



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**“EFECTO DEL MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN MUCOSA GÁSTRICA
SOBRE LA ORGANIZACIÓN TISULAR DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS EN RATAS
MACHO DE LA CEPA WISTAR”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

P R E S E N T A :

B. E. Ricardo Ruiz Villarreal
2203801612

ricardoruizvillarreal@gmail.com

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Mario García Lorenzana
mglo@xanum.uam.mx

ASESORAS:

Dra. Nohra Elsy Beltrán Vargas
nbeltran@cua.uam.mx
Dra. Beatriz Gómez González
bgomez@izt.uam.mx

JURADO:

Presidenta:

Dra. Nohra Elsy Beltrán Vargas
nbeltran@cua.uam.mx

Secretaria

Dra. Beatriz Gómez González
bgomez@izt.uam.mx

Vocales:

Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio
lucioral@yahoo.com.mx
Dra. Edith Arenas Ríos
editharenas2000@yahoo.com.mx

Iztapalapa, Ciudad de México a 18 de mayo de 2023

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 2 de mayo de 2023

Comisión Académica del Posgrado
Maestría en Biología de la Reproducción Animal
Presente

El que suscribe Ricardo Ruiz Villarreal alumno con número de matrícula 2203801612, del posgrado Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación EFECTO DEL MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN MUCOSA GÁSTRICA SOBRE LA ORGANIZACIÓN TISULAR DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS EN RATAS MACHO DE LA CEPA WISTAR a desarrollar en Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

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



B. E. Ricardo Ruiz Villarreal

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El que suscribe **Ricardo Ruiz Villarreal**, alumno del posgrado 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: **EFFECTO DEL MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN MUCOSA GÁSTRICA SOBRE LA ORGANIZACIÓN TISULAR DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS EN RATAS MACHO DE LA CEPA WISTAR.**

Declaro que:

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

Atentamente



B. E. Ricardo Ruiz Villarreal

Alumno de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR:

Dr. Mario García Lorenzana

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento de Biología de la Reproducción.

e-mail: mglo@xanum.uam.mx

UAM-Iztapalapa

ASESORAS:

Dra. Nohra Elsy Beltrán Vargas

División de Ciencias Naturales e Ingeniería.

Departamento de Procesos y Tecnología.

e-mail: nbeltran@cua.uam.mx

Dra. Beatriz Gómez González

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud.

e-mail: bgomez@izt.uam.mx & bgomezglez@gmail.com

B. E. Ricardo Ruiz Villarreal



e-mail: ricardoruizvillarreal@gmail.com

Miembros del Jurado

Dra. Nohra Elsy Beltrán Vargas (Presidenta)

División de Ciencias Naturales e Ingeniería.

Departamento de Procesos y Tecnología.

Universidad Autónoma Metropolitana

e-mail: nbeltran@cua.uam.mx

Dra. Beatriz Gómez González (Secretaria)

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana

e-mail: bgomezglez@gmail.com

Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio (Vocal)

Centro de Tlaxcala de Biología de la Conducta.

Universidad Autónoma de Tlaxcala

e-mail: lucioral@yahoo.com.mx

Dra. Edith Arenas Ríos (Vocal)

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento de Biología de la Reproducción.

Universidad Autónoma Metropolitana

e-mail: editharenas2000@yahoo.com.mx

Este trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Se desarrolló en los laboratorios de: Neurobiología tisular neuroinmunoendócrina (W-214A), Neuropsicobiología (W-214) del Departamento de Biología de la Reproducción y en el Quirófano experimental del Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica (I-PB) de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería.

Este proyecto contó parcialmente con el financiamiento de los laboratorios antes mencionados de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y con la beca CONACyT Número: 791948.

“El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrado de Excelencia del CONACyT (PNPC) Registro 003797”.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a:

A mi familia, en especial a mi madre Ricaelma Ruiz Villarreal. Es camino nunca ha sido fácil y muchas veces pensé en abandonarlo, pero tú siempre has estado allí y me has dado tu apoyo incondicional en lo que sea que yo decida. La vida no me alcanzaría para agradecerte. Gracias, mamá.

A mis asesoras, la Dra. Nohra y la Dra. Betty gracias por todo, es un honor trabajar con ustedes y este trabajo es gracias a ustedes.

Al Dr. Mario Este trabajo es dedicado a usted Doctor, más que el director de este trabajo un gran amigo, apoyándome siempre en todo momento y motivándome a seguir, en varias ocasiones pensé en renunciar, gracias por no dejarme hacerlo y por ayudarme a conseguir las herramientas para hacerlo. A veces pienso no merezco tanto apoyo, nuevamente muchas gracias. Este trabajo es gracias a usted y es para usted.

A mis amigos: Landa, Beda, Isa, Yessica, Dany, Edwin y Gio ya sea por que íbamos a comer o simplemente sentarnos a platicar o discutir un tema por diversión, muchísimas gracias por que en esos momentos podía olvidarme del estrés del día e incluso si tenía dudas con algo me apoyaban. Muchas gracias.

A Jazmín, Janett, Alfredo y Emanuel, más que amigos, hermanos, muchas gracias hace más de una década que los conozco y siempre me la he pasado muy bien con ustedes. Muchas gracias por sus consejos, su amistad y por aguantarme.

Quiero finalizar esta sección agradeciendo nuevamente a todos, sé que a veces soy una persona complicada y que no tengo el mejor carácter, que la mente me va 5000 revoluciones por minuto y que a veces necesito que me frenen de golpe para no estrellarme. Muchas gracias por aceptarme y aguantarme.

“Me siento feliz por lo que me sucedió, persistí hasta el final sin aflicción, ni abrumado por el presente ni temeroso del futuro. Porque algo similar puede ocurrirles a todos, pero no cualquiera puede llegar hasta el fin sin sufrir aflicción. Recuerden a partir de ahora, en toda situación que los haga sentirse afligidos: no es una desgracia, sino una alegría soportarla con dignidad.”

— Marco Aurelio

“No conoceré el miedo. El miedo asesina la mente. El miedo es la muerte pequeña que conduce a la destrucción total. Confrontaré mi miedo. Le permitiré pasar sobre y a través de mí. Y cuando por fin haya pasado, giraré mi ojo interior para escrutar su camino. En aquel lugar donde el miedo haya pasado ya no habrá nada. Solo estaré yo”

Letanía contra el miedo del ritual Bene Gesserit

— Frank Herbert 1965, *Dune*.

AGRADECIMIENTOS

Quiero, aprovechar este apartado para dar mis agradecimientos a todas aquellas personas e instituciones que colaboraron para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

Agradecimientos personales:

Al Dr. Eduardo Peña Mercado, por compartirme sus conocimientos sobre el modelo experimental de este trabajo y por enseñarme de manera detallada y paciente el procedimiento quirúrgico que se describe en la presente.

Al Mtro. Alejandro Soto Castruita, por darme todo su apoyo durante la realización de este trabajo, sobre todo por su gran apoyo en el trabajo experimental, ya que sin su ayuda y destacable trabajo manejando la anestesia no habría sido posible realizar las cirugías experimentales descritas en la presente.

A la Mtra. María Fernanda Medina Flores, por instruirme y apoyarme en la realización de las técnicas de Western Blot y ELISA, sobre todo por la paciencia que mostró al instruirme desde cero en dichas técnicas y, sobre todo, porque sin su apoyo y ayuda no habría sido posible realizar dichas técnicas.

A la Mtra. Nancy Graciela Viveros Moreno, por su gran apoyo para la realización de la técnica de inmunohistoquímica, sin su ayuda esta técnica tampoco habría sido posible.

A la Biol. Emma González Álvarez, por acompañarme y ayudarme en las primeras etapas de este trabajo, sobre todo por su gran apoyo en la realización de las cirugías experimentales y la técnica histológica. Se que mi función era instruirle en dichos procesos, a pesar de que fue muy apresurado y laborioso, espero de corazón haberte instruido bien.

A la Dra. Nohra Beltrán y a la Dra. Beatriz Gómez González por todo el apoyo profesional, académico y moral que me brindaron durante todo este proceso, sobre todo por la confianza brindada para realizar los experimentos y por abrirme las puertas de sus respectivos laboratorios para poder culminar este trabajo. Muchísimas gracias.

Al Dr. Mario García Lorenzana, realmente me faltarían para palabras para agradecer todo el apoyo académico, profesional, moral y personal que me ha brindado. Sobre todo, por permitirme trabajar en su laboratorio y darme la oportunidad y confianza de apoyarle en las materias que imparte en la licenciatura. Me gustaría terminar este agradecimiento, mencionando que, sin su apoyo, este trabajo en principio ni siquiera hubiera sido posible,

pues es usted quien en principio propuso la idea, la defendió y me apoyó desde el principio hasta el final. Muchísimas gracias Doctor.

A mis sinodales, por sus importantes aportaciones para mejorar la presentación, el contenido y la comunicación de este trabajo.

A las instituciones que apoyaron este trabajo:

Al Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica por permitirnos hacer uso de su quirófano experimental para realizar las cirugías.

A Conacyt, por su apoyo financiero en forma de beca, el cual me permitió dedicarme de tiempo completo a la realización de este estudio.

A la UAM y la MBRA por darme la oportunidad de estudiar una maestría y con ello crecer de manera profesional, académica y personal.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN ----- | 1 |
| 2. MARCO TEÓRICO ----- | 2 |
| 2.1 Mecanismos de daño tisular por isquemia-reperfusión ----- | 2 |
| 2.2 Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica ----- | 3 |
| 2.3 Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica y su influencia en la organización tisular de los túbulos seminíferos ----- | 6 |
| 2.4 Organización tisular del testículo de rata----- | 8 |
| 2.4.1 Cápsula----- | 8 |
| 2.4.2 Lobulillos ----- | 8 |
| 2.4.3 Células de Leydig ----- | 8 |
| 2.4.4 Túbulos seminíferos ----- | 9 |
| 2.4.5 Células de Sertoli ----- | 9 |
| 2.4.6 Células espermatoogénicas ----- | 9 |
| 2.4.7 Lámina propia ----- | 9 |
| 2.5 Espermatogénesis ----- | 10 |
| 2.5.1 Modelo As de células madre espermatoogénicas ----- | 11 |
| 2.5.2 Fase de espermatogonia ----- | 12 |
| 2.5.3 Fase espermatocítica ----- | 12 |
| 2.5.4 Fase de espermátida ----- | 13 |
| 2.5.5 Ciclo del epitelio seminífero----- | 14 |
| 2.6 Barrera hemato-testicular (BTB) ----- | 16 |
| 2.6.1 Estructura de la barrera hemato-testicular (BTB) ----- | 16 |
| 2.6.2 Importancia de las uniones ocluyentes en el mantenimiento y función de la BTB ----- | 18 |
| 2.6.3 Importancia de las uniones comunicantes en la BTB ----- | 19 |
| 2.6.4 Regulación de la BTB por citocinas pro-inflamatorias ----- | 20 |
| 3. ANTECEDENTES ----- | 21 |
| 4. JUSTIFICACIÓN ----- | 23 |
| 5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN ----- | 24 |
| 6. OBJETIVO GENERAL ----- | 24 |
| 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ----- | 24 |
| 8. HIPÓTESIS ----- | 24 |
| 9. DISEÑO EXPERIMENTAL ----- | 24 |

| | |
|---|----|
| 10. MATERIAL Y MÉTODOS ----- | 25 |
| 10.1 Procedimiento ----- | 25 |
| 10.1.1 Anestesia ----- | 25 |
| 10.1.2 Cirugía: Oclusión de la arteria celiaca----- | 25 |
| 10.1.3 Obtención de muestras----- | 26 |
| 10.1.4 Procesamiento histológico----- | 26 |
| 10.1.4.1 Fijación con Bouin-Dubosq----- | 27 |
| 10.1.4.2 Fijación con Paraformaldehído----- | 27 |
| 10.1.4.3 Tinción H&E----- | 27 |
| 10.1.4.4 Tinción PAS----- | 27 |
| 10.1.4.5 Inmunohistoquímica----- | 27 |
| 10.1.5 Categorización y análisis de la espermatogénesis ----- | 28 |
| 10.1.6 Análisis de la frecuencia de los estadios del ciclo del epitelio seminífero----- | 29 |
| 10.2 Procesamiento para Western Blot ----- | 30 |
| 10.3 Medición de los niveles de TNF- α mediante ELISA----- | 30 |
| 10.4 Análisis estadístico----- | 31 |
| 11. RESULTADOS ----- | 32 |
| 11.1 Score de Johnsen ----- | 32 |
| 11.2 Evaluación de la frecuencia de los estadios del ciclo del epitelio seminífero ----- | 34 |
| 11.3 Evaluación de la expresión de claudina-11 y conexina-43 mediante Western Blot----- | 35 |
| 11.4 Evaluación de la expresión y localización de conexina-43 mediante inmunohistoquímica----- | 36 |
| 11.5 Medición de los niveles de TNF- α en suero y en testículo mediante ELISA----- | 38 |
| 12. DISCUSIÓN----- | 38 |
| 12.1 Análisis de la integridad de los túbulos seminíferos mediante el Score de Johnsen ----- | 38 |
| 12.2 Análisis de la frecuencia de los estadios del ciclo del epitelio seminífero----- | 40 |
| 12.3 Análisis de la expresión de Cld-11 y Cx43 mediante Western blot----- | 45 |

| | | |
|--------|--|----|
| 12.4 | Análisis de la expresión de y localización de Cx43 mediante inmunohistoquímica----- | 42 |
| 12.5 | Análisis de los niveles sistémicos y testiculares de TNF- α mediante ELISA ----- | 43 |
| 13. | CONCLUSIONES ----- | 46 |
| 13.1 | Perspectivas ----- | 47 |
| 14. | ANEXOS----- | 48 |
| 14.1 | Reactivos y Soluciones ----- | 48 |
| 14.1.1 | Técnica Histológica ----- | 48 |
| 14.1.2 | Tinciones H&E y PAS ----- | 49 |
| 14.1.3 | Western Blot ----- | 49 |
| 14.1.4 | Inmunohistoquímica ----- | 53 |
| 14.1.5 | ELISA ----- | 54 |
| 14.2 | Procesamiento ----- | 54 |
| 14.2.1 | Técnica Histológica ----- | 54 |
| 14.2.2 | Tinción H&E ----- | 56 |
| 14.2.3 | Tinción PAS ----- | 57 |
| 14.2.4 | Inmunohistoquímica ----- | 59 |
| 14.2.5 | Western Blot ----- | 60 |
| 14.2.6 | Análisis Histológico del Testículo ----- | 64 |
| 14.2.7 | ELISA ----- | 71 |
| 15. | REFERENCIAS ----- | 72 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Daño tisular y desarrollo de SIRS.

Figura 2. Estructura y organización del testículo (A) y túbulos seminíferos (B) de rata.

Figura 3. Espermatogénesis.

Figura 4. Modelo As de espermatogénesis

Figura 5. Ciclo del epitelio seminífero en ratas.

Figura 6. Tipos de uniones celulares en el epitelio seminífero de rata adulta.

Figura 7. Estructura de las uniones ocluyentes, moléculas de adhesión celular presentes y moléculas asociadas.

Figura 8. Estructura de las uniones comunicantes.

Figura 9. Diseño experimental.

Figura 10. Fotomicrografías de túbulos seminíferos de los cuatro grupos. Tinción H&E. Aumento X100: A) control, B) Sham, C) I/R 60 min/ 24 h y D) I/R 120 min/ 24 h. Aumento X400: E) control, F) Sham, G) I/R 60 min/ 24 h y H) I/R 120 min/ 24 h.

Figura 11. Representación gráfica de parámetros morfométricos y de score de Johnsen. A) Promedio de Score de Johnsen por grupo, B) Diámetro de túbulos analizados, C) grosor del epitelio seminífero, D) Área del epitelio seminífero y E) Cantidad de células de Leydig.

Figura 12. Representación de la frecuencia (%) de cada estadio del ciclo del epitelio seminífero por grupo.

Figura 13. Análisis por Western Blot de la expresión de A) Claudina-11 y B) Conexina-43 en los grupos experimentales.

Figura 14. A-D) Fotomicrografías inmunotinción para conexina 43 en túbulos seminíferos. Aumento X200. E) Evaluación del área de tinción positiva, los datos se expresan como porcentaje del área total.

Figura 15. Análisis de la expresión de TNF- α en A) Suero y B) Testículo en los grupos experimentales.

Figura 16. Estimación del cambio en los niveles de TNF- α durante el SIRS y el CARS en un periodo de 24 h, en diferentes tejidos.

Figura 17. Diagrama integrativo de discusión y conclusiones.

Figura 18. Diagrama de zonas analizadas en cortes sagitales de testículo. En la tabla se muestra el área total analizada por cada zona en el corte.

Figura 19. Diagramas de cálculo del índice de circularidad y mediciones de: diámetro, grosor del epitelio y área del epitelio.

Figura 20. Atlas de los estadios del ciclo del epitelio seminífero en rata. Tinción H&E. todas las fotomicrografías se muestran a un aumento X400

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos de las citocinas más importantes en la regulación de la BTB y la espermatogénesis.

Tabla 2. Criterios de caracterización de espermatogénesis.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| BTB | Barrera hematotesticular |
| CARS | Síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria |
| Cld11 | Claudina 11 |
| CRS | Síndrome de liberación de citocinas |
| CS | Tormenta de citocinas |
| Cx43 | Conexina 43 |
| FP | Péptidos formilados |
| HIF-1 α | Subunidad 1 alfa del factor inducible por hipoxia |
| H&E | Tinción con hematoxilina y eosina |
| HMGB1 | High mobility group box 1 |
| HSP | Proteínas de choque térmico |
| I/R | Isquemia-Reperfusión |
| iNOS | Sintasa inducible de óxido nítrico |
| IL-1 α | Interleucina 1 alfa |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-17A | Interleucina 17 A |
| LPS | Lipopolisacáridos bacterianos |
| LH | Hormona luteinizante |
| MODS | Síndrome de disfunción orgánica múltiple |
| MOF | Falla orgánica múltiple |
| NO | Óxido nítrico |
| PAS | Tinción con ácido peryódico de Schiff |

| | |
|---------------|--|
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SIRS | Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TJ | Uniones ocluyentes |
| ZO-1 | Zónula ocludens 1 |
| ZO-2 | Zónula ocludens 2 |

Resumen

En pacientes en cuidado intensivo, con fallo cardiaco o hipovolemia se presenta isquemia en la mucosa gástrica, ésta genera daño celular e inflamación. Cuando ocurre la reperfusión (restauración del flujo sanguíneo) el daño se exagera y se genera el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), el cual puede dañar a otros órganos, como riñón, hígado, cerebro y órganos reproductivos como el testículo. Durante la espermatogénesis la barrera hemato-testicular (BTB, por las siglas en inglés de blood testis barrier) provee protección inmune a las células germinales en meiosis. La BTB se constituye por uniones ocluyentes y especializaciones ectoplásmicas, formadas por moléculas de adhesión celular, reguladas por numerosas moléculas, incluyendo citocinas. Estas aumentan a nivel sistémico en la isquemia-reperfusión (I/R), lo que puede afectar negativamente la formación y mantenimiento de las uniones celulares en la BTB y la espermatogénesis. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la I/R en mucosa gástrica, sobre la organización tisular de los túbulos seminíferos, los niveles de expresión y localización de moléculas de adhesión celular en la BTB y los niveles de TNF- α en suero y en testículo. Para ello, se formaron 4 grupos experimentales: control (n=4), Sham (n=3), I/R 60 min/24 h (n=3) e I/R 120 min/24 h (n=3). En los grupos, experimentales la isquemia se indujo por oclusión de la arteria celiaca por 60 ó 120 min y la reperfusión se permitió por 24 h. Se evaluó la integridad de los túbulos seminíferos mediante el score de Johnsen y se observó una disminución en el promedio de los grupos de I/R de 60 min/ 24 h y 120 min/ 24 h, mientras que los parámetros morfométricos como el diámetro y el área del epitelio seminífero mostraron un incremento en el grupo de I/R de 120 min/24 h, el grosor el epitelio seminífero, incrementó en el grupo de I/R de 60 min/ 24 h. La frecuencia de los estadios del ciclo del epitelio seminífero no se alteró. La expresión de claudina-11, evaluada mediante Western blot, tendió a disminuir su expresión en los grupos de I/R de 60 min/ 24 h y 120 min/24 h, mientras que conexina 43 mostró una tendencia a incrementar en el grupo de I/R de 120 min/ 24 h. Además, su localización, evaluada por inmunohistoquímica, no se modificó. Por último, los niveles de TNF- α en suero y en testículo evaluados mediante ELISA, tendieron a disminuir en el grupo de I/R de 120 min/ 24 h. En conclusión, el modelo de I/R en mucosa gástrica genera cambios morfométricos en túbulos seminíferos, la expresión de las moléculas claudina-11 y conexina-43 en testículo y los niveles de TNF- α séricos y testiculares tienden a cambiar. Dichos cambios podrían estar relacionados con alteraciones sistémicas provocadas por los tiempos de I/R en la mucosa gástrica.

Abstract

In patients in intensive care unit, with heart failure or hypovolemia, ischemia occurs in the gastric mucosa, which generates cellular damage and inflammation. When reperfusion occurs, the damage is exacerbated and Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) is generated, which can cause damage to other organs such as kidney, liver, brain, and reproductive organs, eg.e.g. the testicles. During spermatogenesis the blood-testicular barrier (BTB) provides immune privilege to the germ cells in meiosis. The BTB is constituted by tight junctions and ectoplasmic specializations, formed by cell adhesion proteins. Tight junctions are regulated by numerous molecules, including cytokines. An increase in cytokine concentration at the systemic level occurs during ischemia-reperfusion (I/R). This can negatively affect the formation and maintenance of cell junctions in the BTB and spermatogenesis. The aim of this work was to evaluate the effects of I/R in gastric mucosa, on the tissue organization of seminiferous tubules, on the expression levels and localization of cell adhesion molecules in the BTB and on the levels of TNF- α in serum and testis. For this purpose, 4 experimental groups were formed: control (n=4), Sham (n=3), I/R 60 min/24 h (n=3) and I/R 120 min/24 h (n=3). Ischemia was induced by clamping the celiac artery for 60 or 120 min and reperfusion was allowed for 24 h. The integrity of the seminiferous tubules was evaluated by Johnsen score and observed decrease in the average of the 60 min/24h and 120 min/24 h I/R groups, while morphometric parameters such as diameter and area of the seminiferous epithelium showed an increase in the 120 min/24 h I/R group, the thickness of the seminiferous epithelium showed an increase in the 60 min/24 h I/R group. The frequency of seminiferous epithelium cycle stages was not altered in I/R groups. The expression of claudin-11, evaluated by western blot, showed a tendency to decrease its expression in the 60 min/24 h and 120 min/24 h I/R groups, while connexin-43 showed a tendency to increase in the 120 min/24 h I/R group, and its localization evaluated by immunohistochemistry was not modified. Finally, TNF- α levels in serum and testis assessed by ELISA tended to decrease in the 120 min/24 h I/R group. In conclusion, the I/R model in gastric mucosa generates morphometric changes in seminiferous tubules, the expression of claudin-11 and connexin-43 molecules in testis and serum and testicular TNF- α levels tend to change. These changes could be related to systemic alterations caused by I/R times in the gastric mucosa.

1. INTRODUCCIÓN

Se le conoce como isquemia-reperfusión (I/R) a la condición patológica que se caracteriza por la interrupción del suministro de sangre a determinado órgano o tejido con lo cual se compromete la oxigenación y se genera daño tisular. Después del evento de isquemia se presenta una restauración del flujo sanguíneo y una reoxigenación gradual. Paradójicamente la restauración del flujo sanguíneo exacerba el daño tisular y causa una respuesta inflamatoria aguda. Las causas más comunes de isquemia son oclusiones arteriales debidas a trombos, infartos, cirugía cardiovascular, trasplante de órganos, entre otros (Eltzschig & Eckle, 2011).

Durante la isquemia, la falta de oxigenación incrementa en la permeabilidad vascular, muerte celular y el inicio de una respuesta inflamatoria (Idrovo et al., 2014). En el caso de la I/R de la mucosa gástrica la restauración del flujo sanguíneo y la reoxigenación conducen a translocación bacteriana del lumen intestinal a la circulación sanguínea, con lo que se puede generar sepsis, respuestas inflamatorias y estrés oxidante (Li et al., 2021).

En pacientes en estado crítico, que han sido sometidos a cirugía cardiovascular, con hipovolemia y aquellos padecimientos que comprometen el flujo sanguíneo, existe un déficit del flujo sanguíneo a la piel, músculos estriados y órganos espláncnicos, consecuencia de la liberación endógena de vasoconstrictores (como vasopresina o angiotensina II). Estos vasoconstrictores ocasionan que el flujo sanguíneo se redistribuya hacia órganos vitales como el cerebro, el corazón y los riñones (Arnold et al., 1994). Dicha deficiencia de flujo sanguíneo provoca que la mucosa gástrica sea uno de los primeros órganos en sufrir daños, que se reflejan como daño isquémico. Dicho daño isquémico es provocado por el bajo suministro de oxígeno y de nutrientes (Beltran et al., 2006).

En pacientes en estado de choque, en los cuales hay daño tisular severo por hipoperfusión y perfusión o I/R, se genera una respuesta inflamatoria, primero local y luego sistémica que puede desencadenar el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS por las siglas en inglés Systemic Inflammatory Response Syndrome), como consecuencia de la liberación endógena de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs por las siglas en inglés Damage Molecular Associated Patrons) o alarminas. Los DAMPs son producidos por neutrófilos y células necróticas y activan a otras células del sistema inmune, incluyendo monocitos y neutrófilos (Lord et al., 2014). Los DAMPs activan también el sistema de

complemento, el cuál es considerado el principal responsable del inicio del SIRS, dado que está relacionado con el inicio del síndrome de liberación de citocinas (CRS por sus siglas en inglés) o tormenta de citocinas (CS por sus siglas en inglés) y la cascada de coagulación, lo cual puede conducir al desarrollo de síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS por sus siglas en inglés) y posteriormente a falla orgánica múltiple (MOF por sus siglas en inglés) (Huber-Lang et al., 2013).

Cuando la mucosa gástrica se encuentra bajo condiciones de I/R se presenta el SIRS, pues se observa un incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina (IL) 6 e IL-1 α , y de citocinas antiinflamatorias, como el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) y la IL-10 (Magierowska et al., 2019). El TNF- α induce cambios en la organización tisular de los túbulos seminíferos, como se ha mostrado en modelos de inflamación sistémica inducida por la administración de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (Bryan et al., 2020); mientras que IL-1 α induce la expresión de conexina 43 (Cx43), importante para llevar a cabo la espermatogénesis (Lui & Cheng, 2007).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Mecanismos de daño tisular por isquemia-reperfusión

Al obstruir el flujo sanguíneo se genera hipoxia, lo cual ocasiona un fallo en la cadena respiratoria y disminución de la síntesis de ATP. Bajos niveles de ATP y la falta de oxígeno promueven el metabolismo anaerobio, lo que genera un incremento la síntesis de lactato, fallas en la bomba de Sodio-Potasio (Na⁺- K⁺-ATPasa) que causan retención de sodio en el citoplasma de las células y potasio en el exterior de las células, fallas en las bombas de calcio (Ca²⁺-ATPasa), lo que limita el influjo de calcio al interior de retículo endoplásmico y también se induce el desensamblaje de los ribosomas. Por otro lado, el metabolismo anaerobio produce bajos niveles de ATP en comparación con el metabolismo aerobio, al mismo tiempo que provoca acumulación de lactato y con ello, acidosis metabólica. En conjunto la acumulación de iones de hidrógeno, sodio, potasio y calcio ocasiona hiperosmolaridad e induce el flujo de agua al citoplasma, provocando edema celular. Adicionalmente la retención de iones de hidrógeno disminuye el pH celular, lo que reduce la actividad enzimática, al mismo tiempo que disminuye la expresión génica y con ello la concentración de enzimas antioxidantes, por lo cual el estrés oxidante aumenta (Wu et al., 2018).

Al restaurar el flujo sanguíneo, se restaura también el suministro de oxígeno al tejido, lo cual exacerba aún más el daño celular y conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), a través de vías enzimáticas como la de la xantina oxidoreductasa y la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS). La xantina oxidoreductasa durante el estado hipóxico aumenta su afinidad por O₂ y genera radicales superóxidos. La iNOS durante el estado hipóxico produce especies reactivas de nitrógeno que contribuyen a generar estrés oxidante. Las ROS ocasionan disfunción endotelial, daño al ADN y respuesta inflamatoria. Así, la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo pueden conducir a muerte celular, ya sea por apoptosis o necrosis (Wu et al., 2018).

Durante la respuesta inflamatoria que se da en la reperfusión, numerosos macrófagos, neutrófilos y linfocitos son reclutados al órgano isquémico y en conjunto con las células endoteliales pueden generar ROS, citocinas proinflamatorias tales como TNF- α y un aumento en la producción de NO (de Groot & Rauen, 2007). De igual forma la isquemia se asocia con un aumento en la concentración tisular de IL-17A, la cual induce una infiltración de neutrófilos y macrófagos y promueve la necrosis en órganos periféricos como el riñón y el intestino delgado después de un proceso de I/R en hígado, lo que se atribuye principalmente SIRS (Park et al., 2011).

2.2 Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)

El SIRS se presenta comúnmente en pacientes en estado crítico o de choque como una respuesta sistémica a diversos estresores, como: trauma, cirugía mayor, inflamación aguda, infecciones o I/R. Cuando el SIRS se presenta como respuesta a un proceso infeccioso se le denomina “sepsis” y las alteraciones sistémicas que se presentan durante dicho padecimiento, como la liberación masiva de citocinas pueden conducir al desarrollo de MFO y culminar en la muerte del paciente (Chakraborty & Burns, 2022).

El evento característico del SIRS se llama síndrome de liberación de citocinas (CRS) o tormenta de citocinas (CS), durante el cual incrementa la liberación sistémica de citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6 principalmente) y antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β principalmente). La CS puede afectar a otros órganos de manera negativa, al promover incrementos locales en los niveles de citocinas (Jarczak & Nierhaus, 2022).

El SIRS como consecuencia de daño tisular (trauma o I/R), se debe a la liberación endógena de DAMPs y alarminas por daño celular mecánico o necrosis. Los DAMPs, pueden tener distintos orígenes y pueden ser moléculas no relacionadas entre sí, el ADN mitocondrial y

los péptidos formilados mitocondriales (FP). Ambos liberados durante la necrosis y pueden activar y reclutar a los neutrófilos circulantes, esto induce en ellos un fenotipo proinflamatorio y con ello el SIRS (Figura 1) (Zhang et al., 2010). Las alarminas liberadas durante el daño tisular son: 1) “high mobility group box 1” (HMGB1), una proteína nuclear con una alta actividad proinflamatoria (por reclutamiento de células inflamatorias) que es liberada por macrófagos en respuesta a LPS, TNF- α e IL-1 β ; 2) proteínas S100, proteínas de unión a calcio liberadas por fagocitos en los sitios de inflamación o por células necróticas, que incrementan la permeabilidad vascular (Bianchi, 2007); 3) proteínas de choque térmico (HSP), chaperonas moleculares con actividad de reclutamiento de células inflamatorias; 4) ATP extracelular, el cual es liberado por las células necróticas, por lo que actúa como una co-alarmina pues complementa la inflamación inducida por DAMPs mitocondriales (Pugin, 2012).

Los DAMPs y alarminas liberados en el tejido dañado también activan el sistema del complemento, al inducir el rápido incremento de las anafilotoxinas C3a y C5a en suero, con lo que contribuyen a desencadenar el SIRS (Burk et al., 2012; Lord et al., 2014). El sistema del complemento tiene como principales funciones la eliminación de microorganismos cuando se presenta sepsis y la eliminación de células dañadas (trauma o I/R). Sin embargo, puede desencadenar el descontrol en la respuesta inflamatoria (SIRS) y en los sistemas de coagulación, empeorando el estado del paciente y conduciendo a MOF (Huber-Lang et al., 2013; Rittirsch et al., 2012). Aunque el mecanismo exacto, por el cual inicia el SIRS no se conoce con exactitud, existe evidencia de que el daño tisular severo modifica el transcriptoma de los leucocitos circulantes, incrementando la expresión de genes relacionados con la respuesta a citocinas proinflamatorias (IL-6) y antiinflamatorias (IL-10) y de genes relacionados con la extravasación; estos últimos podrían estar relacionados con el inicio del SIRS (Xiao et al., 2011).

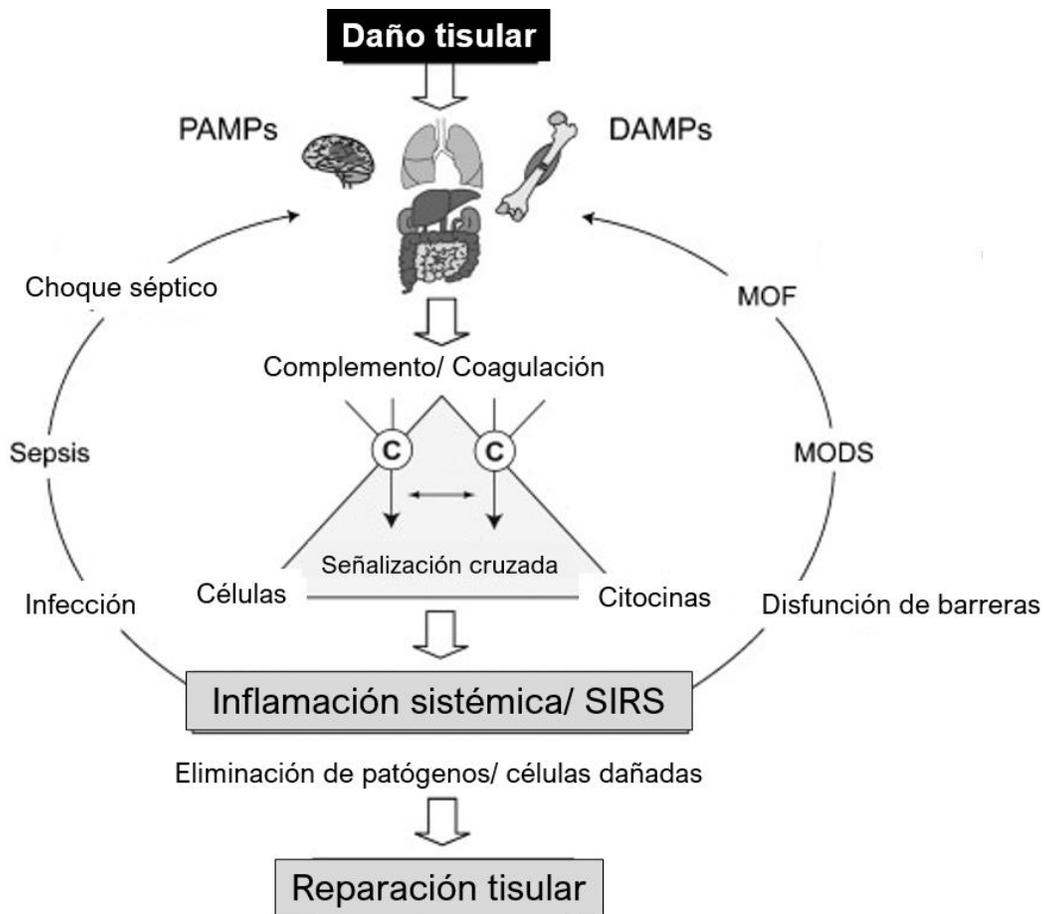


Figura 1. Daño tisular y desarrollo de SIRS. Abreviaturas: Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), falla orgánica múltiple (MOF), síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS) y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) (modificado de Huber-Lang et al., 2013).

Una vez que los microorganismos o las células dañadas han sido eliminadas, el SIRS se resuelve con una respuesta antiinflamatoria sistémica, en la cual incrementan los niveles de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β , así como de los antagonistas de los receptores de citocinas proinflamatorias, como el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA) (Lord et al., 2014). Esta respuesta antiinflamatoria sistémica recibe el nombre de síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria (CARS) y se presenta por días o semanas, mientras que los niveles de citocinas proinflamatorias disminuyen hasta alcanzar niveles basales (Gentile et al., 2012). Sin embargo, el CARS puede desencadenar inmunosupresión. Esto debido a que un incremento en los niveles de citocinas antiinflamatorias, en conjunto con elevados niveles de péptidos del sistema del complemento como C5a generan inmunosupresión. C5a en elevadas concentraciones (100

nM) reduce la expresión de sus propios receptores (C5aR y C5L2) en neutrófilos, lo cual se relaciona con menor producción de citocinas proinflamatorias como IL-8 en pacientes que presentan SIRS (Xu et al., 2016), reducción en la capacidad de los neutrófilos para responder a C5a y a PAMPs y muerte de timocitos, aumentando el riesgo de sepsis y con ello contribuyendo al desarrollo de SIRS y posterior MOF (Ward, 2004).

Las alteraciones en los niveles de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias que se presentan durante el SIRS, pueden tener efectos en órganos periféricos, como el testículo, en el cuál las citocinas regulan varios procesos (Lui & Cheng, 2007)

2.3 Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y su influencia en la organización tisular de los túbulos seminíferos

Actualmente no se ha evidenciado que las alteraciones sistémicas que se presentan durante la I/R se extiendan a los órganos reproductivos. Sin embargo, en padecimientos que involucran la respuesta inflamatoria sistémica como la exposición a LPS, si se han observado alteraciones morfológicas. Cuando se administra LPS por vía intraperitoneal a ratas macho adultas se observa desorganización del epitelio seminífero, degeneración de las espermátidas redondas tempranas y apoptosis de los espermatoцитos en paquiteno; adicionalmente, la capacidad de las células de Leydig para responder a LH se afectada, lo repercute en el proceso espermatogénico al reducirse los niveles de testosterona. Los efectos anteriormente mencionados se cree son debido a la producción de citocinas proinflamatorias locales durante la respuesta inflamatoria sistémica, como TNF- α e IL-6 (Bryan et al., 2020).

En modelos de I/R en el tracto gastrointestinal se observa que aumentan los niveles circulantes de IL-1, IL-6 y TNF- α (Stallion et al., 2005), que pueden inducir cambios en la organización tisular de los túbulos seminíferos. La inflamación sistémica ocurre durante el proceso de isquemia-reperfusión, en pacientes con síndrome de falla multiorgánica (MSFO) y en modelos animales de isquemia reperusión en riñón, testículo y mucosa gástrica se observa incremento en la concentración sérica de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 (Pinsky et al., 1993; Han & Lee, 2019; Sekmenli et al., 2017).

Durante el SIRS que se presenta en I/R, incrementan los niveles séricos de citocinas pro y antiinflamatorias (Jarczak & Nierhaus, 2022). Las citocinas son importantes reguladoras de la barrera hematotesticular (BTB) y de la espermatogénesis (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos de las citocinas más importantes en la regulación de la barrera hematotesticular (BTB) y la espermatogénesis.

| Citocina | Efecto | Secreción/Expresión | Acciones |
|---------------|------------------|--|--|
| TNF- α | Proinflamatorio | Células germinales y macrófagos intersticiales (Li et al., 2009) | ↓ ocludina y claudina 11. Permite la migración de espermatoцитos preleptoteno al reestructurar la BTB (Lui & Cheng, 2007). |
| TGF- β | Antiinflamatorio | Células de Sertoli y células germinales (Xia et al., 2009) | ↓ claudina 11, ocludina y ZO-1 Induce reestructuración de la BTB, modula la endocitosis y expresión de moléculas de adhesión (Lui et al., 2001) |
| IL-1 α | Proinflamatorio | Células de Sertoli (Li et al., 2009). | ↑ RNAm de conexina 43 (Fiorini et al., 2006). Regula ensamblaje de citoesqueleto (Chojnacka et al., 2016). |
| IL-6 | Proinflamatorio | Células de Leydig (Pérez et al., 2012) | Relocalización de claudina 11 y conexina 43 (Pérez et al., 2012) Efecto dependiente de concentración: si es baja incrementa expresión de ocludina, si es alta disminuye la expresión (Zhang et al., 2015) |
| IL-10 | Antiinflamatorio | Macrófagos testiculares (Chen et al., 2016) | Mantenimiento del privilegio inmune (Cheng et al., 2016) Regulación de la espermatogénesis (Białas et al., 2009) |

2.4 Organización tisular del testículo de rata

Los testículos son órganos ovoides que se encuentran en el interior del saco escrotal, fuera de la cavidad abdominal. En la rata cada testículo mide aproximadamente 20 mm de longitud y tiene 14 mm de diámetro. Estos están conectados con la pared abdominal a través de cordones espermáticos adheridos al saco escrotal por los ligamentos escrotales y cada testículo se encuentra suspendido en el extremo de un saco musculofascial, alargado y continuo con la pared anterior del abdomen (Maynard & Downes, 2019).

El testículo posee una organización tisular característica de un órgano capsular, posee una cápsula y varios lobulillos.

2.4.1 Cápsula

La cápsula está compuesta por tres capas, las tunicas vaginal, albugínea y vasculosa. La túnica vaginal está formada por tejido conectivo denso que envuelve parcialmente al testículo y forma el mesorquio. El mesorquio contienen los vasos sanguíneos y el mediastino testicular. La túnica albugínea está compuesta de tejido conectivo denso irregular hecho principalmente de fibras de colágeno dispuestas en haces de manera irregular. La túnica vasculosa presenta una composición similar a la túnica albugínea pero con un gran contenido de vasos sanguíneos grandes y haces de fibras nerviosas no mielinizadas (Leeson & Cookson, 1974; Maynard & Downes, 2019)

2.4.2 Lobulillos

Los lobulillos son estructuras delimitadas por los tabiques. Cada lobulillo contiene de uno a cuatro túbulos seminíferos plegados sobre sí mismos. El espacio intersticial entre los túbulos seminíferos se encuentra compuesto por células de Leydig, vasos linfáticos y sanguíneos (Pawlina, 2020).

2.4.3 Células de Leydig

Las células de Leydig son células grandes, poligonales que contienen gotas lipídicas, se encuentran en los espacios intersticiales entre los túbulos seminíferos. Las células de Leydig secretan esteroides, testosterona principalmente, por lo que contienen un retículo endoplásmico liso muy desarrollado (Li et al., 2012).

2.4.4 Túbulos seminíferos

Dentro de los túbulos seminíferos se lleva a cabo la espermatogénesis, proceso por el cuál son producidos los espermatozoides. Dentro de los túbulos seminíferos se encuentra el epitelio seminífero (Figura 2), el cual está compuesto por las células de Sertoli, las células espermatogénicas y la lámina propia.

2.4.5 Células de Sertoli

Las células de Sertoli conforman la pared de los túbulos seminíferos; son células cilíndricas con evaginaciones apicales y laterales, con las cuales rodean a las células espermatogénicas contiguas. Las células de Sertoli interactúan con la membrana basal, son capaces de ensamblar y desensamblar uniones celulares entre ellas y con las células germinales, lo que es pieza clave en el proceso de espermatogénesis (Griswold, 2018).

2.4.6 Células espermatogénicas

Las células espermatogénicas son aquellas que se dividen regularmente para dar lugar a espermatozoides maduros. Las células espermatogénicas derivan de las células germinales primordiales, están organizadas en capas poco definidas de desarrollo progresivo y se ubican entre las células de Sertoli (França et al., 1998). Las células espermatogénicas surgen a partir de la división asimétrica de las células madre espermatogénicas, que durante la mitosis generan una célula madre espermatogénica y una espermatogonia. La espermatogonia lleva a cabo divisiones mitóticas sucesivas para dar origen a diferentes tipos de espermatogonias y a los espermatocitos. Los espermatocitos llevan a cabo la meiosis para dar origen a las espermátidas haploides., Mediante el proceso de diferenciación las espermátidas haploides dan origen a los espermatozoides (Wang et al., 2022). Las células madre espermatogénicas y las espermatogonias se encuentran en contacto con la lámina basal del túbulo seminífero, mientras que, las espermátidas están ancladas en la porción apical de las células de Sertoli (Meistrich & Hess, 2013).

2.4.7 Lámina propia

La lámina propia está compuesta por tejido conjuntivo estratificado que carece de fibroblastos típicos. En mamíferos la lámina propia incluye varias capas de células peritubulares mioideas y fibras de colágeno ubicadas en la parte exterior. Las células peritubulares mioideas poseen características de células musculares lisas, por lo que pueden

contraerse rítmicamente para crear ondas que ayudan al movimiento de los espermatozoides y líquido testicular a lo largo de los túbulos seminíferos (Figura 2) (Pawlina, 2020).

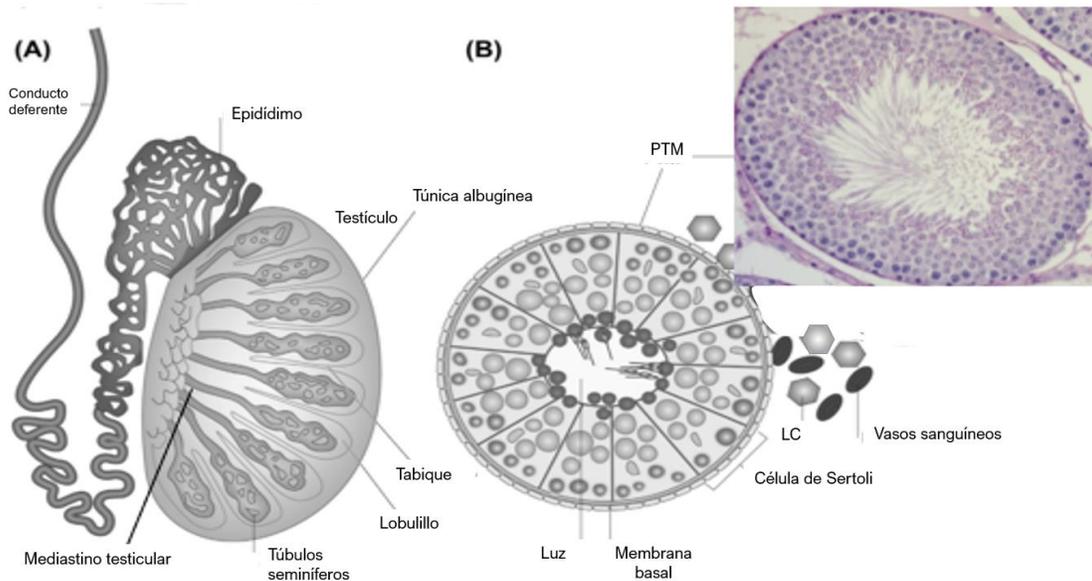


Figura 2. Estructura y organización del testículo y túbulos seminíferos de la rata. A) Diagrama que muestra la organización tisular del testículo en tabiques, lobulillos. B) Diagrama y corte histológico que muestran la organización celular de los túbulos seminíferos. El inserto en B muestra un corte histológico de túbulo seminífero (arriba izquierda), tinción H&E a X50 (Maynard & Downes, 2019). Abreviaturas: Células peritubulares mioideas (PTM) y células de Leydig (LC) (modificado de Smith y Walker, 2015).

2.5 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso cíclico a través del cual se producen los espermatozoides en el epitelio seminífero. La espermatogénesis empieza cuando las espermatogonias inician una serie de divisiones mitóticas con citocinesis incompleta para formar cadenas de espermatogonias y culmina cuando las espermatidas son liberadas a la luz del túbulo seminífero mediante un proceso llamado espermiación (Figura 3) (Dong et al., 2022).

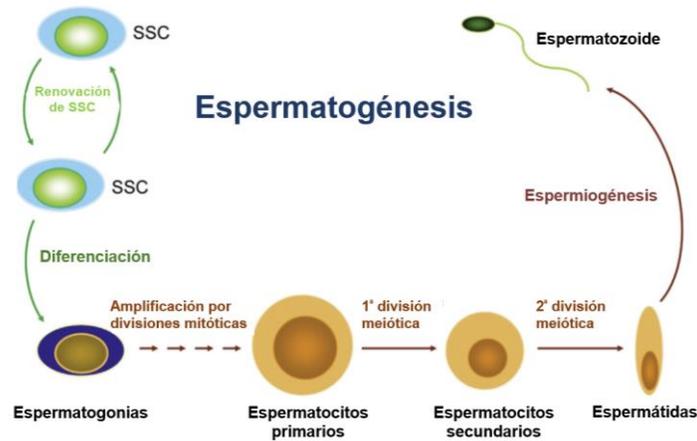


Figura 3. Espermatogénesis. Diagrama que muestra las divisiones celulares que ocurren durante el proceso de espermatogénesis, en el que las SSC dan origen a las espermátogonias, las espermátogonias a los espermátocitos primarios y estos a los espermátocitos secundarios, que a su vez dan origen a las espermátogonias, las cuales llevan a cabo la espermiogénesis para diferenciarse en espermatozoides. Abreviaturas: Células madre espermatogénicas (SSC). (modificado de Valli et al., 2015).

2.5.1 Modelo A_s de células madre espermatogénicas

El modelo de las células madre espermatogénicas A_s fue propuesto a inicios de los 70's, este modelo propone que las células madre espermatogénicas residen en la lámina basal de los túbulos seminíferos. En el modelo las células madre espermatogénicas se denominan $A_{separadas}$ (A_s) y pueden dividirse por mitosis para regenerarse a sí mismas o para generar espermátogonias $A_{pareadas}$ (A_{pr}). Las A_{pr} dan origen a las espermátogonias $A_{alineadas}$ (A_{al}). En ese punto las espermátogonias no están diferenciadas. Cuando comienzan a diferenciarse las A_{al} dan origen a las espermátogonias A_1 . El proceso continúa con la generación progresiva de las espermátogonias A_2 , A_3 , A_4 e intermedias. Posteriormente, las espermátogonias intermedias dan origen a los espermátocitos primarios y secundarios, los cuáles generan las espermátidas (Figura 4) (Valli et al., 2015).

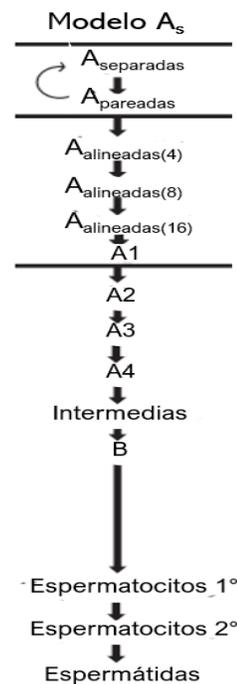


Figura 4. Modelo A_s de espermatogénesis (modificado de Valli et al., 2015)

El proceso de espermatogénesis se divide en tres fases: la división de las espermátogonias, espermátocitos hasta la formación del

espermatozoide maduro: espermatogonia, espermatocítica, de espermatida o espermiogénesis.

2.5.2 Fase de espermatogonia

Las espermatogonias A_s se dividen por mitosis, si estas completan la cariocinesis producen dos espermatogonias A_s y si no la completan permanecen unidas por puentes citoplasmáticos y dan origen a las espermatogonias A_{pr} . Las espermatogonias A_{pr} se dividen nuevamente por mitosis para generar cuatro espermatogonias que ahora se denominan A_{al} y que continúan dividiéndose por mitosis para formar cadenas de 8, 16 y hasta 32 espermatogonias A_{al} . Estas cadenas largas de espermatogonias A_{al} cesan la actividad mitótica y comienzan a diferenciarse en espermatogonias A_1 (Tagelenbosch & de Rooij, 1993). Las espermatogonias A_1 entran en mitosis y dan origen a las espermatogonias A_2 , las cuales generan a las espermatogonias A_3 , que a su vez producen a las espermatogonias A_4 . Las espermatogonias A_4 dan origen a las espermatogonias intermedias y estas últimas a las espermatogonias tipo B que, mediante una última división mitótica, generan a los espermatoцитos primarios en preleptoteno (Phillips et al., 2010; Valli et al., 2015).

2.5.3 Fase espermatocítica

Los espermatoцитos primarios en preleptoteno se sitúan cercanos a la membrana basal del túbulo seminífero, llevan a cabo la meiosis I y se encuentran en la profase I. Los espermatoцитos primarios en leptoteno y zigoteno avanzan en la profase I migran hacia la luz del túbulo seminífero, gracias a la reestructuración de las uniones celulares existentes entre las células de Sertoli (Russell, 1977). En los espermatoцитos primarios en paquiteno ocurre el proceso de recombinación genética entre los cromosomas. Una vez que los espermatoцитos culminaron el proceso de recombinación genética, el uso meiótico se ensambla y los cromosomas comienzan a migrar hacia la placa metafásica, los espermatoцитos en este punto se denominan espermatoцитos en diacinesis. Los espermatoцитos primarios que entran en metafase I son $4n$ debido a la recombinación genética. La meiosis I culmina con la telofase I que da como resultado dos células hijas $2n$, que ahora se denominan espermatoцитos secundarios. Los espermatoцитos secundarios llevan a cabo la meiosis II y dan origen a las espermatidas. Durante la meiosis II no hay síntesis de material genético y por lo cual las espermatidas resultantes son $1n$ (Hess & de Franca, 2009; Iwasa & Marshall, 2019).

2.5.4 Fase de espermatida o espermiogénesis

Durante esta fase ocurre la diferenciación de las espermatidas hacia espermatozoides. En la rata, la fase de espermiogénesis se divide en cuatro subfases: 1) de Golgi, 2) de casquete, 3) de acrosoma y 4) de maduración. Las fases a su vez se dividen en 19 estadios de diferenciación de las espermatidas (Figura 5).

1. Fase de Golgi: durante esta fase se forma el “gránulo acrosomal” a partir del aparato de Golgi y comprende tres estadios (1-3): 1) las espermatidas presentan estructuras esféricas en la zona perinuclear del aparato de Golgi (ideosoma) y son visibles dos centriolos en su citoplasma, 2) aparecen de uno a dos gránulos pro acrosomales en el ideosoma y 3) los gránulos pro acrosomales se fusionan para formar el gránulo acrosomal.
2. Fase de casquete: el gránulo acrosomal crece y la espermatida comienza a perder su forma redonda. Esta fase está conformada por los cuatro estadios siguientes (4-7): 4) el gránulo acrosomal se aplana; 5) la membrana del gránulo acrosomal protruye fuera de este y se extiende sobre la superficie del núcleo; 6) la membrana de la espermatida forma un “casquete” definido sobre el gránulo acrosomal, el ideosoma se separa de éste y los centriolos con filamentos elongados se posicionan cerca del núcleo; 7) el casquete alcanza su tamaño máximo y el gránulo acrosomal no posee una orientación definida.
3. Fase de acrosoma: el casquete y el gránulo acrosomal se orientan hacia la membrana basal del túbulo seminífero, el gránulo acrosomal adquiere una forma aguzada. Esta fase la conforman siete estadios (8-14): 8) el gránulo acrosomal y el casquete se orientan hacia la membrana basal del túbulo seminífero, mientras que el citoplasma y los centriolos migran al extremo opuesto del núcleo; 9) el núcleo se aplana ligeramente y protruye hacia el casquete, el gránulo acrosomal se elonga; 10) el extremo caudal del casquete se extiende hacia la región caudal del núcleo y el extremo apical adquiere una forma aguzada; 11) el núcleo y el casquete se elongan aún más; 12) el núcleo alcanza su longitud máxima; 13) el núcleo se vuelve más delgado y el citoplasma se condensa a lo largo del flagelo en formación; 14) el núcleo se contrae y se vuelve más corto.
4. Fase de maduración: durante esta fase la espermatida se convierte en espermatozoide. Esta fase está conformada por cinco estadios (15-19): 15) se forma una estructura similar a una membrana a lo largo del extremo dorsal de la célula,

entre el extremo caudal del acrosoma y el ángulo dorsal del núcleo, comienza a formarse la pieza media; 16) la estructura similar a una membrana desaparece y el acrosoma se extiende caudalmente hasta el ángulo dorsal; 17) el acrosoma y el casquete se desplazan frontalmente respecto al núcleo; 18) el citoplasma se desplaza de la pieza media a la cabeza para ser fagocitado por la célula de Sertoli y formar el cuerpo residual y 19) la espermátida se separa del epitelio seminífero y pasa a denominarse espermatozoide (Hess & de Franca, 2009; Leblond & Clermont, 1952).

2.5.5 Ciclo del epitelio seminífero

El proceso de espermatogénesis en la rata tiene una duración de 48-53 días. Durante este proceso es posible observar distintas asociaciones celulares en el epitelio seminífero, mediante cortes transversales de los túbulos seminíferos (las características celulares y nucleares de todos los tipos celulares se describen en el anexo 14.2.6). En dichas asociaciones se observan desde espermatogonias hasta espermátidas en diferentes fases (Meistrich & Hess, 2013). En la rata se han descrito 14 diferentes asociaciones celulares que forman el ciclo del epitelio seminífero y se denominan estadios (Figura 5) (Clermont & Harvey, 1965).

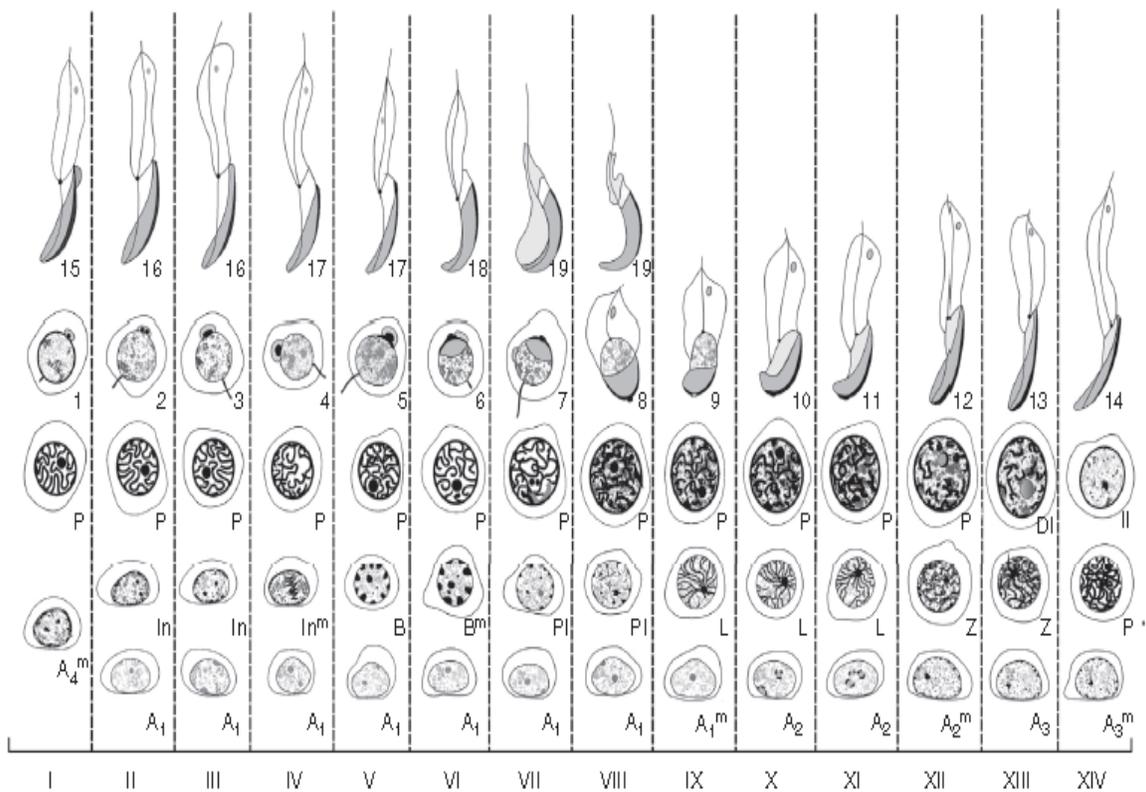


Figura 5. Ciclo del epitelio seminífero en rata. Cada columna muestra la organización celular de cada estadio del ciclo del epitelio seminífero (estadios I a XIV). Abreviaturas: generaciones de los cuatro tipos de espermatogonias tipo A (A1-4), espermatogonias intermedias (In), espermatogonias tipo (B), espermatocitos en preleptoteno (Pl), espermatocitos en leptoteno (L), espermatocitos en cigoteno (Z), espermatocitos en paquiteno (P), espermatocitos en diacinesis (Di), espermatocitos secundarios (II) y espermátidas en diferenciación (1-19) (Tomado de Smith & Walker, 2014).

En la rata los estadios del ciclo del epitelio seminífero se distribuyen longitudinalmente a manera de ondas a lo largo de túbulo seminífero, de tal manera que en un corte transversal del túbulo seminífero se observa un solo estadio del ciclo de epitelio seminífero en todo el epitelio. En secciones longitudinales de 3 – 10 mm y van cambiando conforme avanza el proceso de espermatogénesis (Figura 5) (Perey, 1961).

A lo largo de los estadios del ciclo del epitelio seminífero la barrera hematotesticular (BTB, por sus siglas en inglés) presenta una serie de adecuaciones que permiten garantizar el mantenimiento de condiciones estables durante el paso de los espermátocitos preleptoteno de la membrana basal al compartimento luminal (Yan et al., 2008). La BTB está compuesta por diferentes tipos de uniones celulares que dividen al epitelio seminífero, proveen una función de barrera y confieren el privilegio inmune a los espermátocitos (Meng et al., 2022).

2.6 Barrera Hemato-Testicular (BTB)

La espermatogénesis está regulada por una serie de factores endógenos, que incluyen a la testosterona, la hormona folículo estimulante, la hormona luteinizante y los estrógenos (O'Donnell et al., 2000). El epitelio seminífero está conformado por las células de Sertoli, éstas presentan proyecciones citoplasmáticas extensas, las cuales entran en contacto con las células de Sertoli adyacentes. Dichas proyecciones forman la base de las uniones celulares especializadas en el epitelio seminífero. Las uniones célula Sertoli-célula de Sertoli forman la barrera hematotesticular y se reestructuran a medida que se desarrollan las células germinales y pasan a través del epitelio seminífero, las células de Sertoli tienen como principal función proporcionar nutrientes y factores de crecimiento a las células germinales en desarrollo (Mruk & Cheng, 2015).

La BTB por sus siglas en inglés divide al epitelio seminífero en dos compartimientos: el compartimiento basal y el compartimiento apical (adluminal). El compartimiento basal contiene espermatoцитos en leptoteno y preleptoteno y espermatogonias, en el compartimiento apical se encuentran sólo células meióticas y postmeióticas y en este compartimiento se lleva a cabo la Meiosis 1 y 2, espermiogénesis y espermiación (Cheng & Mruk, 2012). Sin embargo, los espermatoцитos preleptóticos se mueven hacia la luz del túbulo seminífero, a través de las uniones estrechas que forman la BTB y continúan su desarrollo hasta completarlo en la luz del túbulo seminífero. Lo anterior indica que el mantenimiento de la integridad de las uniones de la BTB es necesaria para la espermatogénesis, ya que si las uniones Sertoli-Sertoli se desensamblan las células germinales no podrán completar su desarrollo (Smith & Walker, 2014). La BTB además crea una barrera inmunológica que impide el contacto de antígenos provenientes de la circulación sistémica con las espermátidas, evitando así la creación de anticuerpos anti-espermatozoides (Su et al., 2010).

2.6.1 Estructura de la barrera hemato-testicular (BTB)

La barrera hematotesticular está compuesta por tres componentes principales: a) una barrera física, compuesta por las uniones de las células de Sertoli, b) una barrera fisiológica, formada por los transportadores de las células de Sertoli, que controla el movimiento de sustancias hacia y desde la luz del túbulo seminífero, y c) una barrera inmunológica, formada por factores inmunoreguladores y mecanismos de tolerancia. Los tres componentes forman un ambiente adecuado en la región adluminal que es inmunoprotector

y controlador de las condiciones bioquímicas para permitir el proceso de maduración de las células germinales meióticas y post-meióticas (Stanton, 2016).

En el epitelio seminífero existen 4 diferentes tipos de uniones celulares: uniones ocluyentes (TJ por sus siglas en inglés), especializaciones ectoplásmicas, desmosomas y uniones comunicantes. Las TJ coexisten y funcionan en conjunto con las especializaciones ectoplásmicas para formar la BTB entre células de Sertoli, los desmosomas se encuentran principalmente entre espermatocitos y células de Sertoli, las uniones comunicantes funcionan como canales que permiten la difusión de metabolitos, segundos mensajeros, iones y moléculas con pesos menores a 1 kDa, se encuentran en las regiones de la membrana plasmática que contiene TJ y especializaciones ectoplasmáticas basales. Las TJ, especializaciones ectoplásmicas y las uniones comunicantes se unen a los microfilamentos de actina y los desmosomas se unen a los filamentos intermedios para anclarse al citoesqueleto (Figura 6) (Cheng & Mruk, 2012).

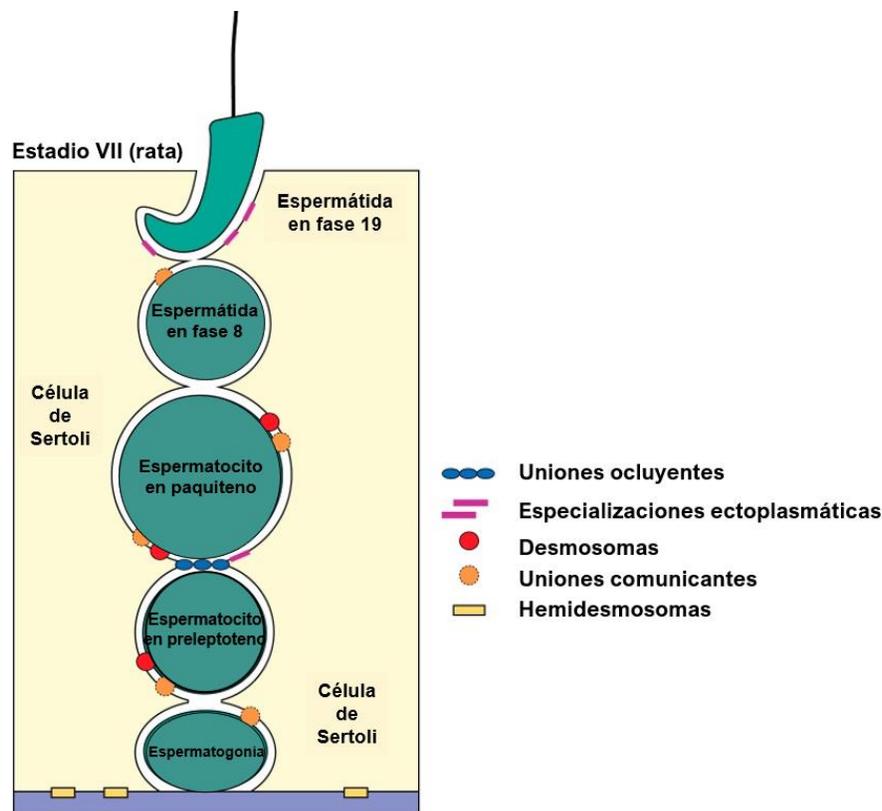


Figura 6. Tipos de uniones celulares en el epitelio seminífero de rata adulta. La figura muestra la disposición de los diferentes tipos de células espermatogénicas y las uniones celulares que se presentan entre células de Sertoli, y entre células de Sertoli y células espermatogénicas en el epitelio seminífero (modificado de Mruk & Cheng, 2015).

2.6.2 Importancia de las uniones ocluyentes en el mantenimiento y función de la BTB

Las TJ están formadas por proteínas integrales de membrana, como lo son ocludinas y claudinas, proteínas periféricas de membrana como zónula ocludens 1-2 (ZO-1 y ZO-2), proteínas de señalización como c-Src y PKC- α y proteínas transportadoras como Cdc42 y Rab3B (Mruk & Cheng, 2004). Entre las proteínas integrales de membranas más importantes se encuentra la claudina 11 (Cld11), pues se considera esencial para que la espermatogénesis se pueda llevar a cabo (Figura 7) (Stanton, 2016). De hecho, en ausencia de Cld11 se desarrolla esterilidad, pues esta regula la maduración de las células de Sertoli. Cuando Cld11 no se expresa las espermatidas elongadas no continúan con su diferenciación, el lumen de los túbulos seminíferos no está bien definido y las espermatidas en general presentan una localización anormal. Cabe destacar que dichas alteraciones se observan a partir del día 28 postnatal. En días posteriores (hasta el día 60 postnatal) las células de Sertoli no se vuelven quiescentes y adquieren características de células de Sertoli no maduras (proliferación y pérdida de polaridad), forman agregados en la membrana basal de los túbulos. Adicionalmente, en ausencia de Cld11 incrementa la expresión de genes relacionados con el citoesqueleto, y las uniones ocluyentes y adherentes esto muestra que Cld11 no solo regula la maduración de las células de Sertoli, también regula el ensamblaje de las uniones ocluyentes y el mantenimiento de la estructura del epitelio seminífero (Mazaud-Guittot et al., 2010).

Las claudinas y las ocludinas son proteínas pertenecientes a la familia de las tetraspaninas, las cuales poseen cuatro dominios transmembranales, dos asas externas y dos colas citoplasmáticas cortas (Kierszenbaum & Tres, 2012).

Los agregados de diferentes tipos de claudinas diversifican y le confieren diferentes propiedades de barrera/canal a las TJ, de modo que se permite la difusión selectiva de solutos por la vía paracelular (Furuse, 2010). Las claudinas crean zonas de adhesión de 10 nm a través del espacio intercelular, en esas zonas forman poros que permiten el paso de pequeños solutos (Anderson & Van Itallie, 2009). Las TJ restringen el paso de moléculas grandes y células a través de la BTB, con lo que crean un microambiente apto para el proceso de espermatogénesis (N. Li et al., 2012).

Por otro lado, las ocludinas poseen sus dominios NH₂ y COOH dentro del citoplasma celular y en este último poseen dominios de unión a las proteínas ZO-1 y ZO-2 (Itoh et al., 1999). Las ZO-1 y ZO-2 son proteínas altamente fosforiladas que interactúan con proteínas

quinasas y fosfatasas como Src, c-YES, FAK y ERK1/2, siendo así las proteínas clave de la regulación del mantenimiento y reestructuración de la estructura de las TJ en la BTB (Figura 7) (Mruk & Cheng, 2010).

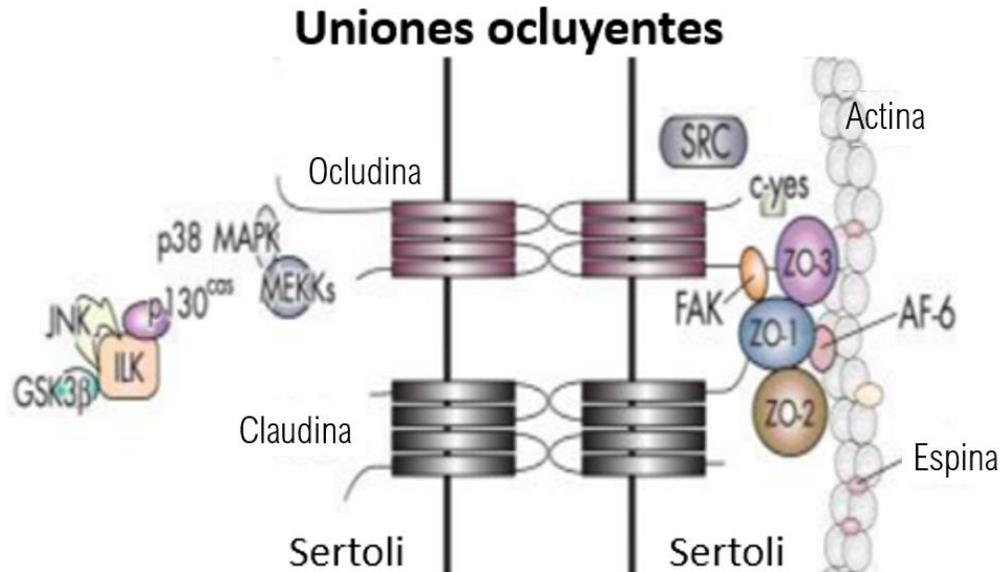


Figura 7. Estructura de las proteínas principales que conforman las uniones ocluyentes. La imagen muestra las proteínas transmembranales claudina y ocludina, proteínas adaptadoras y moléculas reguladoras de las TJ. Abreviaturas: cinasa de adhesión focal (FAK), Zónula Ocludens (ZO), afadina 6 (AF-6). Cinasas reguladoras: C-yes (familia Src), p38-MAPK, MEKK, P130, JNK, ILK y GSK3β (Modificado de Mruk & Cheng, 2015).

2.6.3 Importancia de las uniones comunicantes en la BTB

Las uniones comunicantes (Gap junctions en inglés) se forman entre células de Sertoli y entre células germinales y células de Sertoli por proteínas denominadas conexinas (Pelletier, 1995). La conexinas 43 (Cx43) es una de las principales constituyentes de las uniones comunicantes de las células de Sertoli; en su ausencia se observa disrupción de la espermatogénesis debido al arresto en nivel de espermatogonias y a la expresión alterada de otras proteínas de la BTB, como Cld11 y β -catenina (Gerber et al., 2016).

Las conexinas son proteínas integrales de membrana, forman agregados de seis monómeros denominados conexones. Los conexones constituyen estructuras cilíndricas que atraviesan la membrana y se agregan en placas de aprox. 0.3 μ m de diámetro (Kierszenbaum & Tres, 2012). Los conexones permiten el intercambio de moléculas pequeñas (>1kDa) entre los compartimientos citoplasmáticos de dos células adyacentes,

sean uniones célula de Sertoli-célula de Sertoli o célula de Sertoli-célula germinal (Figura 8) (Pointis et al., 2005).

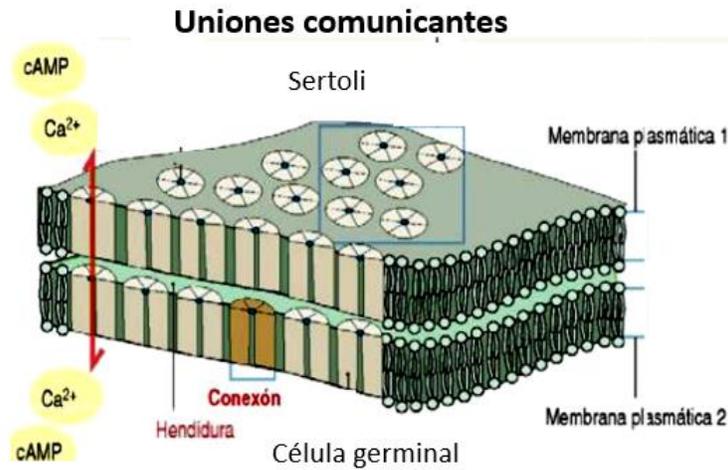


Figura 8. Estructura de las uniones comunicantes. La figura muestra los agregados de conexones distribuidos en la membrana de una célula de Sertoli y una célula germinal, así como lagunas moléculas que pasan a través de los conexones (modificado de Kierszenbaum & Tres, 2012).

2.6.4 Regulación de la BTB por citocinas proinflamatorias

El proceso de la espermatogénesis es altamente regulado mediante mecanismos paracrinos, autocrinos y endocrinos, que involucran la participación de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-2, IL-6 y TNF- α producidas por las células de Sertoli, leucocitos y células germinales (Syriou et al., 2018). Dichas citocinas pro-inflamatorias regulan la proliferación de las células germinales y las funciones secretoras de las células de Sertoli y Leydig. Así mismo, regulan la dinámica de reestructuración de las moléculas de adhesión celular presentes en las TJ para permitir la migración de los espermatozoides en preleptoteno hacia la luz de los túbulos seminíferos (Huleihel & Lunenfeld, 2004).

El TNF- α es secretado principalmente por las células germinales y los macrófagos intersticiales de los túbulos seminíferos. El TNF- α presenta picos de expresión en el estadio VIII del ciclo del epitelio seminífero y altera la integridad de la BTB (Li et al., 2009). El TNF- α regula de manera negativa la expresión de las moléculas de adhesión más importantes en las TJ, como lo son ocludina y claudina 11. La inhibición de la expresión de dichas proteínas ayuda a la reestructuración de las uniones y a la migración de los espermatozoides (Lui & Cheng, 2007).

La citocina IL-1 α se expresa en los túbulos seminíferos en todos los estadios del ciclo del epitelio seminífero excepto en el estadio VII (Li et al., 2009). En cuanto a los efectos de IL-1 α , esta disminuye los niveles de mRNA de Cx43 (Fiorini et al., 2006). Sin embargo, la IL-1 α también afecta el citoesqueleto de las células de Sertoli, al modificar el ensamblaje de los microfilamentos de F actina y la polimerización de la α -tubulina así como la interacción entre estos (Chojnacka et al., 2016).

Por último, la citocina IL-6 producida por las células de Leydig ejerce sus efectos reguladores induciendo la relocalización de las moléculas Cld11 y ocludina de las TJ. Los efectos en la relocalización de Cld11 son observables con dosis de 50 ng/ml (Pérez et al., 2012). Cabe destacar, que los efectos de IL-6 sobre la localización de ocludina son dependientes de su propia concentración. De hecho, a concentraciones de 50 pg/ml incrementa su expresión y relocalización ;, mientras que a concentraciones mayores a 100 pg/ml, el efecto parece contrario en cuanto a su expresión. De este modo, los efectos reguladores de la BTB por IL-6 parecen directamente dependientes de la concentración de esta (Zhang et al., 2015).

3. ANTECEDENTES

En modelos de I/R en intestino se ha encontrado daño colateral en otros órganos. El daño en otros órganos es consecuencia de un proceso inflamatorio agudo, que se presenta durante la reperfusión. El proceso inflamatorio agudo conduce a la translocación de bacterias a la circulación, lo que puede generar sepsis y con ello una respuesta inflamatoria sistémica y MODS (G. Li et al., 2021). En un modelo de I/R en hígado (60 min/ 24 h) Park y colaboradores encontraron daño colateral en órganos como el riñón, que presenta necrosis e infiltración de leucocitos en túbulos proximales y en intestino delgado, donde se observa degranulación de células de Paneth (Park et al., 2011). De la misma manera, en otros modelos de isquemia-reperfusión en el intestino se observa una respuesta inflamatoria sistémica, la cual si no es controlada puede conducir al desarrollo del síndrome de falla multiorgánica y la muerte (Stallion et al., 2005).

El daño a órganos periféricos inducido por I/R ha sido más estudiado en modelos de I/R intestinal, en los cuales se reportó que en un tiempo de isquemia de 30 min por bloqueo de la arteria mesentérica superior (SMA, por las siglas en inglés Superior Mesenteric Artery) y 30 min de reperfusión, incrementa la permeabilidad vascular en el duodeno, el mesenterio y en los pulmones, donde además se presenta edema celular e infiltración de neutrófilos

(Souza et al., 2000a). En el mismo modelo, pero con un tiempo de 120 min de isquemia 120 min de reperusión, se incrementan los niveles de TNF- α intestinales y en suero a la par, lo cual confirma que en el modelo de I/R del tracto digestivo se presentan alteraciones sistémicas y locales (Souza et al., 2000b), debidas al desbalance sistémico en los niveles de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) y antiinflamatorias (IL-10). Esto indica que en el modelo de I/R en intestino, se presenta el CRS característico de SIRS (Souza et al., 2001, 2002).

De manera similar al modelo de I/R intestinal, en un modelo de I/R de la mucosa gástrica (30 min/ 3 h) se observa un incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en suero, lo que indica que en este modelo también se está presentando SIRS (Magierowska et al., 2019). Dichas citocinas pueden inducir cambios en la organización tisular de los túbulos seminíferos, por un lado el TNF- α y el TGF- β inhiben la expresión de Cld11 (Lui & Cheng, 2007) e IL-1 α incrementa la expresión de Cx43 (Fiorini et al., 2006). A pesar de que en modelos de I/R gastrointestinal se presentan alteraciones sistémicas, así como en órganos periféricos, hasta el momento no se ha evidenciado que estas alteraciones afecten a los órganos reproductivos.

De manera similar, en enfermedades acompañadas de inflamación sistémica crónica de bajo grado, como la obesidad, se presenta una disminución considerable de los parámetros de Johnsen (ver tabla 1 en sección "MÉTODO"), del diámetro de los túbulos seminíferos y una reducción en el número de células germinales. Dichos efectos pueden atribuirse al incremento en las concentraciones sistémicas de adipocinas (leptina y resistina) y citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 (Leisegang et al., 2019).

Por otro lado, en modelos de infecciones sistémicas puede desarrollarse infertilidad, lo que parece estar relacionado con el incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias. Específicamente, TNF- α e IL-6 que incrementan sus niveles tisulares en testículo y en la circulación a consecuencia de la inyección intraperitoneal de LPS, esas citocinas pueden alterar la organización tisular de los túbulos seminíferos (Bryan et al., 2020). Cuando se administran dosis altas (5.0 mg/ kg por vía intraperitoneal) de LPS se presentan diversas alteraciones estructurales del epitelio seminífero que incluyen formación de espacios apicales, pérdida de espermátidas redondas, presencia de vacuolas nucleares en espermátidas, descamado germinal adluminal e infiltración de células inmunes (leucocitos polimorfonucleares y células mononucleares) (O'Bryan et al., 2000)

Por último, nuestro equipo de trabajo ha encontrado que el modelo de I/R en mucosa gástrica incrementa la expresión de la subunidad 1α del factor inducible de hipoxia (HIF- 1α) y de la iNOS, que son marcadores de daño por inflamación y por estrés oxidante (Peña-Mercado et al., 2018).

El daño tisular que se presenta en la mucosa gástrica a los 60 min de isquemia es reversible; sin embargo, el que se presenta a los 90 min y 120 min, es irreversible, por lo tanto nosotros pensamos que en dichos tiempos de I/R podrían presentarse daños colaterales a otros órganos (Peña-Mercado et al., 2022).

4. JUSTIFICACIÓN

El daño I/R influye de manera significativa en el desarrollo de otros padecimientos, como embolias cerebrales e inflamación sistémica. Este fenómeno puede ocurrir en varios órganos y tejidos por distintas razones, entre las más importantes en el ambiente clínico, se encuentran los infartos al miocardio, fallos en los trasplantes de órganos o por cirugía cardiovascular.

Cuando un órgano o tejido sufre de I/R se observan varias alteraciones sistémicas, entre ellas, el incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias a nivel sistémico y el aumento en los niveles de lactato. Esto tiende a afectar a otros órganos y tejidos causando una falla multiorgánica y la muerte. Los padecimientos en los cuales se genera inflamación sistémica pueden generar afectaciones a niveles del epitelio seminífero, ya sean infecciones bacterianas como *Clamydia* (Bryan et al., 2020) o infecciones virales como SARS-CoV-2 (Peirouvi et al., 2021).

Es preciso por ello, estudiar los efectos que dichas alteraciones inflamatorias puedan ejercer sobre otros órganos, ya que se ha demostrado que citocinas sistémicas como TNF- α , IL- 1α e IL-6 pueden tener efectos negativos en órganos reproductivos masculinos, afectando el proceso de espermatogénesis. A la fecha no existen estudios sobre los efectos de la inflamación sistémica ocasionada por modelos de isquemia-reperfusión sobre el epitelio seminífero. Los que resulta importante debido a que las capacidades reproductivas de los individuos jóvenes que presentan cuadros de isquemia-reperfusión e inflamación sistémica, podrían verse afectadas de forma permanente.

En este estudio se analizarán entonces los efectos que la I/R en mucosa gástrica pueda ejercer sobre la organización tisular del túbulo seminífero y con ello afectar la capacidad reproductiva del individuo.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto ejerce el modelo de isquemia-reperfusión en mucosa gástrica sobre la organización tisular del túbulo seminífero de ratas macho de la cepa Wistar?

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la isquemia-reperfusión de mucosa gástrica sobre la organización tisular de los túbulos seminíferos, sobre la expresión y localización de las moléculas Cld11 y Cx43 y sobre los niveles de TNF- α en suero y en testículo.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el efecto de la I/R en mucosa gástrica sobre la organización tisular de los túbulos seminíferos.

Analizar el efecto de la I/R en mucosa gástrica sobre el ciclo del epitelio seminífero.

Estudiar el efecto de la isquemia-reperfusión en mucosa gástrica sobre la expresión de Cld11 y Cx43.

Determinar la localización de Cx43 mediante inmunohistoquímica.

Evaluar el efecto de la I/R en mucosa gástrica sobre los niveles de TNF- α en suero y en testículo.

8. HIPÓTESIS

En un modelo de isquemia-reperfusión de mucosa gástrica se modificará la organización tisular de los túbulos seminíferos, la expresión y localización de las moléculas Cld11 y Cx43 los niveles de TNF- α en suero y testículo.

9. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se obtuvieron ejemplares de ratas Wistar macho adultas (250-300 g) de la Planta Piloto 7 de la UAM Iztapalapa, las cuales se mantuvieron en ciclos regulares de 12 h luz y 12 h de oscuridad. Posteriormente, se dividieron de manera aleatoria en cuatro grupos: control, sham, I/R (60 min/ 24 h) e I/R (120 min/ 24 h), cada grupo estuvo conformado por 3 ejemplares, excepto el grupo control que fue de 4 individuos.

De cada grupo se obtuvieron muestras de testículo, las cuales fueron procesadas para microscopía fotónica de campo claro (tinción con hematoxilina y eosina) y para medir la expresión de Cld11 y Cx43 mediante Western Blot (Figura 9).

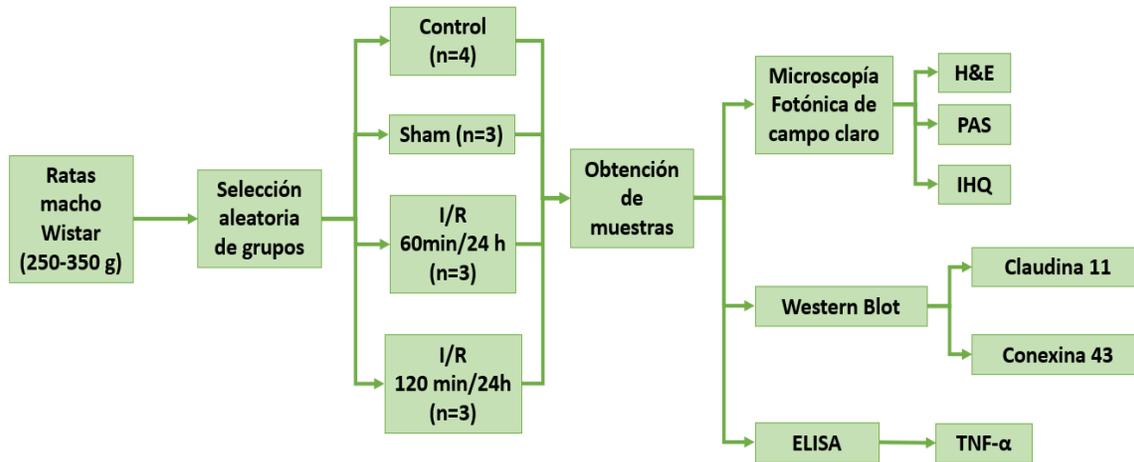


Figura 9. Diseño experimental. Abreviaturas: I/R: Isquemia-Reperfusión, H&E: Tinción con Hematoxilina-Eosina, PAS: Ácido-Peryódico, reactivo de Schiff.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron ratas macho de la cepa Wistar adultas con peso corporal de 250-350 g y edad de 2-3 meses. Los ejemplares se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos: control, sham, I/R (60 min/ 24 h) e I/R (120 min/ 24 h).

Todos los ejemplares fueron mantenidos bajo las condiciones especificadas en la NOM-062-ZOO-1999 en el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

10.1 Procedimiento

10.1.1 Anestesia

Los ejemplares se anestesiaron con una mezcla de xilacina (10 mg/kg) y ketamina (90 mg/kg). Una vez anestesiados se transportaron al quirófano. Durante la cirugía, los ejemplares permanecieron sedados con el anestésico inhalado isofluorano al 2% disuelto en oxígeno.

10.1.2 Cirugía: oclusión de la arteria celiaca

En los ejemplares control no se realizó procedimiento quirúrgico alguno, sólo se obtuvieron muestras con los ejemplares sedados. En cuanto a los ejemplares sham se realizó la

disección abdominal y se expuso el estómago, sin embargo, la arteria celiaca no se ocluyó. El estómago se mantuvo expuesto durante 120 min y posteriormente se suturó la herida y se dejó reposar al ejemplar por 24 h. Para el resto de los ejemplares se realizó el mismo procedimiento quirúrgico, en el cual se hizo una disección abdominal y se expuso el estómago, luego se pinzó la arteria celiaca durante el tiempo de isquemia correspondiente a cada grupo (60 ó 120 min), pasado el tiempo se retiró el pinzado de la arteria, se colocó el estómago en su posición original y se suturó la herida, posteriormente, se permitió la reperfusión durante 24 h.

10.1.3 Obtención de muestras

Una vez transcurrido el tiempo de reperfusión (24 h) los ejemplares se sometieron nuevamente a cirugía para obtener ambos testículos. El testículo derecho fue fijado con Bouin-Dubosq y se usó para las tinciones H&E y PAS. El testículo izquierdo se usó para inmunohistoquímica y Western blot. Las muestras para Western blot se congelaron hasta su procesamiento; mientras que el resto del tejido fue fijado en paraformaldehído.

La extracción de muestras sanguíneas para medición de citocinas proinflamatorias se realizó al finalizar el procedimiento quirúrgico. Se obtuvieron muestras de 1 mL de sangre mediante punción cardiaca. Estas fueron centrifugadas a 4500 rpm a 4°C durante 10 min, posteriormente se extrajo el sobrenadante y se almacenó en ultracongelación (-70°C)

10.1.4 Procesamiento histológico

Las muestras de testículo se fijaron en sus respectivos fijadores y se procesaron mediante una técnica histológica estándar de nuestro laboratorio (anexo 14.2.1) hasta obtener bloques para corte.

Los bloques obtenidos se utilizaron para obtener cortes sagitales de 5 µm del testículo completo, cortando desde la parte dorsal hasta la ventral y con bloque colocado de manera horizontal, utilizando un microtomo Leica (JUNG HISTOCUT). Los cortes se montaron en portaobjetos esmerilados (MADESA). Se obtuvieron 10 laminillas con 3 cortes cada una de los tejidos fijados con Bouin-Dubosq y 5 laminillas con 2 cortes cada una de los tejidos fijados con paraformaldehído. Los reactivos usados y tiempos de fijación se especifican a continuación.

10.1.4.1 Fijación con Bouin-Dubosq

Las muestras se fijaron en fijador Bouin-Dubosq (anexo 14.1.1.1) durante 24 h. Posteriormente, se lavaron con alcohol de 70° y se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol, empezando por 80° y aumentando 10° cada paso hasta llegar al alcohol absoluto. Una vez que las muestras se deshidrataron se procedió a aclararlas con xileno y luego se preincluyeron con tres inmersiones en parafina (Paraplast Plus, McCormick Scientific ®). Una vez transcurrido el tiempo de la preinclusión, las muestras se incluyeron para obtener bloques para corte.

10.1.4.2 Fijación con Paraformaldehído

Las muestras se fijaron en paraformaldehído (anexo 14.1.1.3) desde su obtención hasta el momento de ser procesadas. Posteriormente se lavaron con PBS y se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol, empezando por alcohol de 50° y aumentando en 10° cada paso hasta llegar a alcohol absoluto. Luego se aclararon con xileno y se preincluyeron con tres inmersiones en parafina (Paraplast Plus, McCormick Scientific ®). Una vez transcurrido el tiempo de la preinclusión, las muestras se incluyeron en parafina con el fin de obtener bloques para corte.

10.1.4.3 Tinción H&E

Los cortes se tiñeron mediante la técnica de tinción H&E (Hematoxilina y eosina) estandarizada en nuestro laboratorio (anexo 14.2.2) y luego se montaron con resina epóxica (Entellan ®) (Uribe-Aranzábal et al., 2006).

10.1.4.4 Tinción PAS

Los cortes se tiñeron mediante la técnica de tinción PAS (Periodic Acid-Schiff) estandarizada en nuestro laboratorio usando un kit de tinción PAS (Tinción de P. A. S., HYCEL ®, cat: 64295) (anexo 14.2.3), luego se montaron con resina epóxica (Entellan ®) (Uribe-Aranzábal et al., 2006).

10.1.4.5 Inmunohistoquímica

Los cortes se desparafinaron y se sometieron a recuperación antigénica (Retriever 2100, Electron Ciencias de Microscopía, Hatfield, PA, EE. UU.). Se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno y las uniones inespecíficas del anticuerpo con albúmina al 4%. Las laminillas se incubaron en el anticuerpo primario anti-conexina 43

[1:150] (anti connexin 43 (F-7), Santa Cruz Biotechnology ®, catalog: sc-271837) en una cámara húmeda a 4 °C durante la noche. A continuación, las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario [1:200] (antirabbit, Vector laboratories, cat: MP-7401) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) dentro de la cámara húmeda durante 2 h a temperatura ambiente. El complejo antígeno-anticuerpo se reveló con solución de diaminobencidina usando un kit de inmunodetección (Vector laboratories). Finalmente, las muestras se contratiñeron con hematoxilina y se montaron para su análisis (el procedimiento se explica más a detalle en el anexo 14.2.4) (Peña-Mercado et al., 2018). Las laminillas se escanearon con un escáner (Aperio CS2, Leica Biosystems). Las imágenes se digitalizaron usando el software Aperio ImageScope 12.4.6 (Leica Biosystems, Deer Park, IL, EE. UU).

Se tomó una imagen aleatoriamente de la parte craneal del testículo a una aumento X100 usando el software Aperio ImageScope 12.4.6 Leica Biosystems, Deer Park, IL, EE. UU) y cada de una estas imágenes se analizó mediante el software ImageJ, para cuantificar el área positiva a la inmunotinción para Cx43.

10.1.5 Categorización y análisis de la espermatogénesis

Se analizó mediante tinción H&E usando el criterio de Johnsen para la categorización de la espermatogénesis en una escala del 1-10 (Tabla 2) en 60 secciones transversales de túbulos seminíferos de la zona periférica de cortes sagitales de testículo (anexo 14.2.5.1) (Johnsen, 1970) que tuvieran un índice de circularidad mayor o igual que 7 (anexo 14.2.5.2).

El análisis se realizó usando el objetivo 10X de un microscopio fotónico de campo claro (Axioscope II, Carl Zeiss Microscopy, Thonwood, NY, USA) y las imágenes se obtuvieron con una cámara AxioCam Mcr5 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) adaptada al microscopio.

Adicionalmente, se realizaron mediciones de parámetros morfométricos de los túbulos seminíferos sugeridos por Johnsen. Los parámetros fueron: diámetro de los túbulos seminíferos, grosor del epitelio seminífero, área del epitelio seminífero y cantidad de células de Leydig en 30 campos (usando el objetivo 40X) (anexo 2.6.2). Dichos parámetros se midieron utilizando el software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA).

Tabla 2. Criterios de Johnsen de caracterización de espermatogénesis (Johnsen, 1970).

| Puntaje | Características |
|---------|---|
| 10 | Espermatogénesis completa con algunos espermatozoides, epitelio germinal organizado, con grosor regular y lumen abierto |
| 9 | Epitelio germinal desorganizado con algunos espermatozoides presentes y con un marcado desprendimiento u obliteración del lumen |
| 8 | Pocos espermatozoides presentes en la sección (< 5-10) |
| 7 | Sin espermatozoides presentes, pero con lagunas espermáticas presentes |
| 6 | Sin espermatozoides presentes y pocas espermáticas (< 5-10) |
| 5 | Sin espermatozoides ni espermáticas, pero con varios o algunos espermátocitos presentes |
| 4 | Pocos espermátocitos presentes (<5) sin espermáticas o espermatozoides presentes |
| 3 | Las espermatogonias son las únicas células germinales presentes |
| 2 | Sin células germinales, pero con las células de Sertoli presentes |
| 1 | Sin células presentes en la sección tubular |

10.1.6 Análisis de la frecuencia de los estadios del ciclo del epitelio seminífero

La tinción H&E sirvió para categorizar las 60 secciones transversales de túbulos seminíferos en la periferia (zona ventral, dorsal y caudal) de cortes sagitales del testículo (anexo 14.2.5.1) que tuvieran índice de circularidad mayor o igual a 7 (14.2.5.2). La categorización se realizó con el atlas de los 14 estadios (anexo 14.2.5.3), elaborado por nosotros usando el criterio de Leblond y Clermont (1952).

El análisis se realizó usando el objetivo 40X de un microscopio fotónico de campo claro (Axioscope II, Carl Zeiss Microscopy, Thonwood, NY, USA) y las imágenes para el atlas se obtuvieron con una cámara AxioCam Mcr5 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) adaptada al microscopio.

10.2 Procesamiento para Western Blot

Las muestras del testículo (1/4 del testículo de la parte inferior) se colocaron en ultracongelación hasta su procesamiento. Las muestras se descongelaron y se homogenizaron, posteriormente se agregó buffer RIPA con inhibidor de proteasas (ver anexo 14.1.3.2) y cocktail inhibidor de proteasas 1% (cOmplete mini, ROCHE Diagnostics®, catalog 11836153001), luego se homogenizó, se centrifugó y el sobrenadante se dividió en alícuotas. La concentración de proteína se determinó por un ensayo de Bradford usando un lector de placas de ELISA (H Reader 1, HLab®). Las proteínas (30 µg) se concentraron utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% con dodecilsulfato de sodio al 10% desnaturizante (SDS-PAGE) y se corrieron en gel de corrida (10 %) con 10% de SDS. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF. Luego las membranas se bloquearon y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-claudina 11 [1:2000] (Rabbit anti-Claudin 11, invitrogen™, Thermofisher®, catalog #36-4500) y anti-conexina 43 [1:1000] (Rabbit anti-Connexin 43, invitrogen™, thermofisher®, catalog 71-0700) toda la noche a 4°C. Luego, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado anti-Rabbit [1:1000] (Goat Anti-Rabbit, Vector Laboratories®, catalog BA-1000) y con complejo de avidina-biotina (ABC kit, Vector Labs PK6100), se revelaron con luminol usando un sistema de detección de quimioluminiscencia (Inmobilon® Western WBKLS0500). Las imágenes de transferencia se obtuvieron utilizando el sistema C-Digit para generación y análisis de imágenes (Li-COR iS image studio, versión 3.1) (para más detalles sobre el procedimiento ver anexo 12.2.4) (Viñuela-Berni et al., 2020). Los datos de las densitometrías se normalizaron con β-actina (42 kDa).

10.3 Medición de TNF-α en suero y en testículo mediante ELISA

El ensayo se realizó con un kit de ELISA de un solo paso para TNF-α en rata (TNF Alpha Rat SimpleStep ELISA® Kit, abcam®, Cat: ab100785) siguiendo las instrucciones del fabricante. El suero y las biopsias de testículo se congelaron a -70°C hasta su procesamiento. Sólo las muestras de testículo se homogenizaron y lisaron usando un buffer de lisis proporcionado por el fabricante. Luego se centrifugaron a 13500 rpm durante 45 min para obtener el sobrenadante.

Las muestras de suero y del testículo (25 µL), se colocaron en sus respectivos pozos, los cuales ya se encontraban sensibilizados por el fabricante y se incubaron por 2.5 h. Posteriormente se realizaron lavados con la solución de lavado proporcionada por el

fabricante y se incubaron con el anticuerpo biotinilado de detección para TNF- α por 1 h, se realizaron lavados nuevamente y se incubó con solución HRP-Streptavidin por 45 min. Luego, se realizaron lavados y se incubó con sustrato TBM de un solo paso por 30 min en oscuridad y por último se agregó solución stop y se leyó inmediatamente a 450 nm. La determinación del contenido de proteínas en las muestras de suero de y testículo se realizó mediante un ensayo de Bradford (para más detalles consultar anexo 14.2.5.3).

Finalmente, la placa fue leída en un lector de placas ELISA (H Reader 1, HLab ®) a 450 nm. Los datos de las absorbancias se normalizaron de acuerdo con el factor de dilución (1:4) y el contenido de proteína en cada muestra, la determinación de la concentración de TNF- α se realizó usando la ecuación de la recta obtenida de una curva standard de TNF- α especificada por el fabricante. Todas las muestras y la curva standard se realizaron por duplicado.

10.4 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos del score de Johnsen, mediciones morfométricas, se realizaron pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnoff. Posteriormente se realizó análisis por jerarquías (Kruskall-Wallis) usando el software Prisma. Se realizaron las pruebas posthoc de Dunn-Bonferroni para datos que no presentaban distribución normal y de Bonferroni para datos que presentaban distribución normal. Las comparaciones se realizaron entre todos los grupos: Control, Sham, Isquemia-Reperusión (60 min/24 h) e Isquemia-Reperusión (120 min/24 h). Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (ESM). El nivel de significancia utilizado fue $p < 0.05$.

Las frecuencias absolutas para los estadios del ciclo del epitelio seminífero se analizaron mediante una prueba de homogeneidad chi-cuadrada (χ^2) para comprobar la homogeneidad entre los cuatro grupos mediante el software Prisma. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

En cuanto a los datos obtenidos mediante Western blot, ELISA, Inunohistoquímica y del conteo de células de Leydig, no fue posible realizar pruebas de hipótesis, debido a la reducida cantidad de datos.

11. RESULTADOS

11.1 Score de Johnsen

Se midieron los parámetros morfológicos: diámetro de los túbulos seminíferos, grosor del epitelio seminífero, área relativa del epitelio seminífero y número de células de Leydig.

Se observaron cambios perjudiciales en la organización tisular de los túbulos seminíferos, estos se evidenciaron también cuantitativamente con el score de Johnsen, en el cual se observan cambios, principalmente en la cantidad de espermatozoides presentes en la luz de los túbulos seminíferos y en la organización tisular de los túbulos seminíferos (Figura 10 C-D y G-H).

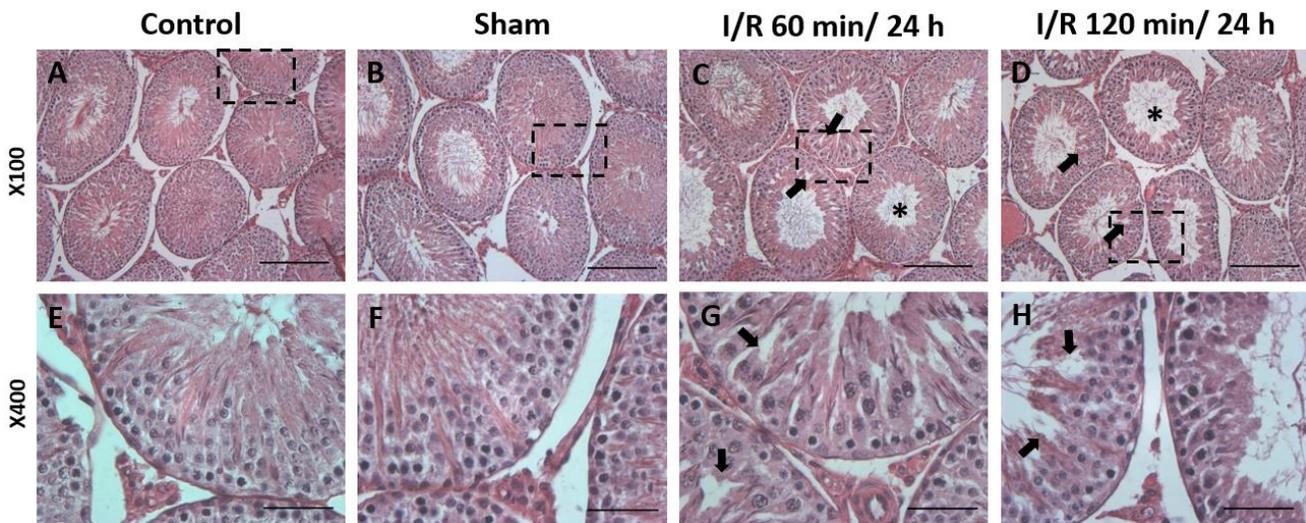


Figura 10. La I/R en mucosa gástrica induce desorganización del epitelio seminífero. Fotomicrografías de los túbulos seminíferos de los grupos A) control, B) Sham, C) I/R 60 min/ 24 h y D) I/R 120 min/ 24 h con la Tinción H&E. Aumento X100: (E-F) presentan micrografías en aumento X400 de los grupos E) control, F) Sham, G) I/R 60 min/ 24 h y H) I/R 120 min/ 24 h. Los asteriscos (*) muestran una disminución en la cantidad de espermatozoides presentes en la luz de los túbulos seminíferos. Las flechas negras indican desorganización del epitelio seminífero. La barra de escala representa una distancia de 200 μm en el aumento X100 y de 50 μm en el aumento X400.

Los datos obtenidos del score de Johnsen fueron analizados a través de una prueba de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas al comprar los grupos I/R 60 min/ 24 h e I/R 120 min/ 24 h contra el grupo control y con el grupo sham (Figura 11 A), disminuyendo el número de espermatozoides en la luz de los túbulos seminíferos y como desorganización (espacios en el epitelio seminífero) (Figura 10 C-D y G-H).

Adicional al score de Johnsen, se midieron algunos parámetros morfométricos complementarios, como el diámetro de los túbulos seminíferos, el cual incrementa en el grupo de I/R 120 min/ 24 h en comparación con los otros 3 grupos (Figura 11 B). Así mismo, al calcular el área total ocupada por el epitelio seminífero se observa un aumento al comparar el grupo de I/R 120 min/ 24 h con los otros tres grupos (Figura 11 C). El grosor del epitelio seminífero presenta diferencia significativa al comparar el grupo de I/R 60 min/ 24 h con el grupo control.

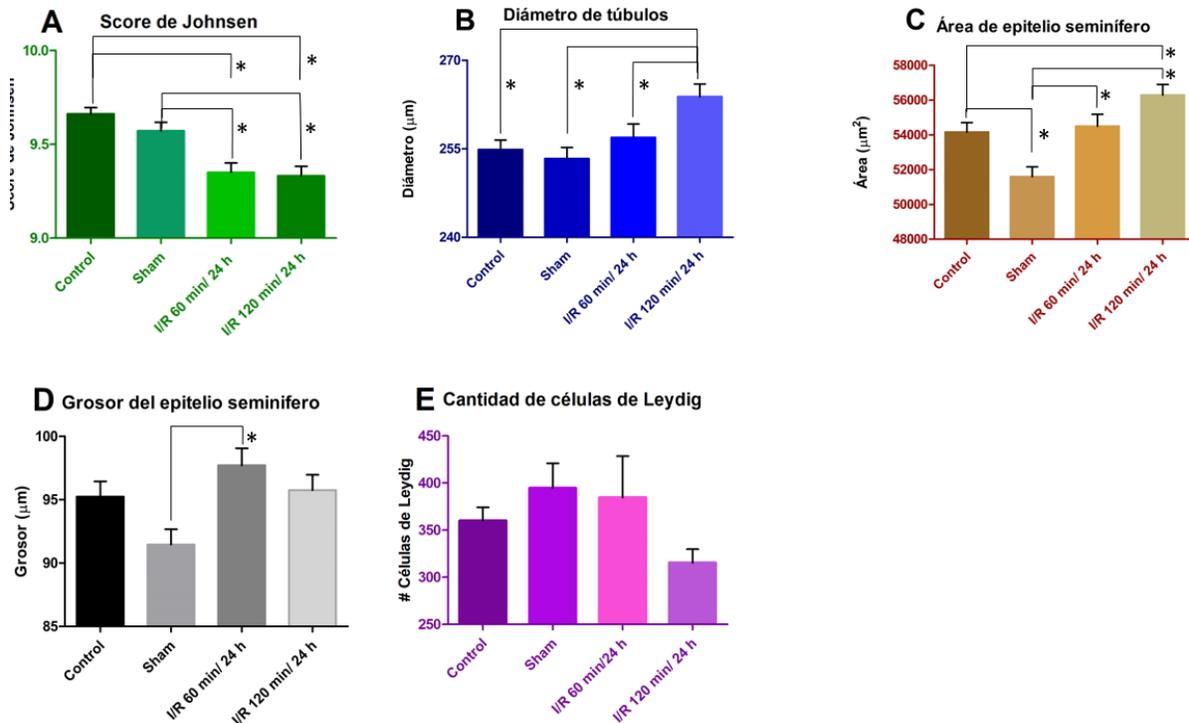


Figura 11. La I/R en mucosa gástrica modifica los parámetros morfométricos en los túbulos seminíferos. Representación gráfica de los parámetros morfométricos y de score de Johnsen. A) Promedio de Score de Johnsen por grupo, B) Diámetro de túbulos analizados en los grupos Control, Sham, IR 60min/24h e I/R 120min/24h, C) grosor del epitelio seminífero, D) Área del epitelio seminífero y E) Cantidad de células de Leydig. Los datos fueron analizados mediante una prueba de Kruskal-Wallis (excepto la cantidad de células de Leydig). Los asteriscos (*) indican diferencia significativa, $p < 0.05$. Los datos se expresan como media \pm ESM.

El último parámetro morfométrico medido fue el conteo de células de Leydig en 30 campos. (Figura 11 E). Se puede apreciar que el conteo de células de Leydig muestra una tendencia a disminuir en el grupo de I/R de 120 min/ 24 h.

Los valores de los parámetros morfométricos obtenidos en este trabajo son considerados como puntaje normal según Johnsen a pesar de presentarse diferencias entre los grupos, los valores de las medias son considerados como puntaje normal según Johnsen, es decir que los túbulos poseen una arquitectura normal (Johnsen, 1970).

11.2 Evaluación de la frecuencia de los estadios del ciclo del epitelio seminífero

Se categorizaron los diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero de acuerdo con las asociaciones celulares presentes en 60 secciones transversales de los túbulos seminíferos (anexo 14.2.5.3). Los resultados de la prueba de homogeneidad de χ^2 muestran que no existen diferencias entre las frecuencias absolutas de los estadios entre los cuatro grupos experimentales (Figura 12).

Cabe destacar que los estadios que se presentan con mayor frecuencia en los cuatro grupos experimentales son los estadios V, VIII (Figura 11). La determinación de los estadios que se presentan con mayor frecuencia se realizó promediando las frecuencias porcentuales de los estadios de los cuatro grupos experimentales, el promedio más alto fue para el estadio V, seguido por el XIII y por último el VIII.

Por otro lado, entre los estadios con menor presencia se encuentran el estadio X y XI. La determinación de los estadios presentes con menor frecuencia se realizó promediando la frecuencia porcentual de todos los estadios en los cuatro grupos experimentales.

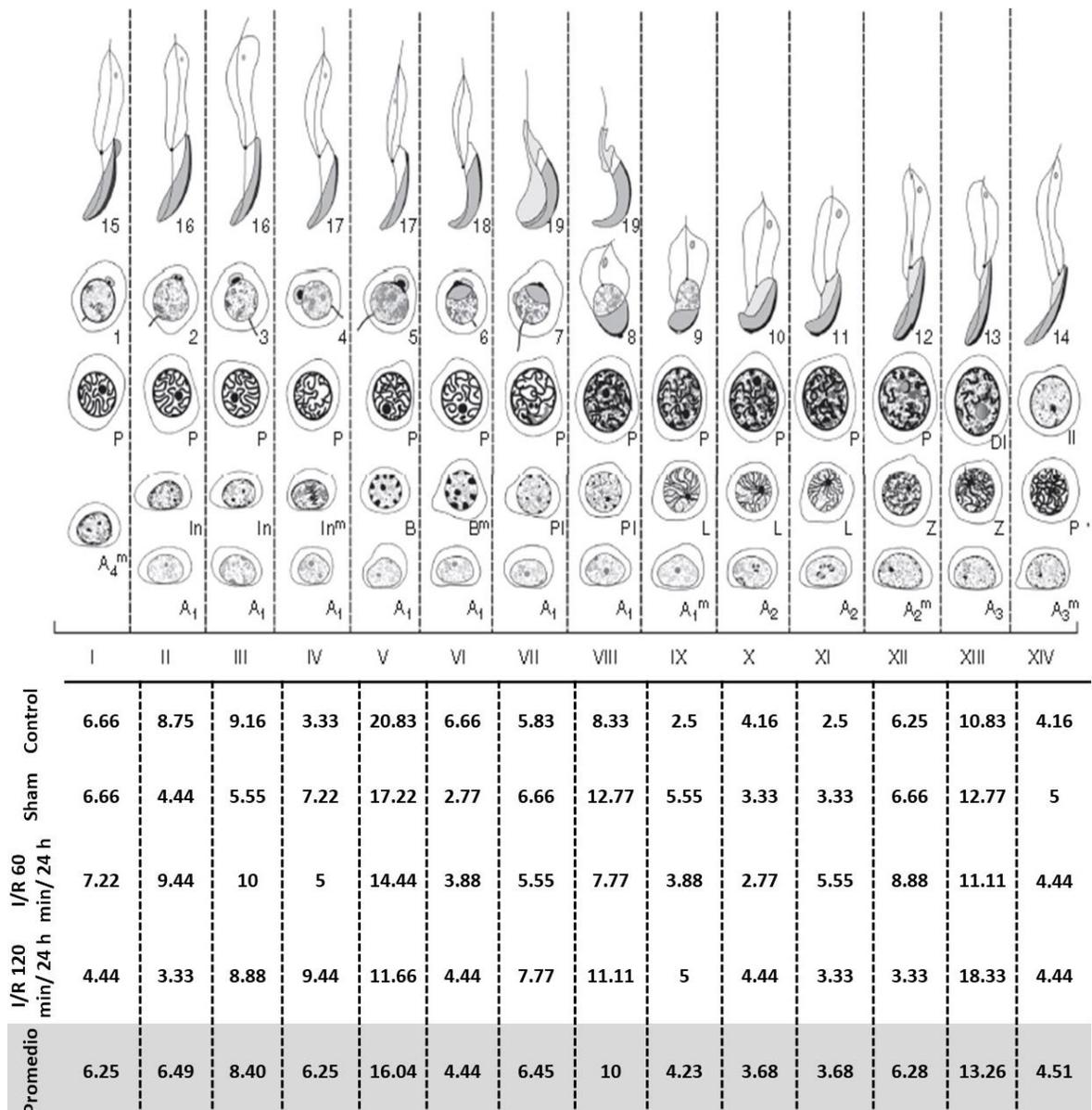


Figura 12. La I/R en mucosa gástrica no modifica la frecuencia de los estadios del ciclo del epitelio seminífero. Representación de la frecuencia (%) de cada estadio del ciclo del epitelio seminífero por grupo. Se utilizó una prueba de homogeneidad χ^2 , $p < 0.05$.

11.3 Evaluación de la expresión de claudina-11 y conexina-43 mediante Western Blot

Se observa una tendencia a disminuir en los niveles de expresión de Cld11 en grupos de I/R de 60 min/ 24 h y 120 min/ 24 h en comparación con los grupos sham y control (Figura 13 A). En cuanto a Cx43, contrario a lo que se observa con Cld11, se observa que los niveles de Cx43 tienden a aumentar en el grupo de I/R 120 min/ 24 h en comparación con los grupos control, sham e I/R 60 min/ 24 h (Figura 13 B).

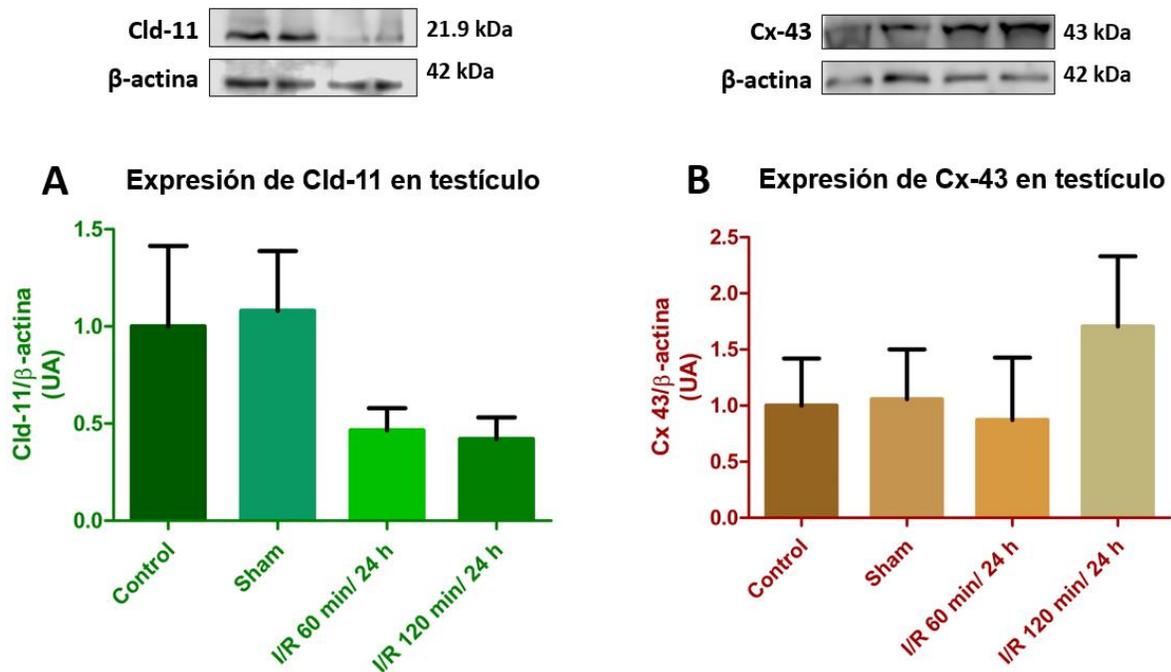
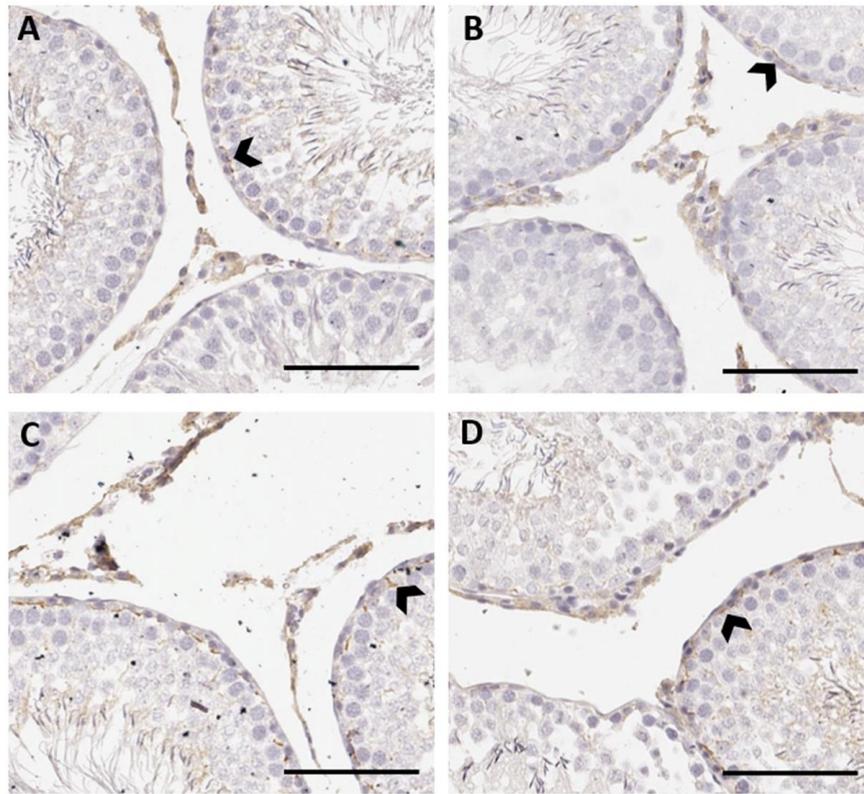


Figura 13. La expresión de Cld-11 y Cx-43 en el testículo no se ve modificada por la I/R en mucosa gástrica. Análisis por Western Blot de la expresión de A) Claudina-11 y B) Conexina-43 en los grupos Control, Sham, IR 60 min/24 h e I/R 120 min/24 h. Los datos son expresados como la media \pm ESM. UA: unidades arbitrarias.

11.4 Evaluación de la expresión y localización de conexina-43 mediante inmunohistoquímica

La expresión y localización de Cx43 no cambia en los túbulos seminíferos. La mayor concentración de Cx43 se presenta en el compartimento basal de los túbulos, esto indica que la localización de las uniones comunicantes es mayor en dicha área (Figura 14 A-D). Los datos obtenidos mediante la cuantificación del área positiva a la tinción de Cx43 nos permiten observar una tendencia de aumento en los grupos de I/R de 60 y 120 min/24 h (Figura 14 E), de forma similar a lo que se observa en la evaluación de la expresión de Cx43 (Figura 13 B).



E Evaluación de la expresión de Cx43 por Inmunohistoquímica

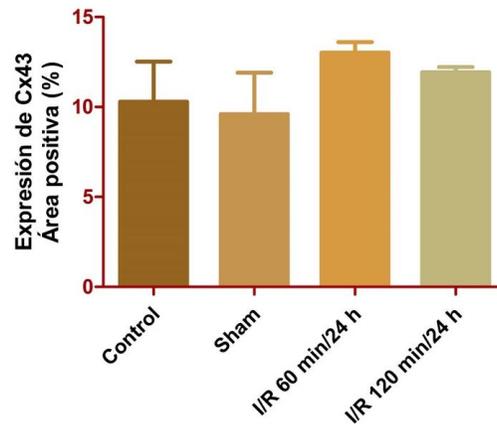
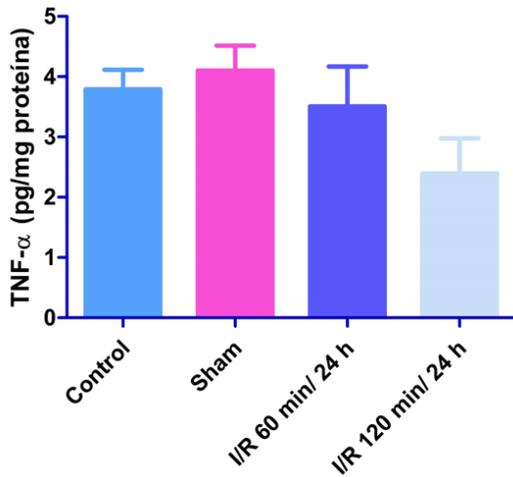


Figura 14. La expresión y localización de conexina 43 en los túbulos seminíferos no ve alterada por la I/R de mucosa gástrica. Control (A), sham (B), I/R 60 min/ 24h (C) e I/R 120 min/ 24 h. Aumento X200. Las cabezas de flecha muestran la expresión de conexina 43 en el compartimento basal de los túbulos seminíferos. Barras de escala: 100 μ m. E) Cuantificación del área de tinción positiva, los datos se expresan como porcentaje del área total. Los datos se expresan como porcentaje del área total \pm ESM.

11.5 Medición de los niveles de TNF- α en suero y en testículo mediante ELISA

Se observa una tendencia a la baja en los niveles de TNF- α en el grupo de I/R de 120 min/24 h, esto ocurre en suero y en testículo (Figura 15 A y B). Esto nos sugiere que el modelo de I/R en mucosa gástrica puede generar alteraciones sistémicas, que podrían ejercer efectos negativos en el testículo.

A Concentración de TNF- α en suero



B Concentración de TNF- α en testículo

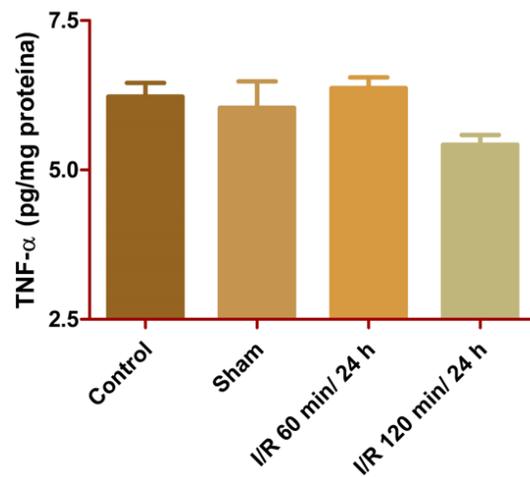


Figura 15. La I/R no modifica los niveles sistémicos o locales en el testículo de TNF- α . Análisis de la expresión de TNF- α en A) Suero y B) Testículo en los grupos Control, Sham, IR 60min/24h e I/R 120min/24h. Los datos son expresados como la media \pm ESM en pg/mg de proteína.

12. DISCUSIÓN

12.1 Análisis de la integridad de los túbulos seminíferos mediante el Score de Johnsen

El score de Johnsen es un método rápido para el análisis de la espermatogénesis en los testículos, dicho score se basa en un puntaje que va desde 1 a 10 y depende de la presencia o ausencia de varios tipos celulares en el epitelio seminífero (Johnsen, 1970). Para realizar el análisis algunos autores analizan 80 túbulos por ejemplar de manera aleatoria (Saribal et al., 2020), mientras que otros analizan 20 túbulos (Karakuş et al., 2021) ó 50 túbulos (Ganjani et al., 2021). En este estudio analizamos 60 secciones transversales de túbulos seminíferos por ejemplar. Esta cantidad de túbulos nos permitió obtener una variabilidad reducida tanto en el score de Johnsen, como en los parámetros morfométricos,

permitiéndonos tener una mayor precisión estadística para analizar los cambios morfométricos en los túbulos seminíferos.

La inflamación sistémica es una condición que se presenta en varias enfermedades, como la obesidad, síndrome metabólico e infecciones sistémicas. Se caracteriza por el aumento en los niveles de citocinas pro y antiinflamatorias e indicadores de inflamación como la proteína C reactiva (Leisegang et al., 2019). Cuando se presenta un proceso inflamatorio sistémico inducido por una dieta alta en carbohidratos (obesidad), cambia la morfología de los túbulos seminíferos, en forma de atrofia o pérdida de la organización estructural (Fan et al., 2018). En este estudio mostramos que la inflamación sistémica inducida por I/R provoca pérdida de la organización estructural de los túbulos seminíferos, disminución del score de Johnsen y aumento en el diámetro de los túbulos seminíferos. Los cambios en la organización estructural del epitelio seminífero que observamos en el grupo de I/R de 60 min/ 24 h (Figura 10 C y G) es muy similar a lo encontrado por Fan et al (2018), quienes atribuyen dichos cambios al aumento en los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 tanto en suero como en el plasma seminal y en testículo. Las alteraciones morfológicas del epitelio seminífero que observamos, pueden ser atribuidas a cambios en los niveles de TNF- α en suero y en testículo, como se muestra en modelos de dieta alta en fructosa, donde también se observan cambios morfológicos relacionados a alteraciones en la estructura del epitelio seminífero (Yildirim et al., 2019). Los cambios que se presentan en la organización estructural del epitelio seminífero se observan en diferentes grados, de allí que existan índices como el Score de Johnsen (Johnsen, 1970). Sin embargo, es interesante observar que a mayor tiempo de I/R aumenta también el grado de cambio, pues los cambios que observamos en los túbulos seminíferos del grupo de I/R de 120 min/ 24 h (Figura 10 D y H) son muy similares a los cambios observados por O'Bryan et al. (2000), al administrar altas dosis de LPS bacterianos (5 mg/ Kg) (*E. coli*). Ellos muestran espacios apicales en el epitelio seminífero que indican disrupción de las uniones celulares, pérdida de espermátidas redondas, así como presencia de vacuolas nucleares. Por lo cual podemos intuir que el grado de cambio en la organización estructural de los túbulos seminíferos es directamente proporcional al tiempo de isquemia, siendo de menor grado en grupo de I/R 60 min/ 24 h y de mayor en el grupo de I/R 120 min/ 24 h.

Es interesante destacar que los cambios observados en los parámetros morfométricos (diámetro de los túbulos seminíferos, grosor del epitelio seminífero y área del epitelio seminífero) se relacionan con procesos de recuperación en túbulos seminíferos dañados.

En ratas Wistar con daño en el epitelio seminífero inducido por temperatura (40-42 °C), el tratamiento con extracto de *Punica granatum* L. incrementa el diámetro de los túbulos seminíferos y el grosor del epitelio seminífero incluso más que en condiciones normales, esto es similar al incremento que mostramos en los parámetros morfológicos medidos en nuestro modelo. Cabe destacar que a mayor dosis del extracto, el incremento en ambos parámetros es mayor y esto lo relacionan los autores directamente con un proceso de recuperación y con el subsecuente incremento en la eficiencia de la espermatogénesis, pues también incrementa el número de células germinales (Utomo et al., 2019). Este proceso de reparación se relaciona también con incrementos en los niveles de testosterona en suero, consecuencia de la administración de extracto de *Launaea acanthodes* en un modelo de hiperglicemia en ratas (Mohammadi et al., 2016), así como con procesos de recuperación frente a radiación gamma, donde la administración de carnosina incrementa el diámetro de los túbulos seminíferos por encima de los valores de las condiciones controles, dicho incremento también se relaciona con una restauración de la cantidad de espermatogonias presentes en los túbulos seminíferos (Haeri et al., 2014). Por último, el aumento en el diámetro de los túbulos seminíferos también se relaciona con el incremento en el grosor del epitelio seminífero. La administración de curcumina aumenta el diámetro de los túbulos y el grosor del epitelio, similar a lo que observamos en nuestro modelo, esto se relaciona con procesos de reparación y prevención del daño (Cheraghi et al., 2017). El incremento en los parámetros morfométricos de los túbulos seminíferos y la coincidencia de estos resultados con estudios donde se busca revertir el daño en túbulos seminíferos nos lleva a pensar que los cambios que observamos en dichos parámetros (Figura 10) se deben a un proceso de recuperación, consecuencia debida al CARS, el cual también indicaría que los cambios en las moléculas de adhesión celular se deben a dicho proceso de reparación.

12.2 Análisis de la frecuencia de los estadios del ciclo del epitelio seminífero

La frecuencia con la que los estadios se presentan en determinadas secciones del testículo varía ligeramente entre las distintas cepas de rata albina. En la rata Wistar, uno de los únicos análisis se realizó utilizando el criterio de clasificación de Roosen-Runge y Giesel (1950). En dicho análisis se muestra que los estadios que presentan mayor frecuencia son el VI (28.1%), VIII (19.3%) y III (18.8%). Cabe destacar que el análisis no se realizó en zonas concretas del testículo, pues los autores mencionan que es difícil establecer o identificar las zonas del testículo con el procesamiento que llevaron a cabo (Hochereau &

Solari, 1963). Hess et al., realizaron un análisis de todos los criterios de clasificación de los estadios del ciclo del epitelio seminífero, y establecieron que el estadio VI del criterio de Roosen-Runge y Giesel, engloba a los estadios IV y V del criterio de Leblond y Clermont, el estadio VII corresponde al estadio VIII y el estadio III engloba a los estadios XII y XIII (Hess et al., 1990). Considerando esta comparativa entre los estadios de ambos criterios, encontramos que los estadios que se presentan con mayor frecuencia según Hochereau y Solari coinciden con los datos que obtuvimos en este estudio. De este modo, los estadios que se expresan con mayor frecuencia son: el V (16.04%), VIII (10%) y XIII (13.26%), en todos los ejemplares de todos los grupos (Figura 11).

Ahora bien, el ciclo del epitelio seminífero en ratas tiene una duración aproximada de 12.9 días y se requieren cuatro ciclos completos para que una espermatogonia de origen a un espermatozoide (Perey et al., 1960). Cuando se presentan cambios en las frecuencias de los estadios, debido a la administración de fármacos u otros tratamientos, estos deben tener una duración mínima de 13 días para encontrar efectos. De hecho a mayor tiempo de tratamiento, mayor será el efecto (Rosiepen et al., 1994, 1995). En nuestro estudio, no encontramos variaciones en las frecuencias de los estadios del ciclo del epitelio seminífero entre los grupos experimentales, lo cual se debe al tiempo de reperusión (24 h). Bajo este concepto, en futuros estudios convendría aumentar el tiempo de reperusión de los ejemplares y realizar un ensayo de la duración del ciclo del epitelio seminífero mediante marcadores ADN, como la Timidina-H3, que marca a los espermatoцитos que están por iniciar las divisiones meióticas y permite hacer un seguimiento de la duración del ciclo del epitelio seminífero, para posteriormente correlacionar este con cambios en las frecuencias de los estadios del ciclo del epitelio seminífero (Clermont & Harvey, 1965). Así mismo, estudios de la duración del ciclo del epitelio seminífero permitirían correlacionar dichos datos con la expresión de moléculas de adhesión celular, cuya expresión cambia en determinados estadios del ciclo del epitelio seminífero.

12.3 Análisis de la expresión de Cld11 y Cx43 mediante Western Blot

La expresión de Cld11 es regulada de manera negativa por citocinas como TNF- α (proinflamatoria) y TGF- β (antiinflamatoria), por lo cual, una tendencia a la baja en su expresión, como la observada en este estudio, podría estar relacionados a incrementos sistémicos de TNF- α y/o TGF- β (Lui & Cheng, 2007). Sin embargo, la expresión y localización de Cld11 también está regulada por andrógenos, de tal manera que cuando disminuyen los niveles sistémicos de andrógenos a, también se altera la expresión y la

localización de Cld11 (McCabe et al., 2016). Por esta razón, la tendencia a la baja en la expresión de Cld11 en nuestro modelo podría deberse también a la disminución sistémica de andrógenos, provocada por altos niveles de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 (Hong et al., 2004). Los bajos niveles de Cld11 en los túbulos seminíferos, se relacionan con aumentos en la permeabilidad de la BTB (Dadhich et al., 2013; Kato et al., 2020) y con pérdida de la organización estructural del epitelio seminífero (Gow et al., 1999), por cuál, los espacios que observamos entre las células de Sertoli en los grupos de I/R de 60 y 120 min por 24 h (Figura 10 G-H) pueden ser atribuibles a bajos niveles de Cld11.

En nuestro estudio observamos una tendencia de Cx43 a incrementar su expresión, sobre todo en el grupo de I/R 120 min/ 24 h, dicha tendencia puede ser consecuencia de un aumento local y/o sistémico de IL-1 α (Fiorini et al., 2006). Dicho aumento ocurre en modelos similares de I/R en mucosa gástrica (Magierowska et al., 2019). Sin embargo, para afirmar que dicha tendencia se debe a un incremento en IL-1 α , es necesario realizar las mediciones de la expresión de esta en suero, así como un análisis de la expresión de conexina-33 mediante Western Blot.

Por último, Cx43 está relacionada directamente con la regulación de la espermatogénesis, en su ausencia se observan alteraciones en el epitelio seminífero, tales como la presencia de gotas lipídicas en el citoplasma de las células de Sertoli, disminución del diámetro de los túbulos seminíferos y en general ausencia de espermatogénesis (Staggenborg et al., 2022). Por otro lado, cuando Cx43 se sobreexpresa en ejemplares a los cuales se les induce daño testicular inducido con adjudina (disrupción de BTB y muerte de células espermatogénicas), se observa un grado de recuperación importante de la estructura de los túbulos, así como reanudación del proceso espermatogénico, pues se presenta de nueva cuenta meiosis e incremento espermatogonias y restauración de la BTB (Li et al., 2016). El incremento en los niveles de Cx43 en testículo que observamos en nuestro modelo (Figura 12B), podría deberse entonces a un proceso de recuperación de daño generado en el testículo, como consecuencia de las alteraciones sistémicas generadas por nuestro modelo de I/R, como los cambios en los niveles de TNF- α en suero y en testículo.

12.4 Análisis de la expresión y localización de Cx43 mediante inmunohistoquímica

La Cx43 entre dos células de Sertoli adyacentes se aprecia en forma de líneas o puntos pequeños que se sitúan cerca de la lámina basal de los túbulos seminíferos, también puede formar columnas (Decrouy et al., 2004; Hollenbach et al., 2018). En la inmunotinción que

nosotros realizamos para Cx43, observamos ambos patrones de tinción (Figura 14 A-D) y en un análisis cualitativo, mediante barrido de las laminillas inmunoteñidas no observamos alteración en la localización de Cx43, la cual cabe destacar que se expresa no sólo en células de Sertoli, también se expresa en células de Leydig, células peritubulares mioideas y células germinales, es interesante destacar que nosotros observamos que las zonas más reactivas a la inmunotinción es el espacio intersticial, donde residen las células de Leydig (Figura 14 A-D) (Rode et al., 2021).

Finalmente, la cuantificación de la inmunotinción para Cx43 tiende a aumentar en los grupos de I/R, esto concuerda con los resultados obtenidos mediante Western blot, donde también se observa una tendencia al incremento en la expresión de Cx43 en el grupo de I/R de 120 min/ 24 h. Esto podría deberse a los altos niveles de citocinas proinflamatorias que incrementan la expresión de Cx43, como IL-1 α (Fiorini et al., 2006). Sin embargo, los bajos niveles de TNF- α en suero y en testículo (Figura 15 A-B) y el tiempo de reperfusión, nos lleva a pensar que podría tratarse de un proceso de recuperación en el tejido, pues incrementos en los niveles de Cx43 en el testículo se asocian con efectos positivos en el mantenimiento de la BTB y en la espermatogénesis (Li et al., 2016).

12.5 Análisis de los niveles sistémicos y testiculares de TNF- α

En nuestro modelo de I/R, donde el tiempo de reperfusión es de 24 h, observamos una tendencia a la disminución en los niveles de TNF- α en suero y en testículo a los 120 min de isquemia por 24 h de reperfusión, lo cual difiere con lo reportado por Magierowska et al., (2019), donde muestran que los niveles de TNF- α aumentan después del proceso de I/R, cabe destacar que el tiempo de reperfusión (3 h) es mucho menor al usado en nuestro modelo. En dicho tiempo podría presentarse la fase más aguda del SIRS, pues en un estudio donde se genera inflamación sistémica mediante la administración de DAMPs de origen mitocondrial, se observa que el daño periférico a otros órganos (pulmón), se presenta 3 h después de la administración de estos, en dicho estudio también se miden los niveles de TNF- α e IL-6 en tejido y se muestra que el pico de dichas citocinas se presenta a las 3 h de la administración, posteriormente los niveles comienzan a disminuir hasta alcanzar valores basales a las 24 h (Zhang et al., 2010). Esto coincide con lo observado en nuestro estudio, donde a las 24 horas de reperfusión observamos una caída en los niveles de TNF- α , incluso por debajo de los niveles basales en testículo y en suero. De hecho en un modelo de I/R en hígado, se observa que los niveles de TNF- α disminuyen en suero a las 24 h de reperfusión, lo cual apoya la idea de que disminución en los niveles de TNF- α en nuestro

modelo se debe al tiempo de reperfusión y que los cambios morfométricos observados en los túbulos seminíferos se deben a un proceso de recuperación (He et al., 2009).

En un modelo de I/R en intestino delgado la expresión de TNF- α tiende a bajar incluso por debajo de los niveles basal a las 24 h de reperfusión. En un tiempo de isquemia por 1 h, 24 h y 30 días de reperfusión el mayor pico en la expresión de este se observa en 1 h de reperfusión, posteriormente la menor expresión se observa a las 24 h y a los 30 días se observa que los niveles de expresión de TNF- α regresan a su estado basal (Gregová et al., 2015). Como sugieren nuestros resultados y otros estudios mencionados en este apartado, los niveles de TNF- α nivel local, sistémico y en órganos periféricos, son totalmente dependientes del tiempo de reperfusión y están relacionados al SIRS, con una tendencia a presentar sus mayores picos a las pocas horas de reperfusión (1-3 h), y comenzando a disminuir a partir de las 6, hasta alcanzar niveles basales a las 24 h (Figura 16). Esto indica que conforme el tiempo de reperfusión sea más largo, los ejemplares comienzan a recuperarse del daño inicial; sin embargo, pareciera que dependiendo la gravedad del daño los niveles de TNF- α regresan a su estado basal, pues en estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo se encontró que el daño que se presenta en la mucosa gástrica a los 60 min de isquemia, por 24 h es reversible, en comparación con el daño que se presenta a los 90 y 120 min de isquemia por 24 h de reperfusión (Peña-Mercado et al., 2022). Los resultados de este estudio, sugieren que el daño que se presenta en la mucosa, a nivel sistémico y en órganos reproductivos a los 60 min de isquemia es reversible, pues los parámetros morfométricos del testículo y los niveles de TNF- α en suero y testículo, se observan iguales a las condiciones control, en comparación con los que se observan a los 120 min de isquemia (Figs 10, 12 B y 14), esto podría indicar que el daño no se está presentando o, en caso de que se presente, que este es menor y por lo tanto tarda menos tiempo en ser reparado.

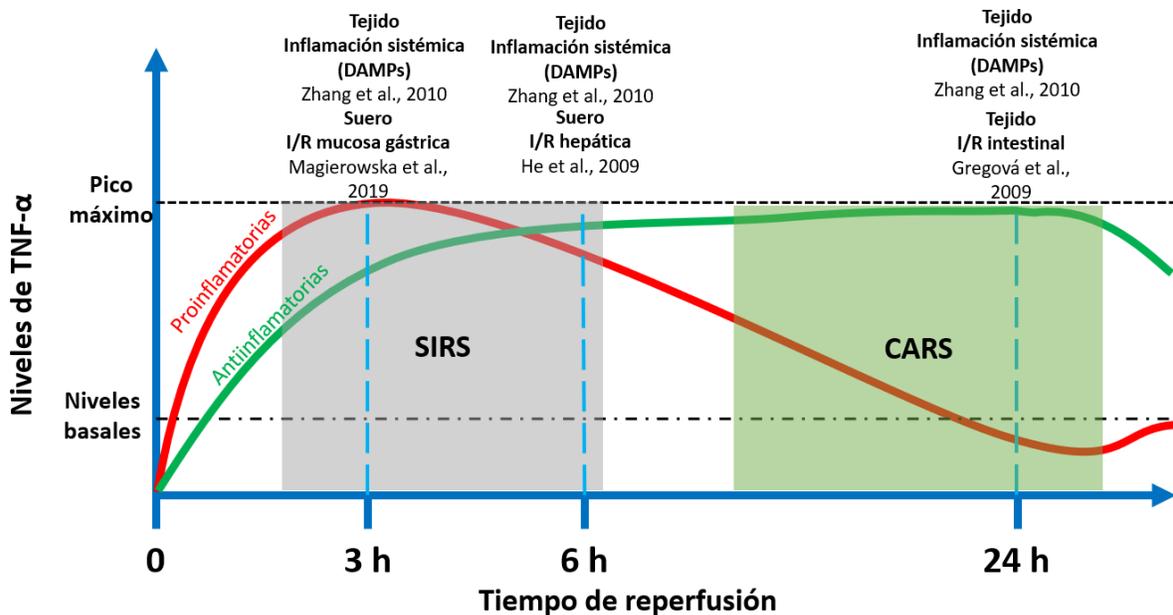


Figura 16. Estimación del cambio en los niveles de TNF- α durante el SIRS y el CARS en un periodo de 24 h, en diferentes tejidos.

Es interesante observar que la tendencia en los niveles de TNF- α a disminuir se observa tanto en testículo como en suero, esto confirma que las afectaciones sistémicas generadas por nuestro modelo de I/R en mucosa gástrica, están generando afectaciones en órganos reproductivos. Por otro lado, la caída en los niveles de TNF- α nos lleva a pensar que a las 24 h de reperfusión, se está presentando el CARS (Figura 16) (Gentile et al., 2012), que se caracteriza por un incremento sistémico de citocinas antiinflamatorias como IL-10 e IL-1 y una disminución gradual de los niveles de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 α e IL-6), esto debido a que los leucocitos adquieren una mayor capacidad de producción de estas (van der Poll et al., 2021). Por lo tanto, la tendencia de TNF- α a disminuir tanto en testículo como en suero, podría atribuirse a un proceso de recuperación, debido al CARS, y este podría atribuirse al tiempo de reperfusión que es bastante mayor al tiempo de isquemia. Por ello, los ejemplares empezarían a recuperarse de las alteraciones sistémicas. Sin embargo, para confirmar esto es necesario medir los niveles de citocinas antiinflamatorias como IL-10, la cual se ha demostrado que regula la respuesta inflamatoria sistémica producida por I/R intestinal, ya que cuando la actividad de esta disminuye por la administración de anticuerpos antiIL-10 incrementan los niveles de citocinas proinflamatorias como TNF- α (Souza & Teixeira, 2005).

13. CONCLUSIONES

El modelo de I/R de mucosa gástrica genera cambios a nivel morfológico en los túbulos seminíferos, los cuales son similares a los observados en otros modelos de inflamación sistémica.

La frecuencia con la que se presentan cada uno de los estadios del ciclo del epitelio seminífero no se ve afectada en el modelo.

Los niveles de expresión de Cld11 y Cx43 tienen a cambiar en el modelo, probablemente debido a un desbalance en los niveles de citocinas en suero y en testículo.

La localización de Cx43 en los túbulos seminíferos no se ve modificada en el modelo.

Los niveles de TNF- α tienden a cambiar en suero y en testículo a los 120 min de isquemia por 24 h de reperfusión, sin embargo, parece que el cambio en los niveles de este se debe al desarrollo de CARS y los cambios que se ven en otros parámetros podrían estar relacionados a un proceso de recuperación.

Las conclusiones y su relación con los aspectos detallados en la discusión se resumen en la Figura 17.

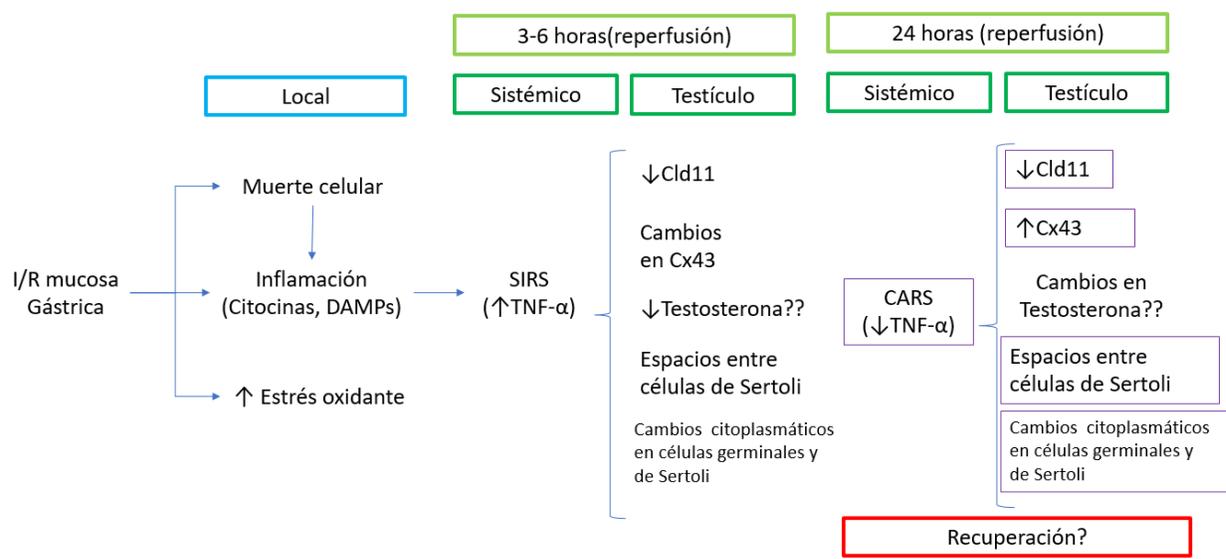


Figura 17. Diagrama integrativo de discusión y conclusiones. Los recuadros morados muestran los resultados de los experimentos realizados en este trabajo. Los cambios en testículo en 3-6 h de reperfusión se presentan como especulaciones.

13.1 Perspectivas

Medir los niveles de citocinas pro y antiinflamatorias a la par en suero y en testículo, para confirmar que se está presentando el CRS o el CARS.

Medir otros marcadores de inflamación sistémica como HMGB1 y C5a en suero, ya que estos están relacionados con el inicio de SIRS.

14. ANEXOS:

14.1 REACTIVOS Y SOLUCIONES

14.1.1 Técnica histológica

14.1.1.1 Fijador Bouin-Dubosq

Los reactivos se agregaron y mezclaron en el siguiente orden:

| Reactivo | Cantidad/ 100 mL |
|--------------------------------|------------------|
| Alcohol etílico 80° Gay-Lussac | 75.0 mL |
| Ácido pícrico | 0.5 g |
| Formalina concentrada (40 %) | 30.0 ml |
| Ácido acético glacial | 7.5 ml |

14.1.1.2 Solución amortiguadora de fosfatos

| Reactivo | Cantidad/ 1000 mL |
|-----------------------------------|-------------------|
| Fosfato de sodio dibásico anhidro | 5.6869 g |
| Fosfato de sodio monobásico | 1.1461 g |
| Agua destilada | 1000 mL |

- 1) Los reactivos se disolvieron por separado usando calor.
- 2) Se mezclaron las soluciones en una probeta y se aforó a 1000 mL con agua destilada.

14.1.1.3 Fijador paraformaldehído 4%

| Reactivo | Cantidad/ 100 mL |
|------------------------------------|------------------|
| Paraformaldehído | 4 g |
| Solución amortiguadora de fosfatos | 100 mL |

- 1) Se colocó la solución amortiguadora en un matraz Erlen-Meyer y se puso en baño maría a 60°C.
- 2) Se agregó el paraformaldehído poco a poco y en agitación constante hasta que este se disolvió.
- 3) Si la solución estaba turbia se filtró.

14.1.1.4 Alcoholes

Los alcoholes se prepararon a partir de alcohol 96° Gay-Lussac a la concentración requerida usando la siguiente fórmula:

$$a) C_1 V_1 = C_2 V_2 \qquad b) V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

C_1 = concentración inicial de alcohol (96°)

V_1 = volumen de C_1 necesario para obtener C_2

C_2 = concentración final (requerida)

V_2 = volumen final de la solución (C_2)

El resultado de V_1 en la fórmula b indica la cantidad necesaria de alcohol 96° Gay-Lussac necesaria para obtener un volumen final de C_2 , por lo cuál V_1 se aforó aforó con agua destilada al volumen de C_2 .

14.1.1.5 Alcohol-Xileno

Se agregaron alcohol absoluto y xileno en proporción 1:1.

14.1.2 Tinciones H&E y PAS

14.1.2.1 Eosina Azulosa

| Reactivo | Cantidad/ 100 mL |
|------------------------|------------------|
| Eosina azulosa | 1 g |
| Orange G | 1 g |
| Alcohol 70° Gay-Lussac | 100 mL |

1. Se disolvió poco a poco la eosina el alcohol 70° Gay-Lussac
2. Se agregó poco a poco el Orange G hasta que se disolvió

14.1.2.2 Hematoxilina de Gil

Hematoxilina en solución modificada según Gil III para microscopía (Merk®, cat: HX99385674)

14.1.2.3 Kit de tinción PAS

Tinción de P. A. S., HYCEL ®, cat: 64295

14.1.3 Western Blot

14.1.3.1 Buffer muestra 2X

| Reactivo | Cantidad |
|------------------------------|----------|
| 0.5M Tris-HCl pH 8.8 | 1.25 mL |
| Glicerol | 3.0 mL |
| SDS 10% | 2.0 mL |
| 0.5 Azul de bromofenol | 0.190 mL |
| H ₂ O desionizada | 3.0 mL |

14.1.3.2 Buffer RIPA

| Reactivo | Cantidad/ 300mL |
|---------------------------------|-----------------|
| NaCl | 2.6298 g |
| Tris-HCl pH 7.5 | 2.3634 g |
| EDTA | 0.5583 g |
| Triton X100 (0.1%) | 3 mL |
| Cocktail inhibidor de proteasas | 1% |
| H ₂ O desionizada | Aforar a 300 mL |

14.1.3.3. Tris-HCl

| Reactivo | Cantidad/ 100 mL | |
|------------------------------|------------------|-----------------|
| | 0.5 M | 1.5 M |
| Tris base | 6 g | 18.15 g |
| H ₂ O desionizada | Aforar a 100 mL | Aforar a 100 mL |

Antes de aforar se ajustó el pH al requerido con 12N HCl

14.1.3.4 SDS (Duodecilsulfato sódico) 10%

| Reactivo | Cantidad |
|------------------------------|----------|
| SDS | 10 g |
| H ₂ O desionizada | 90 ml |

14.1.3.5 APS (Persulfato de amonio) 10%

| Reactivo | Cantidad |
|------------------------------|----------|
| APS | 100 mg |
| H ₂ O desionizada | 1 mL |

14.1.3.6 Buffer de corrida 5X

| Reactivo | Cantidad/ 1000 mL |
|------------------------------|-------------------|
| Glicina | 72 g |
| Tris Base | 15.15 g |
| SDS | 5 g |
| H ₂ O desionizada | 1000 mL (aforar) |

Para utilizar el buffer se preparó a concentración 1X, agregando 200 mL de Buffer de corrida 5X y 800 mL de agua desionizada para obtener 1000 mL de Buffer de corrida 1X.

14.1.3.7 Buffer de transferencia 5X

| Reactivo | Cantidad/ 1000 mL |
|------------------------------|-------------------|
| Glicina | 72 g |
| Tris base | 15.15 g |
| SDS | 0.5 g |
| H ₂ O desionizada | 1000 mL (aforar) |

Para utilizar el buffer se preparó a concentración 1X de la siguiente manera

| Reactivo | Cantidad/ 1000 mL |
|------------------------------|-------------------|
| Buffer de transferencia 5X | 200 mL |
| Metanol | 200 mL |
| H ₂ O desionizada | 600 mL |

14.1.3.8 PBS 5X

| Reactivo | Cantidad/ 1000 mL |
|----------|-------------------|
| NaCl | 40.03 g |
| KCl | 1.01 g |

| | |
|----------------------------------|------------------|
| Na ₂ HPO ₄ | 7.2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1.2 g |
| H ₂ O desionizada | Aforar a 1000 mL |

Para utilizar el buffer se preparó a concentración 1X de la siguiente manera

| Reactivo | Cantidad/ 1000mL |
|------------------------------|------------------|
| PBS 5X | 200 mL |
| H ₂ O desionizada | 800 mL |

14.1.3.9 PBS – Tween 20 0.1%

| Reactivo | Cantidad |
|----------|----------|
| Tween-20 | 100 µL |
| PBS 1X | 100 mL |

14.1.3.10 Gel concentrador 5%

| Reactivo | Cantidad |
|------------------------------|----------|
| H ₂ O desionizada | 2.85 mL |
| 30% acrilamida/ Bis | 850 µL |
| 1.5 M Tris-HCl pH 6.8 | 1.25 mL |
| SDS 10% | 50 µL |
| APS 10% | 25 µL |
| TEMED | 5 µL |

14.1.3.11 Gel resolvidor 10%

| Reactivo | Cantidad |
|------------------------------|----------|
| H ₂ O desionizada | 8.16 mL |
| 30% acrilamida/ Bis | 6.64 mL |
| 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 | 5 mL |
| SDS 10% | 200 µL |
| APS 10% | 100 µL |

| | |
|-------|--------|
| TEMED | 120 µL |
|-------|--------|

14.1.3.12 Solución de bloqueo 10%

| Reactivo | Cantidad |
|------------------|----------|
| Leche descremada | 2.5 g |
| PBS-Tween | 25 mL |

14.1.3.13 Solución de lavado 1%

| Reactivo | Cantidad |
|------------------|----------|
| Leche descremada | 1 g |
| PBS-Tween | 100 mL |

14.1.3.14 Complejo AB

| Reactivo | Cantidad |
|------------|----------|
| Complejo A | 25 µL |
| Complejo B | 25 µL |
| PBS 1X | 10 mL |

14.1.3.15 Solución de revelado

| Reactivo | Cantidad |
|------------------------------|----------|
| Solución de peróxido | 500 µL |
| Solución de luminol | 500 µL |
| H ₂ O desionizada | 10 L |

14.1.4 Inmunohistoquímica

14.1.4.1 Citrato de sodio [1:20]

| Reactivo | Cantidad/ 100 mL |
|------------------|------------------|
| Citrato de sodio | 5 mL |
| Agua destilada | 95 mL |

Ajustar pH a 6.0

14.1.4.2 PBS – Tween 20 0.1%

| Reactivo | Cantidad/ 500 mL |
|----------|------------------|
| Tween-20 | 500 µL |
| PBS 1X | 500 mL |

14.1.4.3 Albúmina 4%

| Reactivo | Cantidad/ 100 mL |
|----------------------|------------------|
| Albúmina (cristales) | 4 g |
| Agua destilada/ PBS | Aforar a 100 mL |

Mantener en agitación hasta que los cristales de albúmina de disuelvan

14.1.4.4 PBS

Misma preparación que el usado para Western blot (anexo 1.3)

14.1.4.5 Peróxido de hidrógeno 4%

| Reactivo | Cantidad/ 100 mL |
|-----------------------|------------------------|
| Peróxido de hidrógeno | 4 mL |
| Metanol | 96 L o aforar a 100 mL |

14.1.5 ELISA

Se utilizaron los reactivos proporcionados y especificados por el fabricante (Abcam, cat: ab100785). Todos los reactivos se diluyeron a una concentración 1X usando agua destilada. Los reactivos usados fueron los siguientes:

- Buffer de Lisis (homogenización del tejido)
- Buffer diluyente de muestra (Dilución de las muestras y preparación de standard)
- Diluyente de ensayo (Dilución y preparación de anticuerpos)
- Solución de lavado (lavados)

14.2 PROCESAMIENTO

14.2.1 Técnica histológica

14.2.1.1 Lavado de muestras fijadas con Bouin-Dubosq

Alcohol 70° lavados de 20 min c/u
Los lavados se realizaron hasta que el alcohol dejó de pintarse de amarillo

14.2.1.2 Lavado de muestras fijadas con paraformaldehído

Solución amortiguadora de fosfatoslavados de 20 min c/u
Los lavados se realizaron hasta que las muestras dejaron de oler a paraformaldehído e inmediatamente se inició el proceso de deshidratación.

14.2.1.3 Deshidratación de muestras fijadas con Bouin-Dubosq

Alcohol 80° I..... 30 min
Alcohol 80° II..... 30 min
Alcohol 96° I.....30 min
Alcohol 96° II.....30 min
Alcohol 96° III.....30 min
Alcohol 100° I..... 30 min
Alcohol 100° II..... 30 min
Alcohol 100° III..... 30 min

Deshidratación de muestras fijadas con paraformadehído

Alcohol 40° 30 min
Alcohol 50° 30 min
Alcohol 60° 30 min
Alcohol 70°toda la noche
Alcohol 80° II..... 30 min
Alcohol 96° I.....30 min

| | |
|-----------------------|--------|
| Alcohol 96° II..... | 30 min |
| Alcohol 96° III..... | 30 min |
| Alcohol 100° I..... | 30 min |
| Alcohol 100° II..... | 30 min |
| Alcohol 100° III..... | 30 min |

14.2.1.4 Aclaración (para muestras fijadas con ambos fijadores)

| | |
|----------------------|--------|
| Alcohol-Xileno | 30 min |
| Xileno I..... | 20 min |
| Xileno II..... | 20 min |

14.2.1.5 Inclusión (para muestras fijadas con ambos fijadores)

| | |
|-------------------------|-----|
| Paraplast-plus I..... | 1 h |
| Paraplast-plus II..... | 1 h |
| Paraplast-plus III..... | 1 h |

Se realizó cuidando que todo el tiempo el paraplast-plus y el tejido permanecieran a una temperatura de 60°C utilizando escuadras de Leukart.

14.2.1.6 Cortes y premontaje

Se utilizaron portaobjetos esmerilados (25x75mm). Se empezó a premontar en el momento que el tejido empezó a salir completo. Y se obtuvieron 10 laminillas con 3-5 cortes de 5 µm cada una.

El premontaje de las muestras fijadas con Bouin-Dubosq se realizó en portaobjetos esmerilados con gelatina bacteriológica al 1.5% en agua destilada a 45°C en un baño de flotación Leica.

El premontaje de las muestras fijadas con paraformaldehído se realizó en portaobjetos electrocargados con agua destilada a 45°C en un baño de flotación Leica.

14.2.2 Tinción H&E

| | |
|----------------|------------|
| Xileno I | 10 minutos |
|----------------|------------|

| | |
|-------------------------|-------------|
| Xileno II | 5 minutos |
| Xileno-Alcohol | 3 minutos |
| Alcohol 100° | 5 minutos |
| Alcohol 96° | 5 minutos |
| Alcohol 70° | 2 minutos |
| Alcohol 50° | 2 minutos |
| Agua destilada | 2 minutos |
| Hematoxilina | 35 segundos |
| Agua corriente | 2 minutos |
| Agua destilada | 2 minutos |
| Carbonato de Litio..... | 5 minutos |
| Agua destilada | 2 minutos |
| Alcohol 50° | 2 minutos |
| Alcohol 70° | 2 minutos |
| Eosina | 30 segundos |
| Alcohol 96° I..... | 2 lavados |
| Alcohol 96° II..... | 2 lavados |
| Alcohol 96° III..... | 2.5 minutos |
| Xileno-Alcohol | 2 minutos |
| Xileno I | 2 minutos |
| Xileno II | 5 minutos |

El montaje se realizó colocando gotas de resina Entellan en las laminillas teñidas y colocando un cubreobjetos sobre el tejido, cuidando que no quedaran burbujas.

14.2.3 Tinción PAS

| | |
|-------------------------|----------------------|
| Xileno I | 10 minutos |
| Xileno II | 5 minutos |
| Xileno-Alcohol | 3 minutos |
| Alcohol 100° | 5 minutos |
| Alcohol 96° | 5 minutos |
| Alcohol 70° | 2 minutos |
| Alcohol 50° | 2 minutos |
| Agua destilada | 2 minutos |
| Ácido peryódico..... | 5 minutos |
| Agua destilada | 2 minutos/ 2 cambios |
| Reactivo de Schiff..... | 15 minutos |
| Agua corriente | 5 minutos |
| Agua destilada | 2 minutos |
| Hematoxilina | 1 minuto |
| Agua corriente | 2 minutos |
| Agua destilada | 2 minutos |
| Alcohol 50° | 2 minutos |
| Alcohol 70° | 2 minutos |
| Alcohol 96° | 2 lavados |
| Alcohol 100° | 5 minutos |
| Xileno-Alcohol | 2 minutos |
| Xileno I | 2 minutos |
| Xileno II | 5 minutos |

El montaje se realizó colocando gotas de resina Entellan en las laminillas teñidas y colocando un cubreobjetos sobre el tejido, cuidando que no quedaran burbujas.

14.2.4 Inmunohistoquímica

| | |
|--|------------|
| Desparafinado en estufa (60°C) | 30 minutos |
| Xileno I | 5 minutos |
| Xileno II | 5 minutos |
| Xileno III | 5 minutos |
| Xileno-Alcohol | 3 minutos |
| Alcohol 100° I | 5 minutos |
| Alcohol 100° II | 5 minutos |
| Alcohol 96° I | 5 minutos |
| Alcohol 96° II | 5 minutos |
| Alcohol 70° | 5 minutos |
| Agua destilada | 5 minutos |
| Recuperación de antígenos (Citrato de sodio al 4% a 96-99°C) | 20 minutos |
| PBS-Tween 20 I | 5 minutos |
| PBS-Tween 20 II | 5 minutos |
| PBS-Tween 20 III | 5 minutos |
| Bloqueo de peroxidasa endógena (peróxido de hidrógeno 4%) | 30 minutos |
| PBS-Tween 20 I | 5 minutos |
| PBS-Tween 20 II | 5 minutos |
| PBS-Tween 20 III | 5 minutos |
| Bloqueo de uniones inespecíficas (albúmina) | 60 minutos |
| PBS-Tween 20 I | 5 minutos |

| | |
|--|---------------|
| PBS-Tween 20 II | 5 minutos |
| PBS-Tween 20 III | 5 minutos |
| Incubación con anticuerpo primario (cámara húmeda a 4°C) | toda la noche |
| PBS-Tween 20 I | 5 minutos |
| PBS-Tween 20 II | 5 minutos |
| PBS-Tween 20 III | 5 minutos |
| Incubación con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (cámara húmeda a temperatura ambiente) | 120 minutos |
| PBS-Tween 20 I | 5 minutos |
| PBS-Tween 20 II | 5 minutos |
| PBS-Tween 20 III | 5 minutos |
| Revelado (diaminobencidina) | 2.5 minutos |
| Agua destilada I | 5 minutos |
| Agua destilada II | 5 minutos |
| Contratinción con hematoxilina | 4 minutos |
| Agua corriente I | 3 minutos |
| Agua corriente II | 3 minutos |
| Alcohol 70° | 3 minutos |
| Alcohol 96° | 3 minutos |
| Alcohol 100° | 3 minutos |
| Xileno-Alcohol | 2 minutos |
| Xileno | 5 minutos |

El montaje se realizó colocando gotas de resina Entellan en las laminillas teñidas y colocando un cubreobjetos sobre el tejido, cuidando que no quedaran burbujas.

14.2.5 Western Blot

14.2.5.1 Homogenizado del tejido

1. Las muestras se homogenizaron y se les añadieron 50 μ L de buffer RIPA con inhibidor de proteasas y se dejaron incubar por 30 min a 4°C.
2. Se añadieron 200 μ L de buffer RIPA y se homogenizó.
3. Las muestras se centrifugaron a 13500 rpm por 10 min a 4°C.
4. El sobrenadante fue retirado y dividido en alícuotas de 50-150 μ l.
5. La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo de Bradford.

14.2.5.2 Curva patrón de albúmina

La curva se realizó placas para ensayo ELISA de 96 pozos, las cuales fueron leídas en un lector de placas H Reader 1, HLab®.

1. Se agregaron 200 μ L de albúmina en solución (2 mg/ ml) en el primer pozo de la fila de pozos de la placa ELISA.
2. Se agregaron 100 μ L de PBS 1X en los pozos siguientes de la misma fila de la placa ELISA.
3. Diluciones seriadas: del primer pozo se tomaron 100 μ L de albúmina y se colocaron en el pozo siguiente de la misma fila y se homogenizó. De ese mismo pozo se tomaron 100 μ L y se colocaron en el pozo siguiente de la misma fila y se homogenizó. Este mismo proceso se realizó hasta cubrir todos los pozos de la fila y del último pozo se desecharon 100 μ L, con el fin de tener la misma cantidad de dilución en todos los pozos.
4. En una fila todos los pozos de una fila se agregaron 150 μ L de reactivo de Bradford.
5. A cada pozo con reactivo de Bradford se le agregaron 5 μ L de dilución de albúmina (un pozo por cada dilución) y se homogenizó.
6. Se leyó la absorbancia en el lector de placas ELISA.

Las diluciones se realizaron por duplicado.

14.2.5.3 Ensayo de Bradford

El ensayo se realizó placas para ensayo ELISA de 96 pozos, las cuales fueron leídas en un lector de placas H Reader 1, HLab ®.

1. Se colocaron 5 µL de sobrenadante de cada muestra en pozos separados.
2. Se añadieron 150 µL de reactivo de Bradford (se vuelve azul al contacto con las proteínas) y se homogenizó.
3. Se realizó la lectura de la placa.
4. Se calculó la cantidad de proteína mediante la siguiente tabla

| #Muestra | Abs 1 | Abs 2 | \bar{X}_{abs} | \bar{X}_{abs}/m | F _{dilución} | 30 µg/ F _{dilución} |
|----------|-------|-------|-----------------|-------------------|-----------------------|------------------------------|
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| . | | | | | | |
| . | | | | | | |
| . | | | | | | |
| n | | | | | | |

Abs= absorbancia

\bar{X}_{abs} = promedio de absorbancias

m = pendiente de la recta (obtenida de curva patrón de albúmina)

F_{dilución} = Factor de dilución= (\bar{X}_{abs})(10)

El ensayo se realizó por duplicado.

14.2.5.4 Corrida

1. Preparado de geles: prepararon geles de 1.5 mm
2. Preparado de la cámara: se colocaron los geles dentro de la cámara de electroforesis y se llenó con buffer de corrida.
3. Preparación de proteína: se mezclaron 5 µl de Buffer muestra y 5 µl de proteína, la mezcla se incubó en agua caliente durante 5 min.
4. Cargado de pozos: se cargaron 4 µl de marcador de peso molecular y 10 µl de cada mezcla de proteína y buffer muestra en cada pozo.
5. Corrida: se realizó una primera corrida a 60 V durante 30 min para concentrar la proteína y luego una segunda corrida a 100 V durante 60 min para resolver la proteína.

6. Se retiraron los geles y se colocaron en buffer de transferencia.

14.2.5.5 Transferencia

7. Activado de membrana: se activó la membrana de PVDF, previamente recortada, incubándola 3 min en metanol.
8. Preparado de cassettes: el gel y la membrana se colocaron en cassettes de transferencia, cuidando que estos estén siempre en contacto y que no se formaran burbujas entre ellos.
9. Transferencia: se colocaron los cassettes en la cámara de transferencia, se llenó con buffer de transferencia y se transfirió a 70 V durante 90 min.
10. Se retiró la membrana del cassette y se enjuagó con agua desionizada y metanol. Se dejó secar la membrana y se almacenó a 4°C hasta su incubación.

14.2.5.6 Incubación

1. Preparado de membrana: se enjuagó la membrana con agua destilada y luego con metanol durante 5 min en cada paso.
2. Bloqueo de membrana: se incubó la membrana con solución de bloqueo al 10% durante 30 min.
3. Incubación con anticuerpo primario: se agregó el anticuerpo primario correspondiente previamente diluidos en PBS-Tween y se incubó toda la noche a 4°C.
4. Se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados con solución de lavado 1% de 10 min c/u.
5. Incubación con anticuerpo secundario: se agregó el anticuerpo secundario correspondiente previamente diluido en PBS-Tween y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
6. Se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados con solución de lavado 1% de 10 min c/u.
7. Se realizaron dos lavados más con PBS 1X durante 5 min c/u.
8. Incubación con complejo AB: se incubó la membrana con complejo AB durante 30 min.
9. Se retiró el complejo AB y se realizaron 3 lavados con con solución de lavado 1% de 10 min c/u.

10. Se realizó un lavado más con PBS 1X durante 10 min.

14.2.5.7 Revelado

11. Se incubó la membrana en solución de revelado durante 30 segundos y se colocó en el escáner, evitando que se formaran burbujas entre la membrana y el escáner.

Después de la transferencia se manipuló la membrana cuidando que la cara que estuvo en contacto con el gel estuviera siempre hacia arriba, excepto al momento de revelar, ya que dicha cara se colocó en contacto con el escáner.

14.2.6 Análisis histológico del testículo

14.2.6.1 Zonas analizadas en cortes

Para ambos análisis, score de Johnsen y frecuencia de los estadios del ciclo del epitelio seminífero, se analizaron un total de 60 túbulos seminíferos que cumplieran con el criterio de circularidad (investigar). Se realizó un barrido en cada zona: para la zona ventral el barrido se realizó del extremo craneal al extremo caudal, para la zona caudal el barrido se realizó del extremo ventral al extremo dorsal y el barrido en la zona dorsal se realizó del extremo caudal al extremo craneal. El barrido se detuvo cuando la cantidad de túbulos seminíferos analizados llegaba a 60, por lo cuál no en todos los cortes se analizaron las tres zonas.

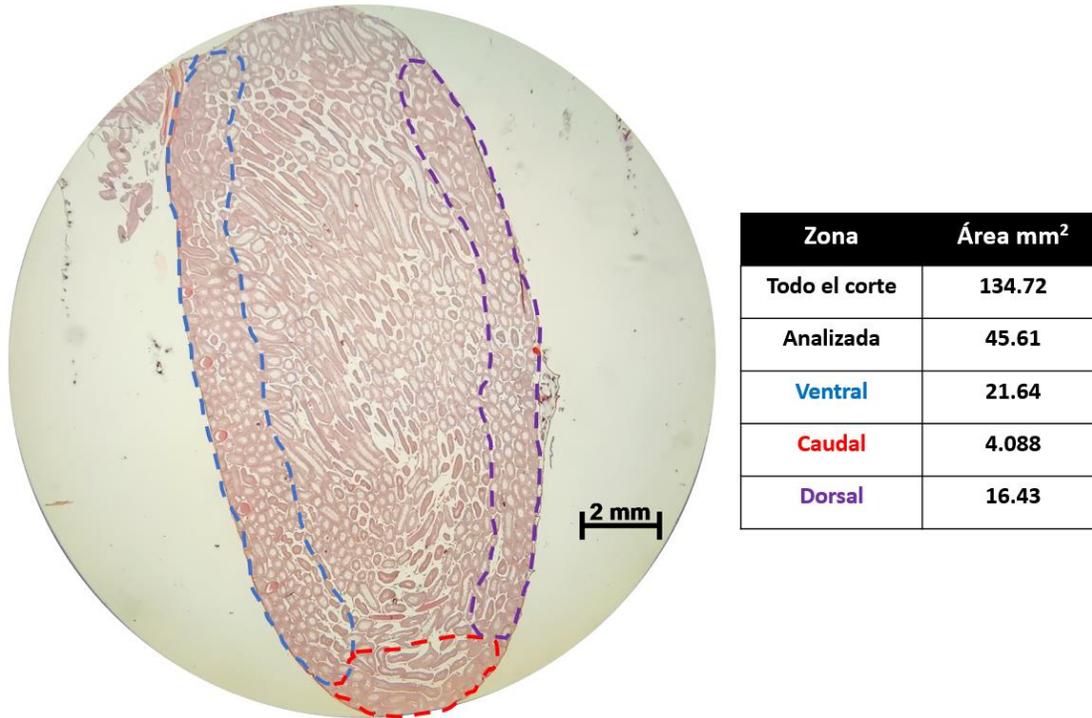


Figura 18. Diagrama de zonas analizadas en cortes sagitales de testículo. En la tabla se muestra el área total analizada por cada zona en el corte.

14.2.6.2 Cálculo del índice de circularidad y medición de parámetros morfométricos

El índice de circularidad fue calculado con la finalidad de analizar túbulos con una forma circular, ya que la identificación de estadios del ciclo del epitelio seminífero y la medición de los parámetros morfométricos es más sencillo en estos. El cálculo del índice se realizó dividiendo el diámetro menor ($\Phi 1$) entre el diámetro mayor ($\Phi 2$). Se consideraron para análisis aquellos túbulos cuyo índice fuera mayor o igual que 0.70.

En cuanto a los parámetros morfométricos medidos, se tomó como diámetro del túbulo el diámetro menor, el grosor del epitelio se midió tomando la distancia entre la lámina basal y el lumen y el área del epitelio se calculó restando el área de la luz del túbulo al área total del túbulo.

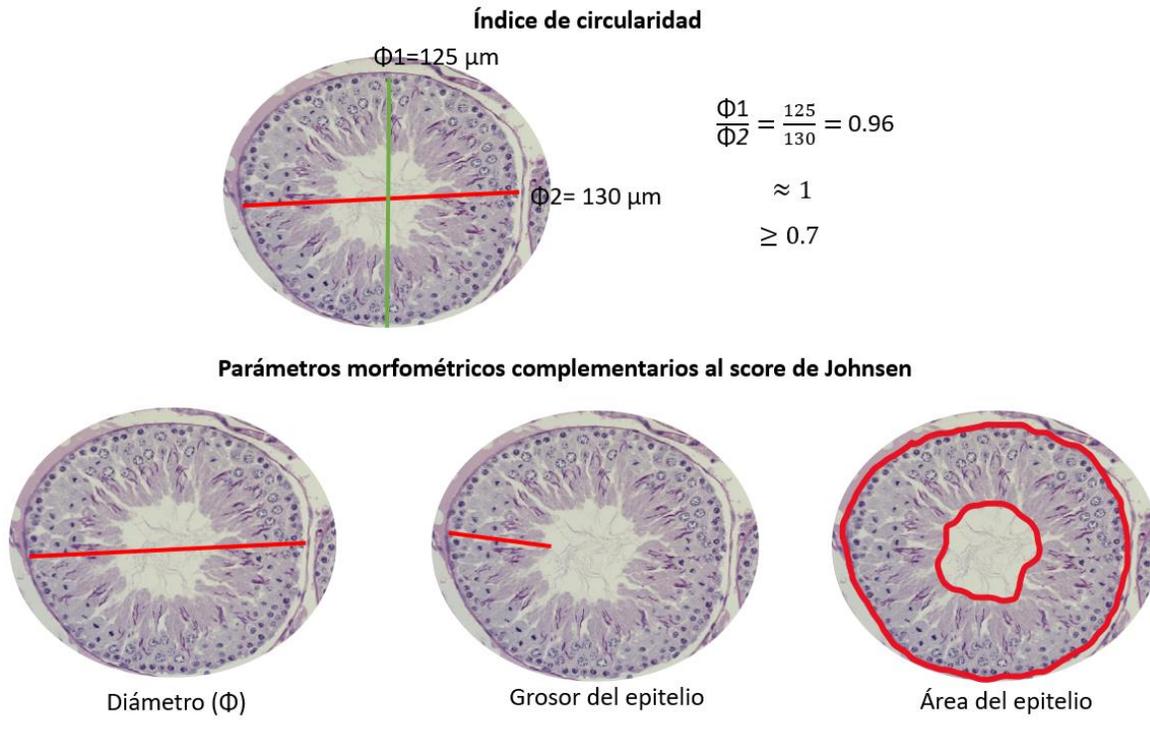


Figura 19. Diagramas de cálculo del índice de circularidad y mediciones de: diámetro, grosor del epitelio y área del epitelio (imagen tomada de Maynard & Downes, 2019).

14.2.6.3 Atlas de estadios del ciclo del epitelio seminífero en rata

El atlas fue elaborado usando el criterio de Leblond y Clermont (1952) para la categorización de los 14 estadios del ciclo del epitelio seminífero en rata, mediante los arreglos celulares presentes en cada uno de estos.

Descripción de arreglos celulares en cada estadio (Leblond & Clermont, 1952):

- I. En el compartimiento basal se observan células de Sertoli aplanadas contra la lámina basal, asociadas a espermatogonias tipo A, que pueden estar en mitosis. En la zona media del epitelio, hay espermátocitos en paquiteno y en el compartimiento luminal espermátidas en fase 1 y espermatozoides inmaduros en fase 15 (en esta fase las espermátidas se denominan espermatozoides inmaduros).
- II. Espermatogonias tipo A, intermedias y/o tipo B en el compartimiento basal, pocos espermátocitos y espermátidas en fase 2 en la porción media del epitelio, separadas por agregados de espermatozoides inmaduros en fase 16.

- III. En el compartimento basal se observan pocas espermatogonias tipo A e intermedias. Espermatocitos en crecimiento y espermatidas en fase 3 intercaladas con agregados de espermatozoides inmaduros en fase 16.
- IV. Se observan espermatogonias tipo A en mitosis en el compartimento basal, en el compartimento medio se observan espermatocitos en crecimiento, espermatidas en fase 4 con el acrosoma elongado y espermatozoides inmaduros en fase 17 en el compartimento medio y luminal.
- V. Espermatogonias tipo B y pocas espermatogonias tipo A, se observan en el compartimento basal. En el compartimento medio espermatocitos grandes y espermatidas en fase 5, separadas por agregados de espermatozoides maduros en fase 17, que están presentes también en el compartimento luminal.
- VI. En el compartimento luminal se observan células de Sertoli con núcleos triangulares, así como espermatogonias tipo A y B. En el compartimento medio pueden observarse espermatocitos en paquiteno y espermatidas en fase 6, cuyo acrosoma en desarrollo adquiere forma de sombrilla. Espermatozoides inmaduros en fase 18 pueden observarse en diferentes compartimientos del epitelio.
- VII. En el compartimento basal pueden observarse espermatogonias tipo B y espermatocitos “jóvenes” con núcleo pequeño. En el compartimento medio se observan espermatocitos en paquiteno y espermatidas en fase 7. Los espermatozoides inmaduros pierden se disgregan y se observan en el compartimento luminal.
- VIII. Se observan pocas espermatogonias tipo A intercaladas con espermatocitos jóvenes y células de Sertoli con núcleo triangular en el compartimento basal. En el compartimento medio, cerca al compartimento luminal se observan espermatocitos en paquiteno con núcleos grandes. Espermatozoides inmaduros pueden ser observados en el compartimento luminal, así como cuerpos residuales (hiperteñidos con eosina).
- IX. En el compartimento basal pueden observarse espermatogonias tipo A. En el compartimento medio, cerca al compartimento basal pueden observarse espermatocitos en leptoteno, y cerca al compartimento luminal algunos espermatocitos en paquiteno. En el compartimento luminal pueden observarse espermatidas en fase 9, cuyo núcleo comienza a alargarse y forman una capa bien definida. Aun pueden observarse algunos cuerpos residuales.

- X. Se observan espermatogonias tipo A a través de toda la membrana basal, en el compartimiento medio se observan espermatocitos en leptoteno. En el compartimiento medio se observan espermatocitos en paquiteno. Las espermatidas en fase 10, comienzan a separarse.
- XI. Las espermatidas en fase 11 comienzan a formar agregados entre los espermatocitos en paquiteno. Los agregados se encuentran anclados a células de Sertoli. Los espermatocitos y espermatogonias no muestran cambios
- XII. Se observan grandes cantidades de espermatogonias tipo A en el compartimiento basal, asociadas con espermatocitos en leptoteno. En el compartimiento medio, se observan agregados de espermatidas elongadas en fase 12, separados por espermatocitos en paquiteno.
- XIII. Las espermatogonias tipo A y los espermatocitos ahora en zigoteno, se ubican en el compartimiento basal. Mientras que en el compartimiento medio se pueden observar espermatocitos en diploteno y algunos en diacinesis (los cromosomas comienzan a separarse), entre ellos se pueden observar espermatidas en fase 13, cuyo núcleo comienza a curvarse.
- XIV. Las espermatogonias tipo A se observan a través de la lámina basal, junto con espermatocitos en zigoteno que comienzan la transición hacia espermatocitos en paquiteno. Los espermatocitos en diacinesis completan su división y dan origen a los espermatocitos secundarios. Las espermatidas en fase 14 adquieren un aspecto más alargado y están dispersas entre los espermatocitos secundarios.

Descripción de tipos celulares:

Espermatogonia:

- Tipo A: Núcleo claro con una delgada membrana nuclear.
- Intermedias: Núcleo con pequeños cúmulos de cromatina y membrana nuclear delgada.
- Tipo B: Núcleo con grandes cúmulos de cromatina y con una delgada membrana nuclear.

Espermatocitos:

- Primarios:
 - Leptoteno: Densa red de filamentos cromosómicos delgados en el núcleo.
 - Zigoteno: Los filamentos cromosómicos delgados aparecen agrupados.

- Paquitenio: Se observan cromosomas se observan pareados en sinapsis y, en ocasiones, puede observarse el complejo sinaptonémico.
- Diploteno: No es muy común observarlos. Los cromosomas se observan pareados pero no en sinapsis, el complejo sinaptonémico se ha desensamblado.
- Diacinesis: los cromosomas migran hacia la placa metafásica.
- Secundarios: Solo pueden observarse en el estadio XIV. Presentan un núcleo muy grande, con una lámina basal muy delgada y un cúmulo de cromatina muy grande en el centro.

Espermatogonias (fases):

1. Presencia de idiosoma localizado en la zona del aparato de Golgi.
2. Presencia de gránulos (1-4) en el idiosoma.
3. Presencia de gránulo acrosomal.
4. Granulo acrosomal aplanado contra el núcleo.
5. EL granulo acrosomal se observa elongado y comienza a cubrir el núcleo.
6. Idiosoma separado del gránulo acrosomal. Se comienza a formar el casquete y aparecen los centriolos en el extremo opuesto de este.
7. El casquete alcanza su tamaño máximo.
8. El gránulo acrosomal y el casquete se orientan hacia la lámina basal.
9. El núcleo se observa pequeño y aplanado, rodeado por el casquete (ápice celular). El gránulo acrosomal se observa elongado y se denomina "acrosoma"
10. El extremo caudal del casquete se extiende al extremo caudal del núcleo.
11. El núcleo y el casquete aparecen más elongados y el ápice celular se vuelve redondo.
12. El núcleo alcanza su tamaño máximo, el ápice del acrosoma adquiere forma de cuña.
13. El núcleo se vuelve más delgado y con un ápice puntiagudo. El citoplasma se condensa alrededor de la cola.
14. El núcleo se contrae para volverse más pequeño. El acrosoma se observa en forma de cresta y está fijo al eje dorsal.
15. En esta fase adquieren la denominación de espermatozoides inmaduros. Aparece una membrana fina con forma de aleta, derivada del casquete, a lo largo del eje dorsal, entre el extremo caudal del acrosoma y el eje dorsal del núcleo.

16. La membrana fina con forma de aleta desaparece. El acrosoma se extiende caudalmente a lo largo del eje dorsal.
17. El acrosoma y el casquete aparecen desplazados en delante del núcleo.
18. El citoplasma se acumula en la concavidad de la cabeza del espermatozoide inmaduro.
19. No presentan grandes diferencias con la fase 18. Cuando se realiza tinción PAS, el casquete y el acrosoma se tiñen menos que en la fase 18.

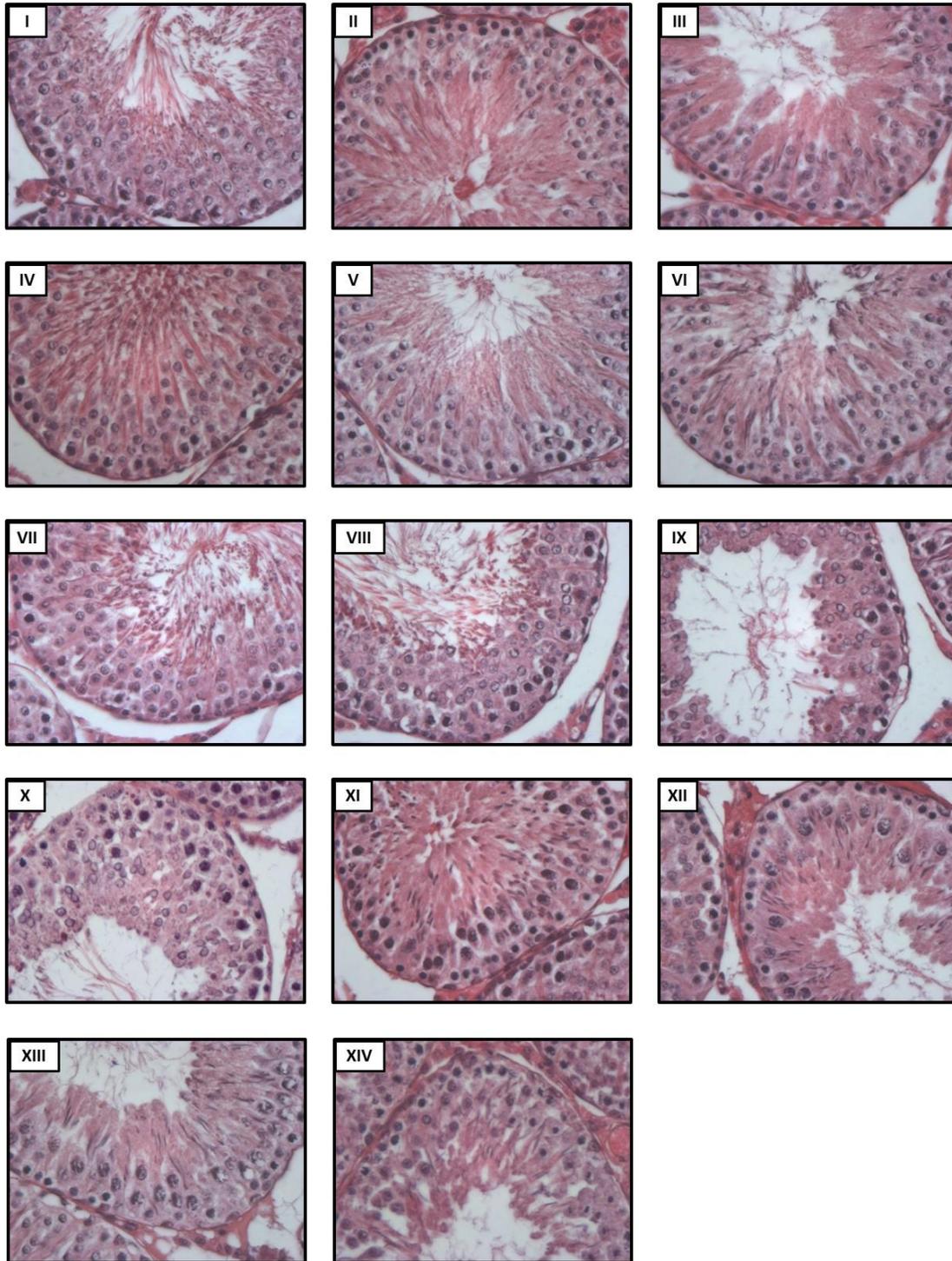


Figura 20. Atlas de los estadios del ciclo del epitelio seminífero en rata. Tinción H&E. todas las fotomicrografías de muestran a un aumento X400.

14.2.7 ELISA

14.2.7.1 *Preparación de Standard*

1. Se preparó la solución Standard de TNF- α (100 ng/ mL) añadiendo 400 μ L de buffer diluyente de muestra al vial correspondiente y se agitó de manera gentil hasta que se disolvió el TNF- α en polvo
2. Se etiquetaron los viales del 1 al 7
3. Al vial 1 se le añadieron 100 μ L de Standard de TNF- α y 400 μ L de buffer diluyente de muestra, se homogenizó de manera gentil
4. En los siguientes viales (2-7) se añadieron 400 μ L de buffer diluyente de muestra
5. Al vial 2 se le añadieron 200 μ L del vial 1 y se homogenizó
6. Al vial 3 se le añadieron 200 μ L del vial 3 y se homogenizó; el mismo procedimiento se realizó con los siguientes viales, hasta llegar al vial 7
7. Se utilizó buffer diluyente de muestra como blanco

14.2.7.2 *Homogenización del tejido*

1. Se agregaron 500 μ L de buffer de lisis por cada 10 mg de testículo
2. El tejido fue homogenizado completamente
3. El homogenizado fue centrifugado a 13500 rpm durante 40 min a 4°C
4. El sobrenadante fue recolectado y almacenado a 20°C hasta el día siguiente

Las muestras de suero no fueron diluídas ni homogenizadas, se cargaron en los pozos tal cual.

14.2.7.3 *Ensayo*

1. Se colocaron 100 μ L de Standard en los pozos correspondientes
2. De cada muestra (suero y testículo) se colocaron 25 μ L más 75 μ L de buffer diluyente de muestra en sus pozos correspondientes y se incubó la placa por 2.5 h en agitación constante
3. Se descartaron las soluciones y se realizaron 4 lavados colocando 300 μ L de solución de lavado en cada pozo; la solución fue descartada y la placa se golpeó boca abajo de manera suave contra una servilleta en la mesa para eliminar el exceso
4. Se añadieron 100 μ L del anticuerpo de detección biotinilado para TNF- α en cada pozo y se incubó por 1 h en constante agitación
5. Se descartó la solución y se realizaron 4 lavados de la misma manera especificada en el paso 3

6. Se añadieron 100 µL de solución HRP-Streptavidin a cada pozo y se incubó por 45 min en constante agitación
7. Se descartó la solución y se realizaron 4 lavados de la misma manera especificada en el paso 3
8. Se añadieron 100 µL de sustrato TBM de un solo paso a cada pozo y se incubó por 30 min en constante agitación y en oscuridad
9. Se añadieron 50 µL de solución Stop a cada pozo y se leyó la placa inmediatamente a 450 nm en un lector de placas H Reader 1, HLab®.

Todas las muestras se manejaron por duplicado.

Para más detalles sobre el procedimiento revisar el manual del kit de detección de TNF-α mediante ELISA en un solo paso (Abcam, cat: ab100785)

15. REFERENCIAS

- Andersen, M. L., Bignotto, M., Machado, R. B., & Tufik, S. (2004). Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(6), 791-797. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000600003>
- Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (2009). Physiology and Function of the Tight Junction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(2), a002584-a002584. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002584>
- Arnold, J., Hendriks, J., Ince, C., & Bruining, H. (1994). Tonometry to assess the adequacy of splanchnic oxygenation in the critically ill patient. *Intensive Care Medicine*, 20(6), 452-456. <https://doi.org/10.1007/BF01710660>
- Beltran, N. E., Sanchez-Miranda, G., Godinez, M., Diaz, U., & Sacristan, E. (2006). Gastric impedance spectroscopy in elective cardiovascular surgery patients. *Physiological Measurement*, 27(3), 265-277. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/27/3/005>
- Białas, M., Fiszer, D., Rozwadowska, N., Kosicki, W., Jedrzejczak, P., & Kurpisz, M. (2009). ORIGINAL ARTICLE: The Role of IL-6, IL-10, TNF-α and its Receptors TNFR1 and TNFR2 in the Local Regulatory System of Normal and Impaired Human Spermatogenesis: Cytokines expression in human testis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 62(1), 51-59. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2009.00711.x>

- Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: All we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1), 1-5. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>
- Bryan, E. R., Kim, J., Beagley, K. W., & Carey, A. J. (2020). Testicular inflammation and infertility: Could chlamydial infections be contributing? *American Journal of Reproductive Immunology*, 84(3). <https://doi.org/10.1111/aji.13286>
- Burk, A.-M., Martin, M., Flierl, M. A., Rittirsch, D., Helm, M., Lampl, L., Bruckner, U., Stahl, G. L., Blom, A. M., Perl, M., Gebhard, F., & Huber-Lang, M. (2012). Early complementopathy after multiple injuries in humans. *Shock*, 37(4), 348-354. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3182471795>
- Carette, D., Gilleron, J., Decrouy, X., Fiorini, C., Diry, M., Segretain, D., & Pointis, G. (2009). Connexin 33 impairs gap junction functionality by accelerating connexin 43 gap junction plaque endocytosis. *Traffic*, 10(9), 1272-1285. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00949.x>
- Chakraborty, R. K., & Burns, B. (2022). Systemic Inflammatory Response Syndrome. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547669/>
- Chen, Q., Deng, T., & Han, D. (2016). Testicular immunoregulation and spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59, 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.019>
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews*, 64(1), 16-64. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>
- Cheraghi, E., Golkar, A., Roshanaei, K., & Alani, B. (2017). Aluminium-induced oxidative stress, apoptosis and alterations in testicular tissue and sperm quality in wistar rats: Ameliorative effects of curcumin. *International Journal of Fertility and Sterility*, 11(3). <https://doi.org/10.22074/ijfs.2017.4859>
- Chojnacka, K., Bilinska, B., & Mruk, D. D. (2016). Interleukin 1alpha-induced disruption of the Sertoli cell cytoskeleton affects gap junctional communication. *Cellular Signalling*, 28(5), 469-480. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.02.003>
- Clermont, Y., & Harvey, S. C. (1965). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino Rats. *Endocrinology*, 76(1), 80-89. <https://doi.org/10.1210/endo-76-1-80>
- Dadhich, R. K., Barrionuevo, F. J., Real, F. M., Lupiañez, D. G., Ortega, E., Burgos, M., & Jiménez, R. (2013). Identification of live germ-cell desquamation as a major mechanism of seasonal testis regression in mammals: A study in the iberian mole

- (*Talpa occidentalis*)1. *Biology of Reproduction*, 88(4).
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106708>
- de Groot, H., & Rauen, U. (2007). Ischemia-Reperfusion injury: Processes in pathogenetic networks: a review. *Transplantation Proceedings*, 39(2), 481-484.
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.12.012>
- Decrouy, X., Gasc, J. -M., Pointis, G., & Segretain, D. (2004). Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 200(1), 146-154. <https://doi.org/10.1002/jcp.10473>
- Demirci, T., & Sahin, E. (2018). The effect of chronic stress and obesity on sperm quality and testis histology in male rats; a morphometric and immunohistochemical study. *Histology and Histopathology*, 34(3), 287-302. <https://doi.org/10.14670/HH-18-077>
- Dong, S., Chen, C., Zhang, J., Gao, Y., Zeng, X., & Zhang, X. (2022). Testicular aging, male fertility and beyond. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1012119.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1012119>
- Eltzschig, H. K., & Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion: From mechanism to translation. *Nature medicine*, 17(11). <https://doi.org/10.1038/nm.2507>
- Fan, W., Xu, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Lu, L., & Ding, Z. (2018). Obesity or overweight, a chronic inflammatory status in male reproductive system, leads to mice and human subfertility. *Frontiers in Physiology*, 8, 1117.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01117>
- Fiorini, C., Decrouy, X., Defamie, N., Segretain, D., & Pointis, G. (2006). Opposite regulation of connexin33 and connexin43 by LPS and IL-1 α in spermatogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 290(3), C733-C740.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00106.2005>
- França, L. R., Ogawa, T., Avarbock, M. R., Brinster, R. L., & Russell, L. D. (1998). Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the Rat. *Biology of Reproduction*, 59(6), 1371-1377. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1371>
- Furuse, M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1), a002907-a002907.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002907>
- Ganjani, V., Ahmadi, N., Divar, M. R., Sharifiyazdi, H., & Meimandi-Parizi, A. (2021). Protective effects of crocin on testicular torsion/detorsion in rats. *Theriogenology*, 173, 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.021>

- Gentile, L. F., Cuenca, A. G., Efron, P. A., Ang, D., Bihorac, A., McKinley, B. A., Moldawer, L. L., & Moore, F. A. (2012). Persistent inflammation and immunosuppression: A common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 72(6), 1491-1501.
<https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318256e000>
- Gerber, J., Heinrich, J., & Brehm, R. (2016). Blood–testis barrier and Sertoli cell function: Lessons from SCCx43KO mice. *REPRODUCTION*, 151(2), R15-R27.
<https://doi.org/10.1530/REP-15-0366>
- Gow, A., Southwood, C. M., Li, J. S., Pariali, M., Riordan, G. P., Brodie, S. E., Danias, J., Bronstein, J. M., Kachar, B., & Lazzarini, R. A. (1999). CNS myelin and Sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/Claudin-11 null mice. *Cell*, 99(6), 649-659.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81553-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81553-6)
- Gregová, K., Číkoš, Š., Bilecová-Rabajdová, M., Urban, P., Varga, J., Feterik, Š., & Veselá, J. (2015). Intestinal ischemia-reperfusion injury mediates expression of inflammatory cytokines in rats. *General physiology and biophysics*, 34(01), 95-99.
https://doi.org/10.4149/gpb_2014030
- Griswold, M. D. (2018). 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biology of Reproduction*, 99(1), 87-100.
<https://doi.org/10.1093/biolre/i0y027>
- Haeri, S. A., Rajabi, H., Fazelipour, S., & Hosseinimehr, S. J. (2014). Carnosine mitigates apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from gamma-radiation-induced injury in mice. *Andrologia*, 46(9), 1041-1046.
<https://doi.org/10.1111/and.12193>
- Han, S. J., & Lee, H. T. (2019). Mechanisms and therapeutic targets of ischemic acute kidney injury. *Kidney Research and Clinical Practice*, 38(4), 427-440.
<https://doi.org/10.23876/j.krcp.19.062>
- He, S., Atkinson, C., Qiao, F., Cianflone, K., Chen, X., & Tomlinson, S. (2009). A complement-dependent balance between hepatic ischemia/reperfusion injury and liver regeneration in mice. *Journal of Clinical Investigation*, JCI38289.
<https://doi.org/10.1172/JCI38289>
- Hess, R. A., & de Franca, L. R. (2009). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. En C. Y. Cheng (Ed.), *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* (Vol. 636, pp. 1-15). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1

- Hess, R. A., Schaeffer, D. J., Eroschenko, V. P., & Keen, J. E. (1990). Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biology of Reproduction*, 43(3), 517-524. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.3.517>
- Hochereau, M.-T., & Solari, A. (1963). Constance des fréquences relatives des stades du cycle de l'épithélium séminifère chez le taureau et chez le rat. 3(2), 93-102.
- Hollenbach, J., Jung, K., Noelke, J., Gasse, H., Pfarrer, C., Koy, M., & Brehm, R. (2018). Loss of connexin43 in murine Sertoli cells and its effect on blood-testis barrier formation and dynamics. *PLOS ONE*, 13(6), e0198100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198100>
- Hong, C. Y., Park, J. H., Ahn, R. S., Im, S. Y., Choi, H.-S., Soh, J., Mellon, S. H., & Lee, K. (2004). Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha. *Molecular and Cellular Biology*, 24(7), 2593-2604. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.7.2593-2604.2004>
- Huber-Lang, M., Kovtun, A., & Ignatius, A. (2013). The role of complement in trauma and fracture healing. *Seminars in Immunology*, 25(1), 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.05.006>
- Huleihel, M., & Lunenfeld, E. (2004). Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian Journal of Andrology*, 6(3), 259-268.
- Idrovo, J.-P., Yang, W.-L., Jacob, A., Aziz, M., Nicastro, J., Coppa, G. F., & Wang, P. (2014). AICAR attenuates organ injury and inflammatory response after intestinal ischemia and reperfusion. *Molecular Medicine*, 20(1), 676-683. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00134>
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., & Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated maguiks, Zo-1, Zo-2, and Zo-3, with the COOH termini of claudins. *Journal of Cell Biology*, 147(6), 1351-1363. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.6.1351>
- Iwasa, J., & Marshall, W. (2019). Karp Biología Celular y Molecular: Conceptos y experimentos. 8ª edición. McGraw-Hill. Ciudad de México. México. p. 576
- Jarczak, D., & Nierhaus, A. (2022). Cytokine Storm definition, causes, and implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11740. <https://doi.org/10.3390/ijms231911740>
- Johnsen, S. G. (1970). Testicular biopsy score count – a method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal

- males. *Hormone Research in Paediatrics*, 1(1), 2-25.
<https://doi.org/10.1159/000178170>
- Karakuş, S. C., Süzen, A., Yenisey, Ç., Ertürk, N., Epikmen, T., İpek, E., User, İ. R., & Abas, B. İ. (2021). The effect of hypothermia in a rat testicular torsion/detorsion model. *Journal of Pediatric Urology*, 17(3), 291.e1-291.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2021.01.045>
- Kato, T., Mizuno, K., Nishio, H., Moritoki, Y., Kamisawa, H., Kurokawa, S., Nakane, A., Maruyama, T., Ando, R., Hayashi, Y., & Yasui, T. (2020). Disorganization of claudin-11 and dysfunction of the blood-testis barrier during puberty in a cryptorchid rat model. *Andrology*, 8(5), 1398-1408.
<https://doi.org/10.1111/andr.12788>
- Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. L. (2012). *Histología y Biología Celular: Introducción a la Anatomía Patológica*. Elsevier. <http://www.elsevierelibrary.es/pdfreader/histologia-y-biologa-celular>
- Leblond, C. P., & Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55(4), 548-573. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1952.tb26576.x>
- Leeson, T. S., & Cookson, F. B. (1974). The mammalian testicular capsule and its muscle elements. *Journal of Morphology*, 144(2), 237-253.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1051440208>
- Leisegang, K., Henkel, R., & Agarwal, A. (2019). Obesity and metabolic syndrome associated with systemic inflammation and the impact on the male reproductive system. *American Journal of Reproductive Immunology*, 82(5).
<https://doi.org/10.1111/aji.13178>
- Li, G., Zhang, Y., & Fan, Z. (2021). Cellular signal transduction pathways involved in acute lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2021/9985701>
- Li, M. W. M., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2009). Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: An emerging concept of regulation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(4), 329-338.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.07.007>
- Li, N., Mruk, D. D., Mok, K., Li, M. W. M., Wong, C. K. C., Lee, W. M., Han, D., Silvestrini, B., & Cheng, C. Y. (2016). Connexin 43 reboots meiosis and reseals blood-testis

- barrier following toxicant-mediated aspermatogenesis and barrier disruption. *The FASEB Journal*, 30(4), 1436-1452. <https://doi.org/10.1096/fj.15-276527>
- Li, N., Wang, T., & Han, D. (2012). Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00152>
- Lord, J. M., Midwinter, M. J., Chen, Y.-F., Belli, A., Brohi, K., Kovacs, E. J., Koenderman, L., Kubes, P., & Lilford, R. J. (2014). The systemic immune response to trauma: An overview of pathophysiology and treatment. *The Lancet*, 384(9952), 1455-1465. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60687-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60687-5)
- Lui, W., & Cheng, C. (2007). Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis—A molecular and biochemical perspective. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 18(3-4), 299-311. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.04.009>
- Lui, W.-Y., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2001). Transforming Growth Factor- β 3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier *in vitro* possibly mediated via its effects on Occludin, Zonula Occludens-1, and Claudin-11¹. *Endocrinology*, 142(5), 1865-1877. <https://doi.org/10.1210/endo.142.5.8116>
- Magierowska, K., Korbut, E., Hubalewska-Mazgaj, M., Surmiak, M., Chmura, A., Bakalarz, D., Buszewicz, G., Wójcik, D., Śliwowski, Z., Ginter, G., Gromowski, T., Kwiecień, S., Brzozowski, T., & Magierowski, M. (2019). Oxidative gastric mucosal damage induced by ischemia/reperfusion and the mechanisms of its prevention by carbon monoxide-releasing tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer. *Free Radical Biology and Medicine*, 145, 198-208. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.032>
- Maynard, R. L., & Downes, N. (2019). *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/umontreal-ebooks/detail.action?docID=5693516>
- Mazaud-Guittot, S., Meugnier, E., Pesenti, S., Wu, X., Vidal, H., Gow, A., & Le Magueresse-Battistoni, B. (2010). Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis. *Biology of Reproduction*, 82(1), 202-213. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078907>
- McCabe, M. J., Tarulli, G. A., Laven-Law, G., Matthiesson, K. L., Meachem, S. J., McLachlan, R. I., Dinger, M. E., & Stanton, P. G. (2016). Gonadotropin suppression in men leads to a reduction in claudin-11 at the Sertoli cell tight junction. *Human Reproduction*, 31(4), 875-886. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew009>

- Meistrich, M. L., & Hess, R. A. (2013). Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. En D. T. Carrell & K. I. Aston (Eds.), *Spermatogenesis* (Vol. 927, pp. 299-307). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_27
- Meng, Z., Liu, Y., Zhou, J., Zheng, B., & Lv, J. (2022). Drug transport across the blood-testis barrier. *American Journal of Translational Research*, *14*(9), 6412-6423.
- Mohammadi, A., Behnam-Rassouli, M., Momeni, Z., & Mahdavi-Shahri, N. (2016). Effects of hydro-alcoholic extract of *Launaea acanthodes* on serum gonadotropin and testosterone levels and the structure of seminiferous tubules in hyperglycemic rats. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, *22*(3), 207-213. <https://doi.org/10.1007/s11655-015-2315-y>
- Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2004). Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, *25*(5), 747-806. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0022>
- Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2010). Tight junctions in the testis: New perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*(1546), 1621-1635. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0010>
- Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2015). The mammalian blood-testis barrier: Its biology and rregulation. *Endocrine Reviews*, *36*(5), 564-591. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1101>
- O'Bryan, M. K., Schlatt, S., Phillips, D. J., de Kretser, D. M., & Hedger, M. P. (2000). Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels *in vivo*. *Endocrinology*, *141*(1), 238-246. <https://doi.org/10.1210/endo.141.1.7240>
- O'Donnell, L., Stanton, P., & de Kretser, D. M. (2000). Endocrinology of the male reproductive system and spermatogenesis. En L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, & A. Vinik (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279031/>
- Park, S. W., Kim, M., Brown, K. M., D'Agati, V. D., & Lee, H. T. (2011). Paneth cell-derived IL-17A causes multi-organ dysfunction after hepatic ischemia and reperfusion injury. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *53*(5), 1662-1675. <https://doi.org/10.1002/hep.24253>

- Pawlina, W. (2020). *Ross Histología Texto y Atlas: Correlación con biología celular y molecular* (8.ª ed.). Barcelona, España.
- Peirouvi, T., Aliaghaei, A., Eslami Farsani, B., Ziaei pour, S., Ebrahimi, V., Forozesh, M., Ghadipasha, M., Mahmoudiasl, G.-R., Aryan, A., Moghimi, N., Abdi, S., Raofi, A., Kargar Godaneh, M., & Abdollahifar, M.-A. (2021). COVID-19 disrupts the blood–testis barrier through the induction of inflammatory cytokines and disruption of junctional proteins. *Inflammation Research*, *70*(10-12), 1165-1175.
<https://doi.org/10.1007/s00011-021-01497-4>
- Pelletier, R. M. (1995). The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (guinea pig) and seasonal breeders' (mink) testes. *Journal of Andrology*, *16*(5), 400-409.
- Peña-Mercado, E., Garcia-Lorenzana, M., Arechaga-Ocampo, E., González-De la Rosa, C. H., & Beltran, N. E. (2018). Evaluation of HIF-1 α and iNOS in ischemia/reperfusion gastric model: Bioimpedance, histological and immunohistochemical analyses. *Histology and Histopathology*, *33*(8), 815-823.
<https://doi.org/10.14670/HH-11-975>
- Peña-Mercado, E., Garcia-Lorenzana, M., Huerta-Yepez, S., Cruz-Ledesma, A., & Beltran-Vargas, N. E. (2022). Effect of melatonin on electrical impedance and biomarkers of damage in a gastric ischemia/reperfusion model. *PLOS ONE*, *17*(8), e0273099.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273099>
- Perey B, Cleremont Y, Leblond CP. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am J Anat* 1961;108:47–77.
- Pérez, C. V., Sobarzo, C. M., Jacobo, P. V., Pellizzari, E. H., Cigorraga, S. B., Denduchis, B., & Lustig, L. (2012). Loss of Occludin expression and impairment of blood-testis barrier permeability in rats with autoimmune orchitis: Effect of interleukin 6 on Sertoli cell tight junctions. *Biology of Reproduction*, *87*(5).
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.101709>
- Phillips, B. T., Gassei, K., & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*(1546), 1663-1678. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0026>
- Pilatz, A., Hudemann, C., Wolf, J., Halefeld, I., Paradowska-Dogan, A., Schuppe, H.-C., Hossain, H., Jiang, Q., Schultheiss, D., Renz, H., Weidner, W., Wagenlehner, F., &

- Linn, T. (2017). Metabolic syndrome and the seminal cytokine network in morbidly obese males. *Andrology*, 5(1), 23-30. <https://doi.org/10.1111/andr.12296>
- Pinsky, M. R., Vincent, J.-L., Deviere, J., Alegre, M., Kahn, R. J., & Dupont, E. (1993). Serum cytokine levels in human septic shock. *Chest*, 103(2), 565-575. <https://doi.org/10.1378/chest.103.2.565>
- Pointis, G., Fiorini, C., Defamie, N., & Segretain, D. (2005). Gap junctional communication in the male reproductive system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1719(1-2), 102-116. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.017>
- Pointis, G., Gilleron, J., Carette, D., & Segretain, D. (2010). Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1607-1620. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0114>
- Pugin, J. (2012). How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Annals of Intensive Care*, 2(1), 27. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-2-27>
- Rittirsch, D., Redl, H., & Huber-Lang, M. (2012). Role of complement in multiorgan failure. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2012/962927>
- Rode, K., Langeheine, M., Seeger, B., & Brehm, R. (2021). Connexin43 in germ cells seems to be dispensable for murine spermatogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7924. <https://doi.org/10.3390/ijms22157924>
- Roosen-Runge, E. C., & Giesel, L. O. (1950). Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *American Journal of Anatomy*, 87(1), 1-30. <https://doi.org/10.1002/aja.1000870102>
- Rosiepen, G., Chapin, R. E., & Weinbauer, G. F. (1995). The duration of the cycle of the seminiferous epithelium is altered by administration of 2,5-hexanedione in the adult Sprague-Dawley rat. *Journal of Andrology*, 16(2), 127-135.
- Rosiepen, G., Weinbauer, G. F., Schlatt, S., Behre, H. M., & Nieschlag, E. (1994). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium, estimated by the 5-bromodeoxyuridine technique, in laboratory and feral rats. *Reproduction*, 100(1), 299-306. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1000299>
- Russell, L. (1977). Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *American Journal of Anatomy*, 148(3), 313-328. <https://doi.org/10.1002/aja.1001480303>

- Sarıbal, D., Erdem, E., Güngör-Ordueri, N. E., Usta, A., Karakuş, C., & Karacan, M. (2020). Metformin decreases testicular damages following ischaemia/reperfusion injury in rats. *Andrologia*, 52(2), e13481. <https://doi.org/10.1111/and.13481>
- Sekmenli, T., Gunduz, M., Öztürk, B., Karabağlı, P., Ciftci, I., Tekin, G., & Yılmaz, M. (2017). The effects of melatonin and colchicine on ischemia–reperfusion injury in experimental rat testicular torsion model. *Journal of Pediatric Surgery*, 52(4), 582-586. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.11.035>
- Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in cell & developmental biology*, 0, 2-13. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.02.012>
- Souza, D. G., Cara, D. C., Cassali, G. D., Coutinho, S. F., Silveira, M. R., Andrade, S. P., Poole, S. P., & Teixeira, M. M. (2000a). Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat: PAF and ischaemia and reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*, 131(8), 1800-1808. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703756>
- Souza, D. G., Cassali, G. D., Poole, S., & Teixeira, M. M. (2001). Effects of inhibition of PDE4 and TNF- α on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury: PDE4 inhibitors, TNF- α and reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*, 134(5), 985-994. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704336>
- Souza, D. G., Coutinho, S. F., Silveira, M. R., Cara, D. C., & Teixeira, M. M. (2000b). Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. *European Journal of Pharmacology*, 403(1-2), 121-128. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00574-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00574-4)
- Souza, D. G., Mendonça, V. A., Castro, M. S. de A., Poole, S., & Teixeira, M. M. (2002). Role of tachykinin NK receptors on the local and remote injuries following ischaemia and reperfusion of the superior mesenteric artery in the rat: Tachykinin NK₁ receptors and reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*, 135(2), 303-312. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704464>
- Souza, D. G., & Teixeira, M. M. (2005). The balance between the production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 determines tissue injury and lethality during intestinal ischemia and reperfusion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(suppl 1), 59-66. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000900011>

- Sridharan, S., Brehm, R., Bergmann, M., & Cooke, P. S. (2007). Role of connexin 43 in Sertoli cells of testis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1120(1), 131-143. <https://doi.org/10.1196/annals.1411.004>
- Staggenborg, S., Koch, R., Rode, K., Hüneke, H., Tiedje, L., Wirth, G., Langeheine, M., Blume, I., Rohn, K., Wrede, C., Pfarrer, C., & Brehm, R. (2022). Connexin43 represents an important regulator for Sertoli cell morphology, Sertoli cell nuclear ultrastructure, and Sertoli cell maturation. *Scientific Reports*, 12(1), 12898. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16919-4>
- Stallion, A., Kou, T. D., Latifi, S. Q., Miller, K. A., Dahms, B. B., Dudgeon, D. L., & Levine, A. D. (2005). Ischemia/reperfusion: A clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. *Journal of Pediatric Surgery*, 40(3), 470-477. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2004.11.045>
- Stanton, P. G. (2016). Regulation of the blood-testis barrier. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59, 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.06.018>
- Su, L., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2010). Drug transporters, the blood-testis barrier and spermatogenesis. *Journal of Endocrinology*, JOE-10-0363. <https://doi.org/10.1677/JOE-10-0363>
- Syriou, V., Papanikolaou, D., Kozyraki, A., & Goulis, D. G. (2018). Cytokines and male infertility. *European Cytokine Network*, 29(3), 73-82. <https://doi.org/10.1684/ecn.2018.0412>
- Tagelenbosch, R. A. J., & de Rooij, D. G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 290(2), 193-200. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90159-D](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90159-D)
- Uribe-Aranzábal, M. C., Hernández-Franyutti, A., & Guillette, L. J. (2006). Interembryonic regions of the uterus of the viviparous lizard *Mabuya brachypoda* (Squamata: Scincidae). *Journal of Morphology*, 267(4), 404-414. <https://doi.org/10.1002/jmor.10416>
- Utomo, B., Daningtia, N. R., Yuliani, G. A., & Yuniarti, W. M. (2019). Effects of a standardized 40% ellagic acid pomegranate (*Punica granatum* L.) extract on seminiferous tubule histopathology, diameter, and epithelium thickness in albino Wistar rats after heat exposure. *Veterinary World*, 12(8), 1261-1265. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1261-1265>

- Valli, H., Phillips, B. T., Orwig, K. E., Gassei, K., & Nagano, M. C. (2015). Spermatogonial Stem Cells and Spermatogenesis. En *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (pp. 595-635). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00015-6>
- van der Poll, T., Shankar-Hari, M., & Wiersinga, W. J. (2021). The immunology of sepsis. *Immunity*, *54*(11), 2450-2464. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.10.012>
- Viñuela-Berni, V., Gómez-González, B., & Quintanar-Stephano, A. (2020). Blockade of arginine vasopressin receptors prevents blood-brain barrier breakdown in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scientific Reports*, *10*(1), 467. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57134-y>
- Wang, J.-M., Li, Z.-F., Yang, W.-X., & Tan, F.-Q. (2022). Follicle-stimulating hormone signaling in Sertoli cells: A licence to the early stages of spermatogenesis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *20*(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00971-w>
- Ward, P. A. (2004). The dark side of C5a in sepsis. *Nature Reviews Immunology*, *4*(2), 133-142. <https://doi.org/10.1038/nri1269>
- Wu, M.-Y., Yiang, G.-T., Liao, W.-T., Tsai, A. P.-Y., Cheng, Y.-L., Cheng, P.-W., Li, C.-Y., & Li, C.-J. (2018). Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *46*(4), 1650-1667. <https://doi.org/10.1159/000489241>
- Xia, W., Wong, E. W. P., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2009). TGF- β 3 and TNF α perturb blood–testis barrier (BTB) dynamics by accelerating the clathrin-mediated endocytosis of integral membrane proteins: A new concept of BTB regulation during spermatogenesis. *Developmental Biology*, *327*(1), 48-61. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.11.028>
- Xiao, W., Mindrinos, M. N., Seok, J., Cuschieri, J., Cuenca, A. G., Gao, H., Hayden, D. L., Hennessy, L., Moore, E. E., Minei, J. P., Bankey, P. E., Johnson, J. L., Sperry, J., Nathens, A. B., Billiar, T. R., West, M. A., Brownstein, B. H., Mason, P. H., Baker, H. V., ... Tompkins, R. G. (2011). A genomic storm in critically injured humans. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(13), 2581-2590. <https://doi.org/10.1084/jem.20111354>
- Xu, R., Lin, F., Bao, C., Huang, H., Ji, C., Wang, S., Jin, L., Sun, L., Li, K., Zhang, Z., & Wang, F. S. (2016). Complement 5a receptor-mediated neutrophil dysfunction is

associated with a poor outcome in sepsis. *Cellular & molecular immunology*, 13(1), 103–109. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.136>

Yan, H. H., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2008). Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(6), 1945–1959. <https://doi.org/10.1096/fj.06-070342>

Yildirim, O. G., Sumlu, E., Aslan, E., Koca, H. B., Pektas, M. B., Sadi, G., & Akar, F. (2019). High-fructose in drinking water initiates activation of inflammatory cytokines and testicular degeneration in rat. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(3), 224-232. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1543745>

Zhang, H., Yin, Y., Wang, G., Liu, Z., Liu, L., & Sun, F. (2015). Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells. *Scientific Reports*, 4(1), 4260. <https://doi.org/10.1038/srep04260>

Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., & Hauser, C. J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 464(7285), 104-107. <https://doi.org/10.1038/nature08780>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00112

Matrícula: 2203801612

EFFECTO DEL MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN MUCOSA GÁSTRICA SOBRE LA ORGANIZACIÓN TISULAR DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS EN RATAS MACHO DE LA CEPA WISTAR.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 18 del mes de mayo del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. NOHRA ELSY BELTRAN VARGAS
- DRA. ROSA ANGELICA LUCIO LUCIO
- DRA. EDITH ARENAS RIOS
- DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ



Ricardo Ruiz Villarreal R

RICARDO RUIZ VILLARREAL
ALUMNO

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:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: RICARDO RUIZ VILLARREAL

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

REVISÓ
[Signature]

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

[Signature]

DRA. NOHRA ELSY BELTRAN VARGAS

VOCAL

[Signature]

DRA. ROSA ANGELICA LUCIO LUCIO

VOCAL

[Signature]

DRA. EDITH ARENAS RIOS

SECRETARIA

[Signature]

DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ