$ HSD-1 y 11 $\beta$ HSD-2) (Hu, 2008b; Hardy et al., 2005; Hardy et al., 1997). La isoforma 11 $\beta$ HSD-1 dependiente de NADP<sup>+</sup>/NADPH, actúa como oxidorreductasa y cataliza la conversión de la corticosterona en su metabolito inactivo, la 11-dehidrocorticosterona mientras que la 11 $\beta$ HSD-2 es una oxidasa que convierte la corticosterona en 11-dehidrocorticosterona y es dependiente de NAD (Ge et al., 2005; Ge et al., 1997), por lo que es probable que el incremento en la concentración intracelular de glucocorticoides exceda la capacidad oxidativa de la 11 $\beta$ HSD-1 durante el estrés y se relacione con la disminución de la concentración plasmática de T. Además, es importante considerar que la exposición continua a la corticosterona induce apoptosis en las células de Leydig (Hu, 2008<sup>a</sup>; Gao et al., 2002; Gao et al., 2003), lo que contribuiría a la disminución en la síntesis de T testicular.

#### 11.4 ERO y sistema antioxidante

El incremento en la concentración de glucocorticoides durante la respuesta de estrés puede inducir estrés oxidante. Esto se debe a que la corticosterona puede causar la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, lo que permite que el citocromo C y otras proteínas se filtren de las mitocondrias, la cadena respiratoria mitocondrial se desacopla de la síntesis de ATP, lo que genera ERO (Loeffler y Kroemer, 2000) y se activan las caspasas, lo que desencadena la apoptosis (Gao et al., 2003; Green y Reed, 1998).

En el trabajo presente, los resultados muestran un aumento significativo en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exclusivamente en el *corpus* del epidídimo de los machos estresados crónicamente. Estos resultados difieren parcialmente de lo reportado por Dhanabalan et al. (2011), quienes observaron aumento en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las tres regiones del epidídimo en ratas sometidas a estrés por inmovilización. En aquel estudio solamente se evaluó la actividad de las enzimas CAT y SOD, a diferencia de este trabajo, en el que se cuantificó el contenido de CAT, SOD y GPX4, además del ARNm para dichas enzimas. Observamos que el contenido de CAT y GPx-4 disminuyó sólo en el *corpus* del epidídimo, lo que concuerda con el incremento en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como con el aumento

en la concentración de peróxidos lipídicos en la misma región. Aunado a lo anterior, la expresión del ARNm para la proteína GPx-4 fue mayor en el *corpus* del epidídimo, lo que podría deberse a un posible mecanismo genético de compensación ante el aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> asociado con el menor contenido de esta enzima en el *corpus*. Sin embargo, la expresión del ARNm para la CAT no se modificó en ninguna región epididimaria. Se ha reportado que esta enzima se encuentra en bajas concentraciones en todo el epidídimo (Vernet et al., 2004). Por lo tanto, el que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solamente aumentara en el *corpus* y no en el *caput* y la *cauda*, podría explicarse por la presencia de otras enzimas o isoformas antioxidantes que disminuyen el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en esas regiones del conducto epididimario. Tal es el caso de la isoforma 3 de la enzima GPX, presente principalmente en la región caudal (Schwaab et al., 1998), así como la isoforma 5, que se expresa en las células principales de la región cefálica del epidídimo (Ghyselinck et al., 1990; Lefrancois et al., 1993) y la familia de las enzimas peroxirredoxinas en sus isoformas 1-4 y 6 presentes en el *caput* y la *cauda* del epidídimo (O'Flaherty, 2014; O'Flaherty y de Souza, 2011). La presencia de estas enzimas antioxidantes podría explicar la diferencia en los resultados con el trabajo de Dhanabalan et al. (2011), que reportan incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las tres regiones del epidídimo.

En cuanto a la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, los resultados del presente trabajo mostraron incremento significativo de esta ERO en las tres regiones del epidídimo. Este incremento de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se asocia con la reducción en el contenido de SOD1 en las tres regiones epididimarias. No obstante, la expresión del ARNm para SOD1 no se modificó. Lo anterior sugiere que la exposición a estrés crónico por inmersión en agua fría podría disminuir las estrategias de defensa del sistema antioxidante del epidídimo ante el incremento del O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Asimismo, se ha sugerido que el aumento en los niveles de esta ERO podría, a su vez, disminuir la actividad de la enzima SOD e inactivar a la enzima CAT, contribuyendo así a la generación de estrés oxidante en el epidídimo (Kono y Fridovich, 1982).

### 11.5 Peróxidos lipídicos

El aumento en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el *corpus* del epidídimo observado en

este trabajo, se asocia con el incremento en la concentración de peróxidos lipídicos en la misma región del conducto epididimario, mientras que el incremento en la producción de  $O_2^{\bullet-}$ , tanto en el *corpus* como en la *cauda* epididimaria se relaciona con el aumento en la concentración de peróxidos lipídicos en las mismas regiones. El hecho de que los peróxidos lipídicos no se hayan incrementado en el *caput*, podría deberse a la presencia de otras defensas antioxidante que atenúan al  $O_2^{\bullet-}$ .

#### 11.6 Calidad espermática

Con respecto al análisis de los espermatozoides epididimarios, se observó que el estrés crónico por inmersión en agua fría afectó la calidad de los espermatozoides de la cauda del epidídimo, debido a que su concentración fue menor, lo mismo que su movilidad y su viabilidad, además de que el porcentaje de anomalías fue mayor. Lo anterior puede deberse a la elevada concentración de corticosterona, así como a la disminución en la T sérica, debido al estrés crónico. La reducción en la concentración de los espermatozoides epididimarios puede deberse a la disminución de la T, ya que, en los testículos la T es necesaria para la conversión de espermátidas redondas a elongadas durante la espermiogénesis. Al disminuir la T las espermátidas redondas se desprenden prematuramente (O'Donnell et al., 1996). Si la diferenciación de espermátidas redondas a elongadas se ve afectada podría repercutir en la liberación de los espermatozoides al lumen del epitelio seminífero, en su transporte y en su proceso de maduración en el conducto epididimario, y con ello disminuiría la concentración de espermatozoides en la región caudal del epidídimo. Otra posibilidad, es la generación de procesos apoptóticos, mediante la activación de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis, inducidos por el estrés en las células germinales testiculares, como se ha reportado en estudios previos, y que han relacionado la baja concentración espermática con la disminución de la T (Juárez-Rojas et al., 2015). Estos mecanismos apoptóticos, cuya finalidad es eliminar espermatozoides con daño oxidante, podrían contribuir a la baja concentración espermática. La disminución de la viabilidad espermática podría explicarse también por el



desencadenamiento de mecanismos apoptóticos causados por el aumento de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\bullet-}$ .

Adicionalmente, la fuga de  $e^-$  activa la vía intrínseca de la apoptosis, que comienza con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y termina con la ruptura de la cadena de ADN y la muerte celular (Aitken et al., 2012). La activación continua del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) evita que los espermatozoides entren en la vía apoptótica intrínseca (Koppers et al., 2011). Cuando la actividad de la PI3K es inhibida, los espermatozoides entran, por defecto, en una cascada apoptótica que se caracteriza por una rápida pérdida en la movilidad, la generación de ERO mitocondriales, la activación de caspasas en el citosol, la unión de la anexina V a la superficie celular, y daño oxidante del ADN (Koppers et al., 2011).

Con relación a la disminución en la movilidad, ésta puede deberse al aumento en la concentración plasmática de corticosterona, la cual puede generar la producción de ERO y peroxidación lipídica en la membrana de los espermatozoides (Dhanabalan et al., 2011). Los aldehídos generados en la peroxidación lipídica como el 4-hidroxinonenal (4HNE) (Walters et al., 2018) desregula a las moléculas relacionadas con las vías bioenergéticas para la síntesis de ATP en los espermatozoides, así como los componentes estructurales y de señalización asociados a la movilidad (Nowicka-Bauer, y Nixon, 2020). El 4HNE puede unirse, mediante enlaces covalentes, a las enzimas relacionadas con la producción de la energía en la movilidad de los espermatozoides, tales como las enzimas glucolíticas fosfofructocinasa (PFKP), aldolasa A, fructosa-bisfosfato aldolasa, fosfoglicerato cinasa (PGK), piruvato cinasa (PKM), la cadena C de la lactato deshidrogenasa (LDHC)]; las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs malato deshidrogenasa 2, la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) mitocondrial (Baker et al., 2015), en la cadena de transporte de  $e^-$  la subunidad A de la Succinato deshidrogenasa (SDHA) (Aitken et al., 2012), el complejo III o citocromo bc1; enzimas de la beta-oxidación, amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), la acil coenzima A sintetasa de cadena larga (ACSL1), la acetil coenzima A acetiltransferasa 1 (ACAT1)] y a la proteína transportadora mitocondrial SLC25A31, involucrada en el intercambio de ADP citoplasmático por ATP

mitocondrial (Baker et al., 2015). Lo anterior reduciría el ATP intracelular y disminuiría la frecuencia del batido flagelar en los espermatozoides. Además, el 4HNE puede formar aductos con la proteína tubulina, con varios miembros de la familia de la proteína dineína DNAH5, DNAH17, DNALI1 (cuya función de ATPasa es necesaria para el batido flagelar mediante el deslizamiento alternado de microtúbulos en toda la longitud del flagelo), con las proteínas de anclaje a la cinasa A (AKAP4 y AKAP3) y con la proteína PKA (Baker et al., 2015) importantes en la organización estructural de la vaina fibrosa, la cual regula la flexibilidad y la forma del batido flagelar de los espermatozoides (Eddy, 2003). Lo anterior se relaciona con la disminución en la fosforilación de residuos de tirosina en las AKAPS y en la fosforilación de la proteína motora dineína (Baker et al., 2015)

En los espermatozoides, las enzimas SOD y GPx son los componentes principales del sistema enzimático antioxidante (Storey, 1997). La GPx requiere de GSH para reducir el  $H_2O_2$  en  $H_2O$ . El GSH es el donador de equivalentes reductores, así la reducción del  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y la oxidación de GSH a GSSG ocurren simultáneamente. La GSSG es reducida por la enzima intracelular glutatión reductasa, la cual, utiliza NADPH (proporcionado en la vía de las pentosas fosfato en su fase oxidativa) como cofactor. En la vía de las pentosas fosfato la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) cataliza la primera reacción de la fase oxidativa (Königsberg, 2008). El aumento en la producción de  $H_2O_2$  inhibe la síntesis de la G6PD. La inhibición de la G6PD por el  $H_2O_2$  genera la disminución de la disponibilidad de NADPH y cambios rápidos en las concentraciones de GSH y GSSG y, con ello, alteraciones en el ambiente oxidorreductor (Königsberg, 2008). Lo anterior puede disminuir las defensas antioxidantes de los espermatozoides y aumentar la peroxidación de los fosfolípidos de membrana (Griveau et al., 1995; Storey, 1998). Esto es importante porque el análisis de muestras de semen de pacientes sanos, pero con diferente porcentaje de espermatozoides móviles después de 1 hora: baja motilidad (n = 51) y alta motilidad (n = 56), mostró que la actividad de la G6PD fue 52 % más baja en el grupo de baja movilidad en comparación con la del grupo de alta movilidad; además, la concentración de malondialdehído (MDA) fue 12 % más alto en el

grupo de baja movilidad en comparación con el grupo de alta movilidad (Kurkowska et al., 2020). Estos hallazgos refuerzan la importancia del estrés oxidante en las alteraciones funcionales y morfológicas de los espermatozoides.

## 12 CONCLUSIÓN

El estrés crónico por inmersión en agua fría genera estrés oxidante en el epidídimo, mostrado por el aumento diferencial de las especies reactivas de oxígeno en el *caput*, el *corpus* y la *cauda*, y que está asociado a la reducción en el contenido de las enzimas epididimarias SOD, CAT y GPx4. La disminución en el contenido de estas enzimas antioxidantes no se debe a la disminución en la expresión de los genes que codifican para su síntesis, ya que no hubo cambios en el ARNm. Es posible que el menor contenido de las enzimas antioxidantes se deba a alteraciones en su síntesis o a alteraciones postraduccionales. El estrés oxidante observado correlaciona con el aumento de la corticosterona sérica, así como con la disminución de la T sérica, lo que trae como consecuencia, la reducción de la calidad espermática. Estos resultados muestran que el estrés crónico es un factor que puede contribuir a la infertilidad masculina.

### 13 REFERENCIAS

Abe, K., Takano, H., Ito, T. (1984). Microvasculature of the mouse epididymis, with special reference to fenestrated capillaries localized in the initial segment. *The Anatomical record*, 209(2), 209–218.

Agarwal, A., Deepinder, F., Sharma, R. K., Ranga, G., Li, J. (2008). Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertility and sterility*, 89(1), 124–128.

Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. 59(1), 2–11.

Agarwal, A., Prabakaran, S., Allamaneni, S. (2006). What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology*, 67(1), 2–8.

Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health*, 32(1), 1–17.

Aitken, R. J., De Iuliis, G. N. (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular human reproduction*, 16(1), 3–13.

Aitken, R. J., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J., Gharagozloo, P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reproduction, fertility, and development*, 28(1-2), 1–10.

Aitken, R. J., Smith, T. B., Lord, T., Kuczera, L., Koppers, A. J., Naumovski, N., Connaughton, H., Baker, M. A., De Iuliis, G. N. (2013). On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. *Andrology*, 1(2), 192–205.

Aitken, R. J., Whiting, S., De Iuliis, G. N., McClymont, S., Mitchell, L. A., Baker, M. A. (2012). Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry*, 287(39), 33048–33060.

Al-Damegh, M.A. (2014). Stress-induced changes in testosterone secretion in male rats: role of oxidative stress and modulation by antioxidants. *Open. J. Anim. Sci.* 4, 70–78.

Almeida, S.A., Petenusci, S.O., Anselmo-Franci, J.A., Rosa-e-Silva, A.A., Lamaso-Carvalho, T.L. (1998). Decreased spermatogenesis and androgenic testicular functions in adult submitted to immobilization-induced stress from puberty. *J. Med. Biol. Res.* 31, 1443–1448.

Alvarez, J. G., Storey, B. T. (1989). Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete research*, 23(1), 77–90.

Arrotia, K., Garcia, P., Barbieri, M., Justino, M., Violin, L. (2012). The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role In Fertilization And Infertility. *Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics*.

Ascoli, M., Fanelli, F., Segaloff, D. L. (2002). The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine reviews*, 23(2), 141–174.

Aveldano, M. I., Rotstein, N. O., Vermouth, N. T. (1992). Lipid remodeling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. *Biochemistry Journal*, 283(Pt 1), 235–241.

Avila, D. M., Fuqua, S. A., George, F. W., McPhaul, M. J. (1998). Identification of genes expressed in the rat prostate that are modulated differently by castration and Finasteride treatment. *The Journal of endocrinology*, 159(3), 403–411.

Baffi, J. S., Palkovits, M. (2000). Fine topography of brain areas activated by cold stress. A fos immunohistochemical study in rats. *Neuroendocrinology*, 72(2), 102–113.

Baker, M. A., Weinberg, A., Hetherington, L., Villaverde, A. I., Velkov, T., Baell, J., and Gordon, C. P. (2015). Defining the mechanisms by which the reactive oxygen species by-product, 4-hydroxynonenal, affects human sperm cell function. *Biol. Reprod.* 92, 108.

Bambino TH, Hsueh AJW. (1981). Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis In vivo and In vitro. *Endocrinology*, 108(61), 2142-2148.

Bartolomucci, A., Palanza, P., Sacerdote, P., Ceresini, G., Chirieleison, A., Panerai, A. E., Parmigiani, S. (2003). Individual housing induces altered immunendocrine responses to psychological stress in male mice. *Psychoneuroendocrinology*, 28(4), 540–558.

Baty, J. W., Hampton, M. B., Winterbourn, C. C. (2005). Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells. *The Biochemical journal*, 389(Pt 3), 785–795.

Baquedano, M. S., Guercio, G., Costanzo, M., Marino, R., Rivarola, M. A., Belgorosky, A. (2018). Mutation of HSD3B2 Gene and Fate of Dehydroepiandrosterone. *Vitamins and hormones*, 108, 75–123

Bauché, F., Fouchard, M. H., Jégou, B. (1994). Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS letters*, 349(3), 392–396.

Bazhan, N. V., Makarova, E. N., Shevchenko, A. I.u, Iakovleva, T. V. (2007). *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova*, 93(11), 1237–1244.

Bedardy, K., Krause, K.-H. (2007). The NOX of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1), 245–313.

Bidzinska, B., Petraglia, F., Angioni, S., Genazzani, A. D., Criscuolo, M., Ficarra, G., Gallinelli, A., Trentini, G. P., Genazzani, A. R. (1993). Effect of different chronic intermittent stressors and acetyl-L-carnitine on hypothalamic beta-endorphin and GnRH and on plasma testosterone levels in male rats. *Neuroendocrinology*, 57(6), 985–990.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, 5 (1), 9–19.

Calvez, J., Fromentin, G., Nadkarni, N., Darcel, N., Even, P., Tomé, D., Ballet, N., Chaumontet, C. (2011). Inhibition of food intake induced by acute stress in rats is due to satiation effects. *Physiology & behavior*, 104(5), 675–683.

Cannon, W.B. (1935). Stresses And Strains Of Homeostasis. *The American Journal of the Medical Sciences*, 189, 13–14.

Cannon, W. B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiological reviews*, 9(3), 399-431.

Cannon, W.B. (1914) The Emergency Function of the Adrenal Medulla in Pain and the Major Emotions. *American Journal of Physiology*, 33, 356-372.

Castellini, C., D'Andrea, S., Cordeschi, G., Totaro, M., Parisi, A., Di Emidio, G., Tatone, C., Francavilla, S., Barbonetti, A. (2021). Pathophysiology of Mitochondrial Dysfunction in Human Spermatozoa: Focus on Energetic Metabolism, Oxidative Stress and Apoptosis. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(5), 695.

Chabory E, Damon C, Lenoir A, Henry-Berger J, Vernet P, Cadet R, Saez F, Drevet JR. (2009a) Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *J Animal Sci* 88, 1321– 1331.

Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Garrel, C., Saez, F., Cadet, R., Henry-Berger, J., Schoor, M., Gottwald, U., Habenicht, U., Drevet, J. R., Vernet, P. (2009b). Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(7), 2074–2085.

Charmandari, E., Achermann, J. C., Carel, J. C., Soder, O., Chrousos, G. P. (2012). Stress response and child health. *Science signaling*, 5(248), mr1.

Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual review of physiology*, 67, 259–284.

Chen, J. W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K., Fisher, A. B. (2000). 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *The Journal of biological chemistry*, 275(37), 28421–28427.

Chen, S., Allam, J.-P., Duan, Y., Haidl, G. (2013). Influence of reactive species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutic approaches. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 288(1), 191–199.

Chen, Y., Wang, Q., Wang, F. F., Gao, H. B., Zhang, P. (2012). Stress induces glucocorticoid-mediated apoptosis of rat Leydig cells in vivo. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 15(1), 74–84.



- Chrousos, G. P. (2002). Organization and integration of the endocrine system. In *pediatric Endocrinol*, ed. M. Sperling, pp 1-14.
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature reviews endocrinology*, 5(7), 374-381.
- Chrousos, G. P., Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, 267(9), 1244–1252.
- Clarke, I. J., Qi, Y., Puspita Sari, I., Smith, J. T. (2009). Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(3), 371–378.
- Chakraborty, S., Pramanik, J., Mahata, B. (2021). Revisiting steroidogenesis and its role in immune regulation with the advanced tools and technologies. *Genes & Immunity*, 22(3), 125-140.
- Clermont Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological reviews*, 52(1), 198–236.
- Collodel, G., Castellini, C., Lee, J. C., Signorini, C. (2020). Relevance of Fatty Acids to Sperm Maturation and Quality. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 7038124.
- Cooper, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 13(1), 130–138.
- Cornwall, G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, 15, 213–227.
- Covoy, S. A., Morán, J. (2012). Papel de las ERO producidas por la NOX en procesos fisiológicos. *Revista de Educación Bioquímica*, 31, 100–109
- Cui, X., Jing, X., Wu, X., Yan, M. (2016). Protective effect of resveratrol on spermatozoa function in male infertility induced by excess weight and obesity. *Molecular medicine reports*, 14(5), 4659–4665.
- Dacheux, J. L., Belghazi, M., Lanson, Y., Dacheux, F. (2006). Human epididymal secretome and proteome. *Molecular and cellular endocrinology*, 250(1-2), 36–42.

Dacheux, J. L., Dacheux, F. (2013). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction (Cambridge, England)*, 147(2), R27–R42.

Dayas, C. V., Buller, K. M., Crane, J. W., Xu, Y., Day, T. A. (2001). Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *The European journal of neuroscience*, 14(7), 1143–1152.

Du Plessis, S. S., Agarwal, A., Halabi, J., Tvrda, E. (2015). Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(4), 509–520.

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

de Lamirande, E., Lamothe, G. (2009). Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free radical biology & medicine*, 46(4), 502–510.

de Lamirande, E., O'Flaherty, C. (2008). Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et biophysica acta*, 1784(1), 106–115.

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

Dhanabalan, S., Mathur, P. P. (2009). Low dose of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces testicular oxidative stress in adult rats under the influence of corticosterone. *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 61(5), 415–423.

Dhanabalan, S., Mathur, P. P., Latha, P. (2015). TCDD and corticosterone on testicular steroidogenesis and antioxidant system of epididymal sperm in rats. *Toxicology and industrial health*, 31(9), 811–822.

Dubuisson, M., Vander Stricht, D., Clippe, A., Etienne, F., Nauser, T., Kissner, R., Koppenol, W. H., Rees, J. F., Knoop, B. (2004). Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS letters*, 571(1-3), 161–165.

Dufau, M. L., Catt, K. J. (1978). Gonadotropin receptors and regulation of steroidogenesis in the testis and ovary. *Vitamins and hormones*, 36, 461–592.

Durairajanayagam, D., Rengan, A.K., Sharma, R.K., Agarwal, A. (2015). *5 Sperm Biology from Production to Ejaculation*.

Durán-Pastén, M.L., Fiordeliso T. (2013). GnRH-induced Ca<sup>2+</sup> signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. *Front. Endocrinol.* 4, 1-13.

Dutta, S., Majzoub, A., Agarwal, A. (2019). Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *ARAB Journal of Urology*, 17(2), 87–97.

Eddy, E. M., Toshimori, K., O'Brien, D. A. (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microscopy research and technique*, 61(1), 103–115.

Ehlers, K., Halvorson, L. (2013). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and the GnRH receptor (GnRHR). *Glob. libr. women's med.*

Eickhoff, R., Wilhelm, B., Renneberg, H., Wennemuth, G., Bacher, M., Linder, D., Bucala, R., Seitz, J., Meinhardt, A. (2001). Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 7(1), 27–35.

Eskiocak, S., Gozen, A. S., Taskiran, A., Kilic, A. S., Eskiocak, M., Gulen, S. (2006). Effect of psychological stress on the L-arginine-nitric oxide pathway and semen quality. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 39(5), 581–588.

Fernandez, M. C., O'Flaherty, C. (2018). Peroxiredoxin 6 is the primary antioxidant enzyme for the maintenance of viability and DNA integrity in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 33(8), 1394-1407.

Ferris, H. A., Shupnik, M. A. (2006). Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GNRH1. *Biology of reproduction*, 74(6), 993–998.

Fink, George. (2009). Stress: definition and history; in Squire LR (ed): *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford, Academic Press. 9. 549-555.

Fisher AB, Dodia C, Manevich Y, Chen JW, Feinstein SI. (1999) Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 274, 21326–21334.

French, F. S., Ritzén, E. M. (1973). A high-affinity androgen-binding protein (ABP) in rat testis: evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis. *Endocrinology*, 93(1), 88–95.

Fujii, T., Fujii, J., Taniguchi, N. (2001). Augmented expression of peroxiredoxin VI in rat lung and kidney after birth implies an antioxidative role. *European journal of biochemistry*, 268(2), 218–225.

Gao, H. B., Tong, M. H., Hu, Y. Q., Guo, Q. S., Ge, R., Hardy, M. P. (2002). Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells. *Endocrinology*, 143(1), 130–138.

Gao, H. B., Tong, M. H., Hu, Y. Q., You, H. Y., Guo, Q. S., Ge, R. S., Hardy, M. P. (2003). Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Molecular and cellular endocrinology*, 199(1-2), 153–163.

Garcia, P. V., Barbieri, M. F., Perobelli, J. E., Consonni, S. R., Mesquita, S.deF., Kempinas, W.deG., Pereira, L. A. (2012). Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. *Fertility and sterility*, 97(6), 1444–1451.

García-Díaz, E. C., Gómez-Quiroz, L. E., Arenas-Ríos, E., Aragón-Martínez, A., Ibarra-Arias, J. A., del Socorro I Retana-Márquez, M. (2015). Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat. *Systems biology in reproductive medicine*, 61(3), 150–160.

García-Triana, Bárbara Elena, Saldaña Bernabeu, Alberto, García Piñeiro, José Carlos, Bastarrechea Milián, Maribel. (2001). NADPH-oxidasa fagocítica: componentes, ensamblaje y mecanismo de acción. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 20(1), 59-63.

Ge, R. S., Dong, Q., Niu, E., Sottas, C. M. O., Catterall, J. F. (2005). 11 $\beta$ Hydroxysteroid dehydrogenase 2 in rat Leydig cell: its role in blunting glucocorticoid action at physiological levels of substrate. *Endocrinol.* 146: 2657 - 2664.

Ge, R. S., Hardy, D. O., Catterall, J. F., Hardy, M. P. (1997). Developmental changes in glucocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase oxidative and reductive activities in rat Leydig cells. *Endocrinol.* 138: 5089 – 5095.

Ghani, E., Keshtgar, S., Habibagahi, M., Ghannadi, A., Kazeroni, M. (2013). Expression of NOX5 in human teratozoospermia compared to normozoospermia. *Andrologia*, 45(5), 351–356.

Ghyselinck, N. B., Dufaure, I., Lareyre, J. J., Rigaudière, N., Mattéi, M. G., Dufaure, J. P. (1993). Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 7(2), 258–272.

Ghyselinck, N. B., Jimenez, C., Lefrançois, A. M., Dufaure, J. P. (1990). Molecular cloning of a cDNA for androgen-regulated proteins secreted by the mouse epididymis. *Journal of molecular endocrinology*, 4(1), 5–12.

Godeas, C., Tramer, F., Micali, F., Soranzo, M., Sandri, G., Panfili, E. (1997). Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biology of reproduction*, 57(6), 1502–1508.

Godoy, J. R., Funke, M., Ackermann, W., Haunhorst, P., Oesteritz, S., Capani, F., Elsässer, H. P., Lillig, C. H. (2011). Redox atlas of the mouse. Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse. *Biochimica et biophysica acta*, 1810(1), 2–92.

Goldstein, D. S., Kopin, I. J. (2008). Adrenomedullary, adrenocortical, and sympathoneural responses to stressors: a meta-analysis. *Endocrine regulations*, 42(4), 111–119.

Gong, S., San Gabriel, M. C., Zini, A., Chan, P., O'Flaherty, C. (2012). Low amounts and high thiol oxidation of peroxiredoxins in spermatozoa from infertile men. *Journal of andrology*, 33(6), 1342–1351.

González-Jiménez, E., Schmidt Río-Valle, J. (2012). Regulación de la ingesta alimentaria y del balance energético: factores y mecanismos implicados. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1850–1859.

Green, D. R., Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 1309–1312.

Griffin, J.E., Wilson J.D. 2003. Disorders of the Testes and the Male Reproductive Tract. En: Williams Textbook of Endocrinology (Larsen P.R., Kronenberg H.M., Melmed S., Polonsky K.S. (Eds.) Saunders, USA. Pp: 709-769.

Griveau JF, Renard P, Le Lannou D. (1995): Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophoreinduced acrosome reaction in vitro. *Int J Andro.*; 18:67 -74.

Gurung, P., Yetiskul, E., Jialal, I. (2022). Physiology, Male Reproductive System. In StatPearls. StatPearls Publishing.

Hagino N, Watanabe M, Goldzieher JW (1969) Inhibition by adrenocorticotropin of gonadotropin-induced ovulation in immature female rats. *Endocrinology* 84:308-314.

Hales, D. B., Payne, A. H. (1989). Glucocorticoid-mediated repression of P450scc mRNA and de novo synthesis in cultured Leydig cells. *Endocrinology*, 124(5), 2099–2104.

Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312–322.

Halliwell, B; Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Edition, Clarendon Press, Oxford, 22-85.

Halliwell, B; Gutteridge, J.M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Eds., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford, 1-25.

Hardy, M. P., Ganjam, V. K. (1997). Stress, 11beta-HSD, and Leydig cell function. *Journal of andrology*, 18(5), 475–479.

Hardy, M. P., Gao, H. B., Dong, Q., Ge, R., Wang, Q., Chai, W. R., Feng, X., Sottas, C. (2005). Stress hormone and male reproductive function. *Cell and tissue research*, 322(1), 147–153.

Henkel R. R. (2011). Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian journal of andrology*, 13(1), 43–52.

Hermo L; Robaire B. (2002). Epididymal cell types and their functions. In *The Epididymis: from Molecular to Clinical Practice. A Comprehensive Survey of the*

Efferent Ducts, the Epididymis and the Vas Deferens, pp 81–102. Eds B Robaire and BT Hinton. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Hermo, L., Jacks, D. (2002). Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Molecular reproduction and development*, 63(3), 394–410.

Hernández-Rodríguez, J., Togno-Peirce, C., López de Jesús, P., Pérez-Aguirre, S.G., ArenasRíos, E., Viguera-Villaseñor, R.M., Montes-López, S., Bonilla-Jaime, H., Damián-Matzumura, P., Arteaga-Silva, M. (2016). Efecto del cadmio en la maduración espermática epididimaria. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(3): 11-21.

Hess, K. C., Jones, B. H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T. S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J. H., Kopf, G. S., Suarez, S. S., Levin, L. R., Williams, C. J., Buck, J., Moss, S. B. (2005). The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental cell*, 9(2), 249–259.

Hess, R. A., Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in experimental medicine and biology*, 636, 1–15.

Holmes F. L. (1986). Claude Bernard, the milieu intérieur, and regulatory physiology. *History and philosophy of the life sciences*, 8(1), 3–25.

Hou, G., Xiong, W., Wang, M., Chen, X., Yuan, T. F. (2014). Chronic stress influences sexual motivation and causes damage to testicular cells in male rats. *The journal of sexual medicine*, 11(3), 653–663.

Hu, G. X., Lian, Q. Q., Lin, H., Latif, S. A., Morris, D. J., Hardy, M. P., Ge, R. S. (2008a). Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. *Steroids*, 73(9-10), 1018–1024.

Hu, G. X., Lin, H., Sottas, C. M., Morris, D. J., Hardy, M. P., Ge, R. S. (2008b). Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymatic activities by glycyrrhetic acid in vivo supports direct glucocorticoid-mediated suppression of steroidogenesis in Leydig cells. *Journal of andrology*, 29(3), 345–351.

Iamsaard, S., Tongpan, S., Yannasithinon, S., Arun, S., Wu, A. T. H., Sukhorum, W. (2021). Effect of chronic stress on expression and secretion of seminal vesicle proteins in adult rats. *Andrologia*, 53(1), e13800.

Ijiri, T. W., Merdiushev, T., Cao, W., Gerton, G. L. (2011). Identification and validation of mouse sperm proteins correlated with epididymal maturation. *Proteomics*, 11(20), 4047–4062.

Ijiri, T. W., Vadnais, M. L., Huang, A. P., Lin, A. M., Levin, L. R., Buck, J., Gerton, G. L. (2013). Thiol changes during epididymal maturation: A link to flagellar angulation in mouse spermatozoa. *Andrology*, 2(1), 65–75.

Iwasaki, A., Gagnon, C. (1992). Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and sterility*, 57(2), 409–416.

Jervis, K. M., Robaire, B. (2001). Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biology of reproduction*, 65(3), 696–703. Jin J. M., Yang W., X. Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads. *2014 Gene* 1;551 (1):15-25

Jin, JM y Yang, WX (2014). Regulación molecular del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas en varones. *Gene*, 551 (1), 15–25.

Johnson, E. O., Kamilaris, T. C., Chrousos, G. P., Gold, P. W. (1992). Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 16(2), 115–130.

Johnson, M. A., Tsutsui, K., Fraley, G. S. (2007). Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Hormones and behavior*, 51(1), 171–180.

Jones MT, Gillham B (1988) Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone! (3- lipotrophic hormone. *Physiological Reviews* 68, 744-800

Jones, R., Mann, T., Sherins, R. J. (1978). Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 201(1145), 413–417.

Juárez-Rojas, A. L., García-Lorenzana, M., Aragón-Martínez, A., Gómez-Quiroz, L. E., Retana-Márquez, M. del S. (2015). Intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in rat testis by cold water immersion-induced acute and chronic stress. *Systems biology in reproductive medicine*, 61(4), 211–221.



Juárez-Rojas, L., Casillas, F., López, A., Betancourt, M., Ommati, M. M., Retana-Márquez, S. (2022). Physiological role of reactive oxygen species in testis and epididymal spermatozoa. *Andrologia*, 54(4), e14367.

Juárez-Rojas, L., Viguera-Villaseñor, R. M., Casillas, F., Retana-Márquez, S. (2017). Gradual decrease in spermatogenesis caused by chronic stress. *Acta histochemica*, 119(3), 284–291.

Justel, N. R., Bentosela, M., Mustaca, A. E. (2009). Comportamiento sexual y ansiedad. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 41(3), 429-444.

Kaneko, T., Iuchi, Y., Kobayashi, T., Fujii, T., Saito, H., Kurachi, H., Fujii, J. (2002). The expression of glutathione reductase in the male reproductive system of rats supports the enzymatic basis of glutathione function in spermatogenesis. *European journal of biochemistry*, 269(5), 1570–1578.

Kerr, J. B., Loveland, K. A. L., O'Bryan, M. K., de Kretser, D. M. (2006). Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In J. D. Neill, J. R. G. Challis, D. M. de Kretser, D. W. Pfaff, J. S. Richards, T. M. Plant, & P. M. Wassarman (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (3 ed., pp. 827 - 947).

Kirby, E. D., Geraghty, A. C., Ubuka, T., Bentley, G. E., Kaufer, D. (2009). Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(27), 11324–11329.

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

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), 620–650.

Königsberg M (2008) Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones Médicas*. Ed. Manual Moderno.

Konishi, N., Otaka, M., Odashima, M., Jin, M., Wada, I., Komatsu, K., Sato, T., Kato, S., Matsushashi, T., Watanabe, S. (2006). Systemic stress increases serum leptin level. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(7), 1099–1102.

Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *The Journal of biological chemistry*, 257(10), 5751–5754.

Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., Fuchs, E. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 35(5), 1291–1301.

Koppers, A. J., Mitchell, L. A., Wang, P., Lin, M., and Aitken, R. J. (2011). Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem. J.* 436, 687–698

Kurkowska, W., Bogacz, A., Janiszewska, M., Gabryś, E., Tiszler, M., Bellanti, F., Kasperczyk, S., Machoń-Grecka, A., Dobrakowski, M., Kasperczyk, A. (2020). Oxidative Stress is Associated with Reduced Sperm Motility in Normal Semen. *American journal of men's health*, 14(5), 1557988320939731.

Lefrançois, A. M., Jimenez, C., Dufaure, J. P. (1993). Developmental expression and androgen regulation of 24 kDa secretory proteins by the murine epididymis. *International journal of andrology*, 16(2), 147–154.

Levine, N., Kelly, H. (1978). Measurement of pH in the rat epididymis in vivo. *Journal of reproduction and fertility*, 52(2), 333–335.

Li, J., Al-Azzawi, F. (2009). Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas*, 63(2), 142–148.

Loeffler, M., Kroemer, G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Experimental cell research*, 256(1), 19–26.

Luke M, Coffey D (1994): The male sex accessory tissue. Structure, androgen, action, and physiology. In: Knobil E, Neil J (eds.): *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York. 1435-1487.

MacLusky, N. J., Naftolin, F., Leranth, C. (1988). Immunocytochemical evidence for direct synaptic connections between corticotrophin-releasing factor (CRF) and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-containing neurons in the preoptic area of the rat. *Brain research*, 439(1-2), 391–395.

Manevich, Y., Fisher, A. B. (2005). Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free radical biology & medicine*, 38(11), 1422–1432.

Mangelsdorf, D. J., Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83(6), 841–850.

Manjithaya, R. R., Dighe, R. R. (2006). The Regulation of Gonadotropins Synthesis. *Proceedings-Indian National Science Academy*, 72(1), 1.

Mason, A. J., Hayflick, J. S., Ling, N., Esch, F., Ueno, N., Ying, S. Y., Guillemin, R., Niall, H., Seeburg, P. H. (1985). Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-beta. *Nature*, 318(6047), 659–663.

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

McAllan B. M. (1998). Effect of testosterone and cortisol administration on the reproductive tract of male *Antechinus stuartii* (Marsupialia). *Journal of reproduction and fertility*, 112(2), 199–209.

McCartney Christopher R., Marshall John C. (2013). En: Yen and Jaffe's Reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management. (Straus Jerome F., Barbieri Robert L.) Elsevier Saunders. USA. Cap. 1. Pp: 3-26.

Miller, W. L., Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews*, 32(1), 81–151.

Milosevic, A., Bjelobaba, I., Bozic, I. D., Lavrnja, I., Savic, D., Tesovic, K., Jakovljevic, M., Stojilkovic, S. S., Janjic, M. M. (2021). Testicular steroidogenesis is suppressed during experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *Scientific reports*, 11(1), 8996.

Moazamian, R., Polhemus, A., Connaughton, H., Fraser, B., Whiting, S., Gharagozloo, P., Aitken, R. J. (2015). Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Molecular human reproduction*, 21(6), 502–515.

Munck, A., Guyre, P. M., Holbrook, N. J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine reviews*, 5(1), 25–44.

Murakami, M., Matsuzaki, T., Iwasa, T., Yasui, T., Irahara, M., Osugi, T., Tsutsui, K. 2008. Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats *J. Endocrinol.* 199, 105-112.

Nicolaidis, N. C., Kyratzi, E., Lamprokostopoulou, A., Chrousos, G. P., Charmandari, E. (2015). Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 22(1-2), 6–19.

Nirupama, M., Devaki, M., Nirupama, R., Yajurvedi, H. N. (2013). Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *Journal of physiology and biochemistry*, 69(1), 59–68.

Noblanc, A., Kocer, A., Chabory, E., Vernet, P., Saez, F., Cadet, R., Conrad, M., Drevet, J. R. (2011). Glutathione peroxidases at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. *Journal of andrology*, 32(6), 641–650.

Nordkap, L., Jensen, T. K., Hansen, Å. M., Lassen, T. H., Bang, A. K., Joensen, U. N., Blomberg Jensen, M., Skakkebaek, N. E., Jørgensen, N. (2016). Psychological stress and testicular function: a cross-sectional study of 1,215 Danish men. *Fertility and sterility*, 105(1), 174–87.

Nowicka-Bauer, K., Nixon, B. (2020). Molecular Changes Induced by Oxidative Stress that Impair Human Sperm Motility. *Antioxidants*, 9(2), 134.

O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI (2006) Endocrine regulation of spermatogenesis. In: Neils. JD, Plant, MT, Donald, WP, Challis, JGC, de Kretser, DM, Richards, JS, Wassarman, PM. (Eds) 2006. Knobil and Neill's *Physiology of reproduction*, (3rd edn). Academic Press, St. Louis 1017-1037.

O'Flaherty, C. (2014). The enzymatic antioxidant system of human spermatozoa. *Advances in Andrology*.

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. *Biology of reproduction*, 55(4), 895–901.

O'Flaherty C. (2019). Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. *Andrology*, 7(5), 662–668.

O'Flaherty, C., de Souza, A. R. (2011). Hydrogen peroxide modifies human sperm peroxiredoxins in a dose-dependent manner. *Biology of reproduction*, 84(2), 238–247.

Ohno, M., Sakumi, K., Fukumura, R., Furuichi, M., Iwasaki, Y., Hokama, M., Ikemura, T., Tsuzuki, T., Gondo, Y., Nakabeppu, Y. (2014). 8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice. *Scientific reports*, 4, 4689.

Okamura, N., Iwaki, Y., Hiramoto, S., Tamba, M., Bannai, S., Sugita, Y., Syntin, P., Dacheux, F., Dacheux, J. L. (1997). Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. *Biochimica et biophysica acta*, 1336(1), 99–109.

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 alpha-hydroxylase and 17,20-lyase without affecting the binding of LH/hCG receptors. *Journal of andrology*, 15(4), 302–308.

Ottenweller, J. E., Servatius, R. J., Tapp, W. N., Drastal, S. D., Bergen, M. T., Natelson, B. H. (1992). A chronic stress state in rats: effects of repeated stress on basal corticosterone and behavior. *Physiology & behavior*, 51(4), 689–698.

Ozkosem, B., Feinstein, S. I., Fisher, A. B., O'Flaherty, C. (2016). Absence of Peroxiredoxin 6 Amplifies the Effect of Oxidant Stress on Mobility and SCSA/CMA3 Defined Chromatin Quality and Impairs Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa. *Biology of reproduction*, 94(3), 68.

Ozkosem, B., Feinstein, S. I., Fisher, A. B., O'Flaherty, C. (2015). Advancing age increases sperm chromatin damage and impairs fertility in peroxiredoxin 6 null mice. *Redox biology*, 5, 15–23.

Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I. J., Goldstein, D. S. (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *The American journal of physiology*, 275(4), R1247–R1255.

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

Payne, A. H., Hales, D. B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine reviews*, 25(6), 947–970.

Payne, A. H., Sha, L. (1991). Multiple mechanisms for regulation of 3  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5 \rightarrow \Delta 4$ -isomerase, 17  $\alpha$ -hydroxylase/C17–20 lyase cytochrome P450, and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultures of mouse Leydig cells. *Endocrinology*, 129(3), 1429-1435.

Pereira, R., Sá, R., Barros, A., Sousa, M. (2017). Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian Journal of Andrology*, 19(1), 5–14.

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

Perry, A. C., Jones, R., Niang, L. S., Jackson, R. M., Hall, L. (1992). Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. *The Biochemical journal*, 285 (Pt 3) (Pt 3), 863–870.

Peshenko, I. V., Shichi, H. (2001). Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxyxynitrite. *Free radical biology & medicine*, 31(3), 292–303.

Peskin, A. V., Low, F. M., Paton, L. N., Maghzal, G. J., Hampton, M. B., Winterbourn, C. C. (2007). The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *The Journal of biological chemistry*, 282(16), 11885–11892.

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P. Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 92, 1235–1316

Prins GS (1989): Differential regulation of androgen receptors in the separate rat prostate lobes: androgen independent expression in the lateral lobe. *Journal of Steroid Biochemistry* 33, 319–326

Priya, P. H., Reddy, P. S. (2012). Effect of restraint stress on lead-induced male reproductive toxicity in rats. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology*, 317(7), 455–465.

Pryor, W. A., Houk, K. N., Foote, C. S., Fukuto, J. M., Ignarro, L. J., Squadrito, G. L., Davies, K. J. (2006). Free radical biology and medicine: it's a gas, man!. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 291(3), R491–R511.

Rabin, D. S., Johnson, E. O., Brandon, D. D., Liapi, C., Chrousos, G. P. (1990). Glucocorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: possible role of the uterine estradiol receptor. *Biology of reproduction*, 42(1), 74–80.

Retana-Márquez, S, Domínguez-Salazar, E., Velázquez-Moctezuma, J. (1996). Effect of acute and chronic stress on masculine sexual behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology*. 21(1), 39-50.

Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Martínez-García, R., Velázquez-Moctezuma, J. (2003a). Changes in masculine sexual behavior, corticosterone, and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones and behavior*, 44(4), 327–337.

Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Domínguez-Salazar, E., Martínez-García, R., Velázquez-Moctezuma, J. (2003b). Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 28(2), 207–227.

Retana-Márquez, S., Viguera-Villaseñor, R. M., Juárez-Rojas, L., Aragón-Martínez, A., Torres, G. R. (2014). Sexual behavior attenuates the effects of chronic stress in body weight, testes, sexual accessory glands, and plasma testosterone in male rats. *Hormones and behavior*, 66(5), 766–778.

Rhee S. G. (2016). Overview on Peroxiredoxin. *Molecules and cells*, 39(1), 1–5.

Rhee SG, Chae HZ, Kim K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38, 1543– 1552.

Rhee, S. G., Kang, S. W., Chang, T. S., Jeong, W., Kim, K. (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB life*, 52(1-2), 35–41.

Rhee, S. G., Woo, H. A., Kil, I. S., Bae, S. H. (2012). Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *The Journal of biological chemistry*, 287(7), 4403–4410.

Rhodes M.E. *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology*. Academic Press; San Diego, CA, USA: 2017. Chapter 10-adrenocorticotrophic hormone A2-ink, George; pp. 109–116.

Ribeiro, C. T., De Souza, D. B., Costa, W. S., Sampaio, F. J. B., & Pereira-Sampaio, M. A. (2018). Immediate and late effects of chronic stress in the testes of prepubertal and adult rats. *Asian journal of andrology*, 20(4), 385–390.

Ribeiro, C.M., Queiróz, D.B., Patrão, M.T., Denadai-Souza, A., Romano, R.M., Silva, E.J., Avellar, M.C. (2015). Dynamic changes in the spatio-temporal expression of the  $\beta$ -defensin SPAG11C in the developing rat epididymis and its regulation by androgens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 404, 141-150.

Rivier, C., Rivier, J., Vale, W. (1986). Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science (New York, N.Y.)*, 231(4738), 607–609.

Robaire, B., Hamzeh, M. (2011). Androgen action in the epididymis. *Journal of andrology*, 32(6), 592–599.

Robaire, B., Hinton, B. T. (2015). Chapter 17-The epididymis. In 'Knobil and Neill's Physiology of reproduction'.(Eds TM Plant, AJ Zeleznik) pp. 691–771.

Robaire, B., Hinton, B. T., Orgebin-Crist, M. C. (2006). The epididymis. In Knobil and Neill's physiology of reproduction (pp. 1071-1148). Academic Press.

Sasagawa, I., Yazawa, H., Suzuki, Y., Nakada, T. (2001). Stress and testicular germ cell apoptosis. *Archives of andrology*, 47(3), 211–216.

Schwaab, V., Baud, E., Ghyselinck, N., Mattei, M. G., Dufaure, J. P., Drevet, J. R. (1995). Cloning of the mouse gene encoding plasma glutathione peroxidase: organization, sequence and chromosomal localization. *Gene*, 167(1-2), 25–31.

Schwaab, V., Lareyre, J. J., Vernet, P., Pons, E., Faure, J., Dufaure, J. P., Drevet, J. R. (1998). Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 53, 157–162.



Seligman, J., Kosower, R., Weissenberg, R., Shalgi, R. (1994). Thioldisulfide status of human sperm protein. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101(2), 435–443.

Selvaraj, V., Stocco, D. M., Clark, B. J. (2018). Current knowledge on the acute regulation of steroidogenesis. *Biology of reproduction*, 99(1), 13–26.

Selye H (1936). A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 138(3479): 32-32.

Selye H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 6, 117–230.

Sengupta P. (2013). Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions. *Drug and chemical toxicology*, 36(3), 353–368.

Setchell, B. P., Maddocks, S., Brooks, D. E., Knobil, E., Neill, J. D. (1994). The physiology of reproduction. *Anatomy, Vasculature, Innervation, and Fluids of the Male Reproductive Tract*, 1, 1063-1076.

Shah, W., Khan, R., Shah, B., Khan, A., Dil, S., Liu, W., Wen, J., Jiang, X. (2021). The Molecular Mechanism of Sex Hormones on Sertoli Cell Development and Proliferation. *Frontiers in endocrinology*, 12, 648141.

Shekter, C. B., Matsumoto, A. M., Bremner, W. J. (1989). Testosterone administration inhibits gonadotropin secretion by an effect directly on the human pituitary. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 68(2), 397–401.

Shi, H., Liu, J., Zhu, P., Wang, H., Zhao, Z., Sun, G., Li, J. (2018). Expression of peroxiredoxins in the human testis, epididymis and spermatozoa and their role in preventing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage to spermatozoa. *Folia histochemica et cytobiologica*, 56(3), 141–150.

Shum, W. W., Da Silva, N., Brown, D., Breton, S. (2009). Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *The Journal of experimental biology*, 212(Pt 11), 1753–1761.

Sies, H., Sharov, V. S., Klotz, L. O., Briviba, K. (1997). Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *The Journal of biological chemistry*, 272(44), 27812–27817.

Silber, S., Silber, S. (2018). Histology of the testis and spermatogenesis. *Fundamentals of male infertility*, 29-37.

Slaunwhite, W. R., Jr, Samuels, L. T. (1956). Progesterone as a precursor of testicular androgens. *The Journal of biological chemistry*, 220(1), 341–352.

Smith, J. T., Clarke, I. J. (2010). Gonadotropin inhibitory hormone function in mammals. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21(4), 255–260.

Smith, S. M., Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience*, 8(4), 383–395.

Smith, T. B., Dun, M. D., Smith, N. D., Curry, B. J., Connaughton, H. S., Aitken, R. J. (2013). The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. *Journal of cell science*, 126(Pt 6), 1488–1497.

Solomon, M. B., Foster, M. T., Bartness, T. J., Huhman, K. L. (2007). Social defeat and footshock increase body mass and adiposity in male Syrian hamsters. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 292(1), R283–R290.

Sostaric, E., Aalberts, M., Gadella, B.M. y Stout, T.A.E. (2008). The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), 237-248

Stephens, M. A., Wand, G. (2012). Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol research: current reviews*, 34(4), 468–483.

Stocco, D. M., McPhaul, M. J. 2006. Physiology of testicular steroidogenesis. In: Neils. J.D., Plant, M.T., Donald, W.P., Challis, J.G.C., de Kretser, D.M., Richards, J.S., Wassarman, P.M. (Eds). *Knobil and Neill’s Physiology of reproduction*, third ed. Academic Press, St. Louis, pp 829-983.

Storey B. T. (1997). Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Molecular human reproduction*, 3(3), 203–213.

Storey, B. T., Alvarez, J. G., Thompson, K. A. (1998). Human sperm glutathione reductase activity in situ reveals limitation in the glutathione antioxidant defense

system due to supply of NADPH. *Molecular reproduction and development*, 49(4), 400–407.

Sullivan, R., Saez, F. (2013). Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction (Cambridge, England)*, 146(1), R21–R35.

Sutanto, W., de Kloet, E. R. (1994). The use of various animal models in the study of stress and stress-related phenomena. *Laboratory animals*, 28(4), 293–306.

Szabo, S., Tache, Y., Somogyi, A. (2012). The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor# of nature. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 15(5), 472–478.

Schiffer, L., Arlt, W., Storbeck, K. H. (2018). Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. *Molecular and cellular endocrinology*, 465, 4–26.

Taylor, A., Robson, A., Houghton, B. C., Jepson, C. A., Ford, W. C., Frayne, J. (2013). Epididymal specific, selenium-independent GPX5 protects cells from oxidative stress-induced lipid peroxidation and DNA mutation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 28(9), 2332–2342.

Teague, C. R., Dhabhar, F. S., Barton, R. H., Beckwith-Hall, B., Powell, J., Cobain, M., Singer, B., McEwen, B. S., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Holmes, E. (2007). Metabonomic studies on the physiological effects of acute and chronic psychological stress in Sprague-Dawley rats. *Journal of proteome research*, 6(6), 2080–2093.

Tempel, D. L., Leibowitz, S. F. (1994). Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *Journal of neuroendocrinology*, 6(5), 479–501.

Thompson, A., Agarwal, A., du Plessis, S. S. (2013). Physiological role of reactive oxygen species in sperm function: A review. In S. Parekattil, & A. Agarwal (Ed.), *Antioxidants in male infertility: A guide for clinicians and researchers* (pp. 69–89).

Tilbrook, A. J., Turner, A. I., Clarke, I. J. (2000). Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of reproduction*, 5(2), 105–113.

Toshimori K. (2003). Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microscopy research and technique*, 61(1), 1–6.

Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G., Panfili, E. (1998). Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biology of reproduction*, 59(4), 753–758.

Tremellen K. (2008). Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Human reproduction update*, 14(3), 243–258.

Trigg, N. A., Skerrett-Byrne, D. A., Xavier, M. J., Zhou, W., Anderson, A. L., Stanger, S. J., Katen, A. L., De Iulius, G. N., Dun, M. D., Roman, S. D., Eamens, A. L., Nixon, B. (2021). Acrylamide modulates the mouse epididymal proteome to drive alterations in the sperm small non-coding RNA profile and dysregulate embryo development. *Cell reports*, 37(1), 109787.

Tsigos, C., Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research*, 53(4), 865–871.

Tsutsui, K., Bentley, G. E., Bedecarrats, G., Osugi, T., Ubuka, T., Kriegsfeld, L. J. (2010). Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Frontiers in neuroendocrinology*, 31(3), 284–295.

Turner T. T. (2001). The study of varicocele through the use of animal models. *Human reproduction update*, 7(1), 78–84.

Turner, T. T., Bomgardner, D., Jacobs, J. P., Nguyen, Q. A. (2003). Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction (Cambridge, England)*, 125(6), 871–878.

Turner, T. T., Jones, C. E., Howards, S. S., Ewing, L. L., Zegeye, B., Gunsalus, G. L. (1984). On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinology*, 115(5), 1925–1932.

Turner, T. T., Lysiak, J. J. (2008). Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of andrology*, 29(5), 488–498

Ulrich-Lai, Y. M., Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(6), 397–409.

van Gestel, R. A., Brewis, I. A., Ashton, P. R., Brouwers, J. F., Gadella, B. M. (2007). Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Molecular human reproduction*, 13(7), 445–454.

Vernet, P., Faure, J., Dufaure, J. P., Drevet, J. R. (1997). Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Molecular reproduction and development*, 47(1), 87–98.

Vernet, P., Aitken, R. J., Drevet, J. R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and cellular endocrinology*, 216(1-2), 31–39.

Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C., Aitken, R. J. (2001). Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biology of reproduction*, 65(4), 1102–1113.

Wahlström, T., Huhtaniemi, I., Hovatta, O., Seppälä, M. (1983). Localization of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and their receptors in human and rat testis using immunohistochemistry and radioreceptor assay. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 57(4), 825–830.

Walters, J. L. H., De Iuliis, G. N., Nixon, B., Bromfield, E. G. (2018). Oxidative Stress in the Male Germline: A Review of Novel Strategies to Reduce 4-Hydroxynonenal Production. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(10), 132.

Wang, X., Wang, X., Sharma, R. K., Sikka, S. C., Thomas, A. J., Jr, Falcone, T., Agarwal, A. (2003). Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertility and sterility*, 80(3), 531–535.

White J. D. (1993). Neuropeptide Y: a central regulator of energy homeostasis. *Regulatory peptides*, 49(2), 93–107.

Woo HA, Jeong W, Chang TS, Park KJ, Park SJ, Yang JS, Rhee SG. (2005) Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *J Biol Chem* 280, 3125– 3128.

Wood ZA; Poole LB; Karplus PA. (2003). Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 650– 653.

Wood, M. L., Esteve, A., Morningstar, M. L., Kuziemko, G. M., Essigmann, J. M. (1992). Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 20(22), 6023–6032.

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

Wu, M., Dumalska, I., Morozova, E., van den Pol, A. N., Alreja, M. (2009). Gonadotropin inhibitory hormone inhibits basal forebrain vGluT2-gonadotropin-releasing hormone neurons via a direct postsynaptic mechanism. *The Journal of physiology*, 587(Pt 7), 1401–1411.

Xiao, X., Mruk, D. D., Wong, C. K., Cheng, C. Y. (2014). Germ cell transport across the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 29(4), 286–298.

Yamashita S. (2004). Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 279(2), 768–778.

Yin, H., Xu, L., Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*, 111(10), 5944–5972.

Zhou, W., De Iuliis, G. N., Dun, M. D., Nixon, B. (2018). Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. *Frontiers in endocrinology*, 9, 59.

Zini, A., Schlegel, P. N. (1996). Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *Journal of andrology*, 17(5), 473–480.

Zini, A., Schlegel, P. N. (1997). Identification and characterization of antioxidant enzyme mRNAs in the rat epididymis. *International journal of andrology*, 20(2), 86–91.





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00114

Matrícula: 2202800675

Efecto del estrés crónico en el estado oxidante del epidídimo y sus consecuencias en la calidad de los espermatozoides epididimarios.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 24 del mes de mayo del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ADRIANA LIZBETH JUAREZ ROJAS  
DR. JOSE GERARDO PERERA MARIN  
DRA. EDITH ARENAS RIOS  
DRA. MARIA DEL REFUGIO DENISE CLAVIJO CORNEJO



ANA ALEJANDRA FLORES GONZALEZ  
ALUMNA

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

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DE: ANA ALEJANDRA FLORES GONZALEZ

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

Aprobar

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

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUÍS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ADRIANA LIZBETH JUAREZ ROJAS

VOCAL

DR. JOSE GERARDO PERERA MARIN

VOCAL

DRA. EDITH ARENAS RIOS

SECRETARIA

DRA. MARIA DEL REFUGIO DENISE CLAVIJO  
CORNEJO