



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**

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

**DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“Activación de las vías de señalización intrínseca y  
extrínseca en la apoptosis testicular generada por el  
estrés agudo o crónico y su repercusión en la calidad  
espermática”**

**T E S I S**

Para obtener el grado de Doctor en Biología Experimental presenta:

**M. en B. E. Adriana Lizbeth Juárez Rojas**

**Codirectores:**

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

**Asesora:**

Dra. Irma Jiménez Morales

México, D.F. a 24 de Septiembre de 2015

**CÓMITE TUTORAL:**

**CODIRECTORA:**

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

Profesora titular

Área de Biología Conductual y Reproductiva

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

**CODIRECTOR:**

**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

Profesor titular

Área de Bioquímica y Fisiología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

**ASESORA:**

**Dra. Irma Jiménez Morales**

Profesora titular

Área de Biología Celular y Molecular

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

## **Agradecimientos:**

Agradezco:

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la realización del presente trabajo a través de la beca número: 224663.

**JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

**Dr. Mario García Lorenzana**

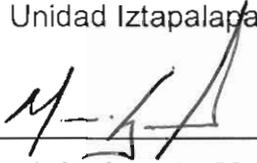
Presidente

Área de Neurociencias

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa



---

**Dr. Andrés Aragón Martínez**

Secretario

Facultad de Ingeniería y Ciencias

Universidad Autónoma de Tamaulipas



---

**Dra. Irma Jiménez Morales**

Vocal

Área de Biología Celular y Molecular

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa



---

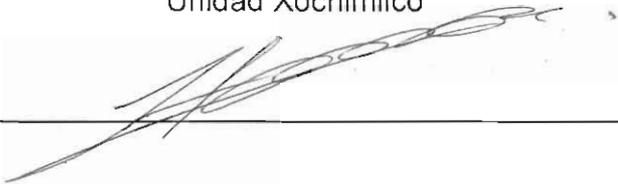
**Dr. José Antonio Herrera Barragán**

Vocal

Departamento de Producción Agrícola y Animal

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco



*“Pasamos nuestra vida fijándonos en nuestras limitaciones externas, pero las cadenas más difíciles de romper están en nuestro interior”*

*Bradley Whitford*

*“No es grande el que siempre triunfa, sino el que jamás se desalienta”*

*Martín Descalzo*

## Agradecimientos

Al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar mi agradecimiento a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr mi meta:

A mi codirectora de Tesis la Dra. María del Socorro Retana Márquez, por el compromiso y dedicación, que tiene con sus estudiantes hasta ver su aprendizaje y buen desarrollo, su labor es muy valiosa. Muchas gracias.

A los Doctores Luis Enrique Gómez Quiroz, Andrés Aragón Martínez, Francisco Javier Alarcón, Mario García Lorenzana y a la Doctora Irma Jiménez Morales, por fomentar la educación de generación en generación, inculcando valores y sembrando conocimiento, muchas gracias.

Al laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud y al laboratorio de Neurobiología Tisular del Departamento de Biología de la Reproducción. En particular a Daisy Martínez, Verónica Tejeda, Yolanda López Ramírez y Deisy Hernández. Al laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, por el apoyo brindado para la realización del Western Blot. En particular a Elizabeth Reyes, Patricia Rosales, Nelly López y Soraya, por todo el apoyo que me brindaron durante el tiempo que trabajé en su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio Ángeles Guerrero, Diana, Aldo, Felipe, Diana Esmeralda, Flor Solano, Eunice Hernández, Azhalea García, Mónica Díaz y Fahiel Casillas. Les agradezco por los momentos que compartimos durante estos años. Les deseo lo mejor.

A mi esposo David Andrade y a mis hijos Yolanda y Tadeo Andrade Juárez, por todo el amor, comprensión y apoyo brindado, porque su presencia ha sido y será siempre el motivo más grande que me ha impulsado para lograr esta meta.

	Páginas
Abreviaturas	xi
Resumen	xiv
Abstract	xvi
Introducción	1
1.0 Definición de estrés	1
1.1 Sistema de estrés	2
1.2 Función testicular en el adulto	8
1.2.1 Espermatogénesis	9
1.2.2 Fases de la espermatogénesis	10
1.3 Esteroidogénesis	15
1.4 Regulación neuroendocrina de la espermatogénesis	19
1.5 Maduración espermática	22
1.6 Epidídimo	23
1.7 El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) inhibe al eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG)	27
1.8 Apoptosis en las células germinales	30
1.9 Antecedentes	32
1.9.1 Activación de la apoptosis en las células testiculares por efecto del estrés agudo	32
1.9.2 Activación de la apoptosis en las células testiculares por efecto del estrés crónico	34
1.9.3 Efecto del estrés en la calidad de los espermatozoides	

	epididimarios	36
1.9.4	Efecto del estrés en la secreción de testosterona	37
2.0	Planteamiento del problema	39
3.0	Justificación	39
4.0	Pregunta de investigación	40
5.0	Hipótesis	40
6.0	Objetivo general	41
7.0	Objetivos particulares	41
8.0	Diseño experimental	41
8.1	Materiales y métodos	41
8.2	Animales de laboratorio	41
8.3	Estrés por inmersión en agua fría	42
8.4	Obtención de las muestras	43
8.5	Diseción y procesamiento de los testículos	43
8.6	Inclusión en parafina	44
8.7	Detección <i>in situ</i> de la fragmentación del ADN	45
8.7.1	Método de TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated deoxy-UTP nick-end labeling)	45
8.7.2	Conversión a campo claro	47
8.8	Western blot	47
8.8.1	Extracción de las proteínas	47
8.8.2	Preparación de las proteínas	48
8.8.3	Preparación de los geles	48

8.8.4	Electroforesis y transferencia de proteínas	48
8.9	Obtención de espermatozoides de la cauda del epidídimo	50
8.9.1	Análisis espermático	51
8.9.2	Viabilidad	51
8.9.3	Concentración	51
8.9.4	Movilidad	52
8.10	Determinación de corticosterona y testosterona	52
8.10.1	Cuantificación de corticosterona y testosterona por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	53
9.0	Análisis estadístico	54
10.0	Resultados	54
10.1	Porcentaje de túbulos seminíferos con células germinales positivas a TUNEL	54
10.2	Número de células germinales positivas a TUNEL contenidas en los túbulos seminíferos	56
10.3	Análisis cualitativo de las células germinales positivas a TUNEL	58
10.4	Contenido de proteínas	59
10.5	Análisis espermático	64
10.6	Concentración de corticosterona y testosterona	66
11.0	Discusión	68
12.0	Conclusión	79

13.0	Bibliografía	80
14.0	Apéndice	91
	Artículo científico	96

## Abreviaturas

3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
ARTIST	Ácido araquidónico relacionado con la tioesterasa involucrada en la esteroidogénesis
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AC	Adenilato ciclasa
ATP	Adenosin trifosfato
AMPC	Adenosina 3'5'-monofosfato cíclico
HCO <sub>3</sub>	Bicarbonato
tBid	Bid truncado
CAT	Catalasa
DISC	Complejo inductor de la señal de muerte
LH-R	Complejo LH-Receptor
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
DHEA	Dehidroepiandrosterona
$\Delta$ 4	Delta 4
$\Delta$ 5	Delta 5
TdT	Desoxi-nucleotidil-transferasa
CAD	Desoxiribonucleasa activada por caspasas
DHT	Dihidrotestosterona
FADD	Dominio de muerte asociado a FADD

HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
HHG	Eje hipotálamo-hipófisis-gónada
P450scc	Enzima que escinde la cadena lateral del colesterol
E	Epinefrina
ERO	Especies reactivas del oxígeno
NF-kB	Factor nuclear kappa B
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GPX	Glutación peroxidasa
GST	Glutación transferasa
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
FSH	Hormona estimulante del folículo
CRH	Hormona liberadora de corticotropinas
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
LH	Hormona luteinizante
kb	Kilobases
FasL	Ligando Fas
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LC	Locus coeruleus
LC-NE	Locus coeruleus-norepinefrina
NE	Norepinefrina
PVN	Núcleo paraventricular
pb	Pares de bases
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno

PKA	Proteína cinasa-A
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis
ABP	Proteína unidora de andrógenos
RG	Receptor a glucocorticoides
SR-BI	Receptor carroñero tipo I
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
SOD	Superóxido dismutasa
dUTP	Trifosfato de dideoxiuridina con fluoresceína
UV	Ultravioleta

## Resumen

La apoptosis en las células germinales del epitelio seminífero es un evento común que ocurre durante el desarrollo de la espermatogénesis, sin embargo, también se activa en respuesta al estrés. Actualmente no existen trabajos que relacionen la presencia de apoptosis en los testículos con la expresión de diferentes marcadores apoptóticos, así como con los cambios producidos en la calidad de espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la exposición al estrés agudo y crónico activa una o ambas vías apoptóticas en las células testiculares. Se utilizaron ratas macho (n=60) de la cepa Wistar de tres meses de edad y de 250-300 g de peso corporal. Los animales se asignaron a los siguientes grupos: a) control: 1, 20, 40 y 50 días; b) estrés agudo: 1, 3, 6, 12 y 24 h y c) estrés crónico: 20, 40 y 50 días, por inmersión en agua fría. Los animales control se mantuvieron en sus cajas sin manipulación. Al finalizar las sesiones de estrés, los animales se anestesiaron y se extrajeron ambos testículos. El testículo derecho se procesó para histología. Se evaluó la fragmentación del ADN por la técnica de TUNEL. Se obtuvo el porcentaje de túbulos seminíferos que contenían células germinales positivas a TUNEL, así como el número de células germinales positivas a TUNEL contenidas en dichos túbulos. El testículo izquierdo se utilizó para determinar el contenido de Bax, Bcl-2, caspasa 3 y 8 activas por Western blot. Se evaluó la calidad de los espermatozoides de la cauda del epidídimo y se determinaron las concentraciones séricas de corticosterona y testosterona. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, mostraron un porcentaje alto de túbulos con células germinales positivas a TUNEL en los testículos de los machos expuestos a estrés agudo, desde la primera hora, con un

máximo a las 24 horas post estrés. En los testículos de los machos expuestos a estrés crónico, se observó mayor porcentaje de túbulos con células germinales positivas a TUNEL pero no en el número de células apoptóticas por túbulo. El contenido de Bcl-2 disminuyó y el de Bax, caspasa 3 y 8 activas aumentó en los testículos de los machos estresados aguda y crónicamente. La viabilidad, concentración, movilidad total y progresiva de los espermatozoides de los machos estresados crónicamente disminuyeron significativamente. La concentración de testosterona disminuyó y la concentración de corticosterona aumentó en los machos sometidos a estrés crónico. Estos datos muestran que tanto el estrés agudo como el crónico inducen apoptosis en las células testiculares. El incremento en la concentración de la caspasa 8 activa indica la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. Mientras que el incremento de Bax así como la disminución de Bcl-2, indican la activación de la vía intrínseca. Debido a que ambas vías convergen en la activación de la caspasa 3, la cual también se incrementó, estos resultados indican que el estrés es capaz de activar ambas vías para causar apoptosis en las células del testículo. En conclusión, la apoptosis en las células testiculares provocada por el estrés agudo o crónico es activada por las vías apoptóticas intrínseca y extrínseca. Además, el estrés crónico disminuye la calidad y cantidad de los espermatozoides epididimarios. Estos resultados pueden estar relacionados con la disminución de testosterona y con el aumento de corticosterona del suero.

## **Abstract**

Germ cell (GC) apoptosis in the seminiferous epithelium is a common event that occurs during the development of spermatogenesis. However, it can be activated in response to stress. Currently, there are no studies that relate the onset of testicular apoptosis with the different apoptotic markers expression, as well as with the changes produced in spermatozoa quality from the cauda epididymis. The aim of the present study was to examine if acute or chronic stress activates one or both intrinsic and extrinsic apoptosis pathways on testicular cells. Adult male Wistar rats (n=60 of 3 months, weighing 250-300g) were assigned to one of the following 3 groups: a) Control: 1, 20, 40 and 50 days; b) Acute Stress: 1, 3, 6, 12 and 24 hours; and c) Chronic Stress: 20, 40 and 50 days, by cold water immersion. Subjects in the control group were maintained in their cages without any disturbance. At the end of the stress sessions, animals were anesthetized and both their testicles removed. The right testicle was processed for histology and apoptosis was assessed by TUNEL technique. Percentage of tubules containing GC apoptosis was calculated, as well as the number of apoptotic GC contained in the tubules. Left testis was used to evaluate, Bax, Bcl-2, caspases-3 and -8 content by Western Blot. Spermatid quality was analyzed in cauda epididymis sperm. Also, serum corticosterone and testosterone levels were assessed. Results showed high percentages of tubules with apoptotic cells in testes of males exposed to acute stress, from the first hour, reaching a maximum at 24 hours post-stress. Higher percentages of tubules with apoptotic GC were also observed in testes of males exposed to chronic stress. Bcl-2 content decreased, whereas Bax, cleaved-caspase-3 and -8 increased in the testes of acutely and chronically stressed males.

Spermatozoa viability, concentration and total and progressive motility decreased only in males with chronic stress. Testosterone concentration decreased while serum corticosterone concentration increased in males exposed to chronic stress. These results show that acute and chronic stress induces testicular cell apoptosis. Increase of the cleaved caspase-8 concentration indicates the extrinsic apoptosis pathway activation. Whereas Bax increase and Bcl-2 decrease, suggest activation of intrinsic pathway. As both pathways converge in the caspase-3 activation, which also increased, these results indicate that stress is capable of activate both pathways in order to cause apoptosis in testicular cells. In conclusion, apoptosis in testicular cells induced by acute and chronic stress is activated by both apoptotic pathways. In addition, chronic stress decreases the quality of the epididymis sperm. These effects are related with testosterone decreased and corticosterone increase.

## **Introducción**

El epitelio seminífero de los testículos es un tejido de proliferación rápida, en donde las células germinales se producen de manera clonal, mediante un gran número de divisiones mitóticas y meióticas previas a su diferenciación, que culmina con la formación estructural y funcional del espermatozoide. Sin embargo, pueden existir irregularidades durante este proceso que lleve a la formación de anomalías en los espermatozoides o que exista un exceso en la población de células germinales excediendo la capacidad de las células de Sertoli. Al parecer en el epitelio seminífero existe un mecanismo encargado de regular el número de células germinales que las células de Sertoli puede sostener sin exceder su capacidad (Francavilla y cols., 2002); este mecanismo es regulado vía apoptosis (Bartke, 1995; Riccioli y cols., 2003). No obstante, la apoptosis en el testículo, puede ser activada por factores internos como son: la disminución de testosterona o de gonadotropinas (Ruwanpura y cols., 2008) o bien por factores externos como el estrés, que pueden provocar alteraciones en el desarrollo de la espermatogénesis y afectar la producción de espermatozoides (Almeida y cols., 1998; Saki y cols., 2009).

### **1.0 Definición de estrés**

El estrés es la respuesta fisiológica del organismo ante un estresor. Los estresores son estímulos adversos, intrínsecos o extrínsecos, capaces de alterar la homeostasis del organismo (Johnson y cols., 1992; Charmadari y cols., 2005; Kyrou y Tsigos, 2009). Los organismos responden a estos estímulos mediante la activación de mecanismos fisiológicos, neuroendocrinos y conductuales tendientes a neutralizar el efecto de los estresores y restablecer el equilibrio homeostático del

organismo. Este proceso se conoce como respuesta adaptativa de estrés (Selye, 1946; Kyorus y Tsigos, 2009), la cual involucra una redirección de la conducta y la energía.

La respuesta adaptativa de estrés depende del tipo de estímulo, el cual puede ser físico, psicológico o mixto (Dong y cols., 2004); de su intensidad y duración: agudo o crónico, así como de la constitución y estado del organismo (De Wied, 1980). Los estímulos físicos incluyen el desequilibrio del medio ambiente interno del organismo (anoxia o hipoglucemia); pero también pueden ser condiciones extremas, como el frío o el calor. Los estresores psicológicos son estímulos que afectan las emociones, provocan miedo, ansiedad o frustración; mientras que los estresores mixtos son estímulos nocivos, como el ejercicio extenuante y las enfermedades (Levine y cols., 1972). En función a su duración, el estrés se considera agudo cuando el tiempo de exposición a un estresor es de unos cuantos minutos a unas horas; mientras que el estrés crónico implica la exposición prolongada al mismo, en un tiempo mayor de seis horas y se extiende hasta varios días, semanas, meses o años (Justel y cols., 2009).

### **1.1 Sistema de estrés**

La respuesta adaptativa de estrés es regulada por el sistema de estrés, el cual activa una serie de mecanismos conductuales y fisiológicos que facilitan el proceso de adaptación de los organismos para incrementar su capacidad de supervivencia, ante condiciones ambientales adversas (Charmandari y cols., 2005). Este sistema está constituido por estructuras neuroendocrinas que forman parte del sistema nervioso central (SNC) y por componentes periféricos (Chrousos, 2002). Los componentes centrales del sistema de estrés incluyen a las

neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, encargadas de producir y secretar a la hormona liberadora de corticotropinas (CRH), y a las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* (LC), ubicado en el tronco cerebral, encargadas de producir y liberar norepinefrina (NE) (Charmandari y cols., 2005; Mucio-Ramírez, 2007). Los componentes periféricos incluyen a la hipófisis y la glándula suprarrenal del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) e involucra al sistema eferente simpático adrenomedular, que estimula la secreción de catecolaminas, y componentes adrenocorticales, involucrados con la secreción de glucocorticoides (Chrousos y Gold, 1992; Habib y cols, 2001; Chrousos, 2002; Charmandari y cols., 2005). De entre estas estructuras, resalta la función del hipotálamo, el cual forma parte del SNC y es el encargado de integrar toda la información concerniente al estímulo estresante. Además modula una enorme variedad de procesos fisiológicos y metabólicos a través de la activación del sistema nervioso simpático (SNS) y el eje HHA (figura 1) (Justel y cols., 2009), principales reguladores de las funciones homeostáticas de los animales.

El SNS proporciona un mecanismo fisiológico que permite una rápida regulación de funciones vitales del organismo como la función cardiovascular, respiratoria, gastrointestinal, renal y endocrina (Tsigos y Chrousos, 2002; Charmandari y cols., 2005). Asimismo ofrece una contribución humoral durante la respuesta de estrés, proporcionando la mayor parte de epinefrina (E) y NE desde la médula adrenal hacia la circulación (Charmandari y cols., 2005; Kyrou y Tsigos, 2009). Además el SNS junto con el LC del tronco cerebral forma el sistema LC-NE (*locus coeruleus*-norepinefrina) del SNS, este sistema es activado por el estrés. Al producirse una situación de estrés, el LC-NE del SNS estimula la secreción de NE

hacia diferentes áreas del cerebro como son: la corteza cerebral, el sistema límbico, el hipotálamo, el tronco cerebral y la médula espinal (Ulrich-Lai y Herman, 2009). Al mismo tiempo, el LC estimula la secreción de NE y E desde la médula adrenal hacia la circulación lo que da como resultado un incremento en la frecuencia cardíaca, el flujo sanguíneo y el metabolismo, con la finalidad de proporcionar oxígeno y glucosa hacia el cerebro, corazón y músculos; todo en cuestión de segundos (Johnson y cols., 1992; Mucio-Ramírez, 2007), para emprender la respuesta de “lucha o huida”. Además, la NE junto con la E, estimula la secreción de CRH del hipotálamo a través de conexiones neuronales recíprocas entre las neuronas noradrenérgicas del LC/NE y las neuronas del PVN del hipotálamo (Charmandari y cols., 2005), las cuales son estimuladas mediante receptores CRH tipo 1 y receptores  $\alpha_1$ -noradrenérgicos, respectivamente (Tsigos y Chrousos, 2002).

La CRH es el principal regulador hipotalámico del eje HHA (Charmandari y cols., 2005), el cual forma parte del sistema neuroendocrino que controla las reacciones de estrés y regula varios procesos del organismo como son: la digestión, el metabolismo, el sistema inmune, las emociones y la conducta sexual. Los componentes principales del eje HHA son el hipotálamo, la hipófisis y la glándula suprarrenal (figura 1). El eje HHA tiene un papel importante en la capacidad que poseen los organismos para hacer frente a una situación de amenaza. En respuesta al estrés, las neuronas parvocelulares del PVN del hipotálamo se activan rápidamente e incrementan su actividad, lo que provoca un incremento en la amplitud y sincronización en la liberación pulsátil de CRH hacia los capilares del sistema porta hipofisiario (Charmandari y cols., 2005). A través de

los cuales llega a los corticotropos de la hipófisis anterior, que poseen receptores específicos para la CRH (Tsigos y Chrousos, 2002; Mucio-Ramírez, 2007). Los corticotropos responden sintetizando adrenocorticotropina (ACTH), que es liberada hacia el torrente sanguíneo y transportada hasta la corteza de la glándula suprarrenal, en donde estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides, cortisol (en humanos) y corticosterona (en roedores).

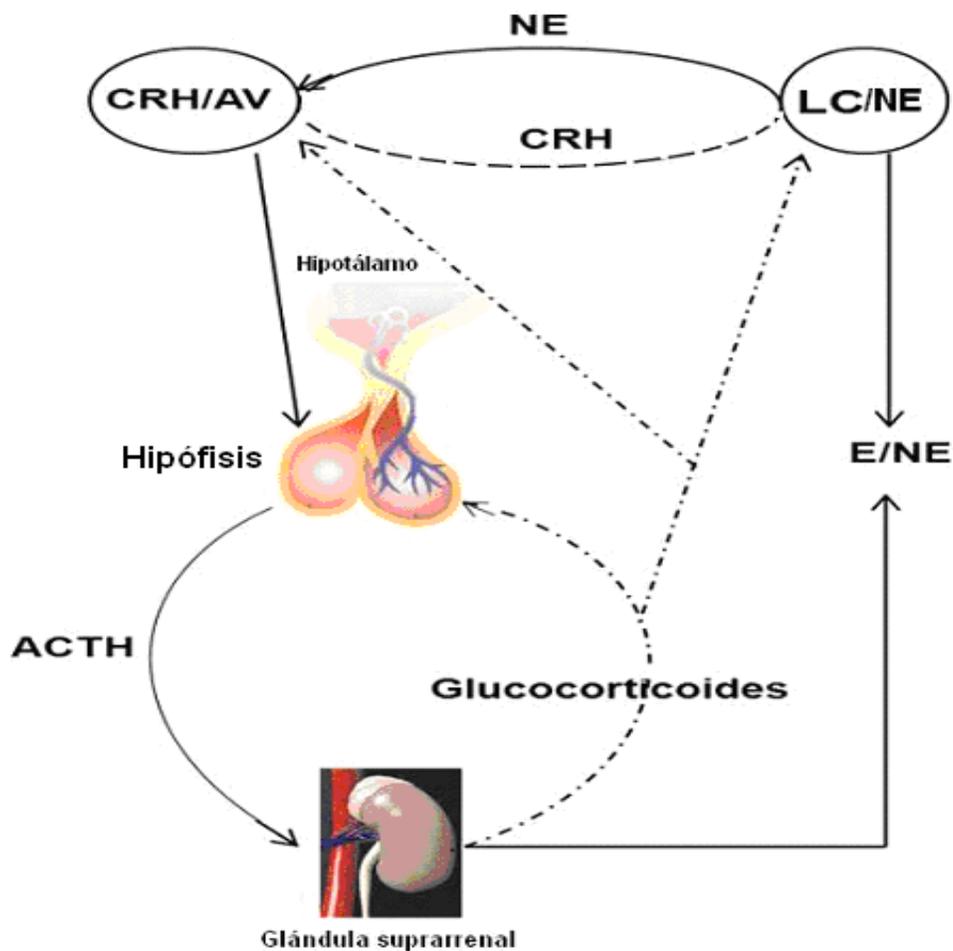


Figura 1. El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y el sistema nervioso simpático (SNS) son los reguladores biológicos de la respuesta de estrés. La regulación central de esta respuesta involucra a componentes del sistema límbico, del hipotálamo y tronco cerebral. Las líneas sólidas representan eventos estimulantes, las líneas punteadas representan eventos inhibitorios de los glucocorticoides. Esquema adaptado de Johnson y cols., 1992.

En la corteza de la glándula suprarrenal, la síntesis de glucocorticoides se inicia a partir del colesterol obtenido de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) del plasma vía la endocitosis. En las mitocondrias, la enzima citocromo P450 denominada colesterol desmolasa, hidroxila la cadena lateral del colesterol y la rompe; para formar pregnenolona. En el retículo endoplásmico liso, la pregnenolona es convertida en progesterona mediante la deshidrogenación e isomerización de un doble enlace mediante la acción de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD). Posteriormente, la progesterona es convertida en 11-desoxicorticosterona por acción de la  $21\alpha$ -hidroxilasa; la cual se hidroxila aún más para formar corticosterona (figura 2) (McEwen, 2007; Sharpley, 2009).

Los glucocorticoides son los efectores finales del eje HHA y participan en el control de la homeostasis del organismo y durante la respuesta de estrés (Tsigos y Chrousos, 2002). Los glucocorticoides inhiben directamente la secreción de CRH del hipotálamo y suprimen la secreción de ACTH en la hipófisis ejerciendo retroalimentación negativa para controlar la actividad del eje HHA (figura 1) (Keller-Wood y Dallman, 1984; Charmandari y cols., 2005). De esta forma, disminuyen los glucocorticoides a sus niveles basales y limita el tiempo de exposición del organismo a estas hormonas, minimizando los efectos catabólicos, lipogénicos, antireproductivos e inmunosupresivos de estas hormonas (Charmandari y cols, 2005). Los glucocorticoides, son hormonas esteroideas que participan en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas. En situaciones de estrés crónico, los glucocorticoides tienen efectos a largo plazo en las conductas adaptativas del organismo, incluyendo la función cardiovascular,

muscular, en el metabolismo, el sistema inmune y en la función reproductiva (Johnson y cols., 1992).

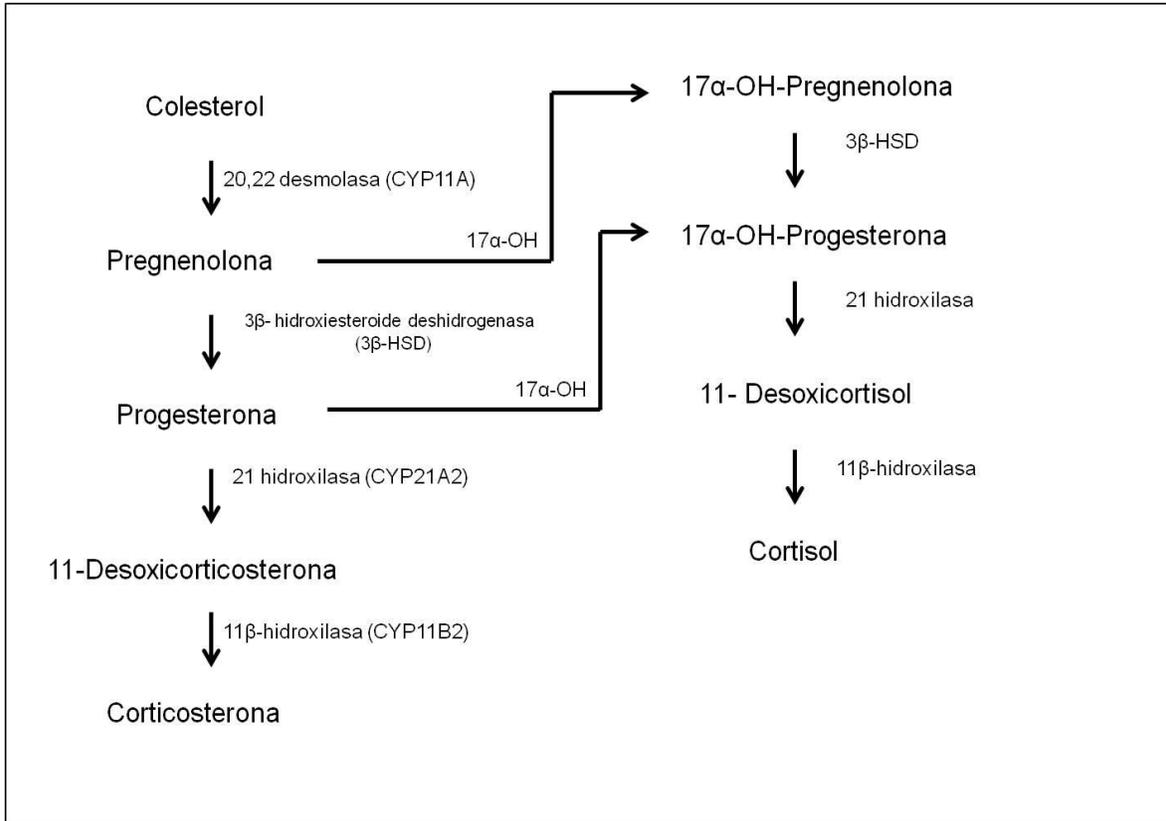


Figura 2. Síntesis de corticosterona y cortisol en las células de la corteza de las glándulas suprarrenales.

Además, los glucocorticoides junto con la E y NE, inhiben la captación de glucosa, el almacenamiento de los ácidos grasos, la síntesis de proteínas y estimulan la liberación de sustratos energéticos, incluyendo glucosa, aminoácidos y ácidos grasos libres en el músculo, el tejido graso y en el hígado. Además, pueden provocar alteraciones metabólicas (miopatía, fatiga y cambios en la glucosa) y cardiovasculares (hipertensión), que comprometen el crecimiento y la función reproductiva (Jonhson y cols., 1992).

Diversos estudios han demostrado que el estrés afecta la función reproductiva masculina. Se ha demostrado que el incremento en la concentración de glucocorticoides durante la respuesta de estrés, inhibe la secreción de testosterona; altera el desarrollo de la espermatogénesis, la producción de espermatozoides y puede inducir apoptosis en las células testiculares (Yazawa y cols., 1999). La apoptosis en las células germinales del epitelio seminífero, puede conducir a la detención en el desarrollo y diferenciación de espermatoцитos y espermátidas redondas (Said y cols., 2004), conduciendo a una disminución en la producción de espermatozoides maduros, lo que puede causar problemas en la reproducción masculina. Por ello es importante describir las funciones que se llevan a cabo en los testículos y epidídimo, particularmente en lo referente al desarrollo de la espermatogénesis, la esteroidogénesis y el proceso de maduración de los espermatozoides. Para facilitar la comprensión de algunos de los procesos de la función reproductiva masculina, que pueden ser alterados durante la respuesta de estrés.

## **1.2 Función testicular en el adulto**

Los testículos o gónadas masculinas constan de cientos de túbulos seminíferos contorneados muy plegados, revestidos por el epitelio seminífero que contiene a las células germinales y a las células de Sertoli. Los testículos tienen como funciones principales la producción de espermatozoides (espermatogénesis) y la producción de andrógenos (esteroidogénesis), en particular de testosterona, aunque también secretan pequeñas cantidades de estrógenos, las cuales ocurren en diferentes compartimentos del testículo (Barret y cols., 2013).

### **1.2.1 Espermatogénesis**

La espermatogénesis es el proceso de proliferación y de diferenciación celular encargado de producir espermatozoides haploides a partir de células diploides indiferenciadas (células tronco o espermatogonias). La espermatogénesis se lleva a cabo en el epitelio seminífero que reviste a los túbulos seminíferos de manera continua, en estrecha asociación con las células de Sertoli (Clermont, 1972). Este proceso depende del estímulo producido por las gonadotropinas de la hipófisis anterior: las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) (Hess y de Franca, 2008).

La espermatogénesis está dividida en etapas que progresan de manera muy precisa en el tiempo y está organizada de manera cíclica (Leblond y Clermont, 1952). En especies como la rata, la espermatogénesis está dividida en XIV etapas o asociaciones celulares que constituyen el ciclo del epitelio seminífero (de Kretser y Kerr, 1994), el cual tiene una duración de 48 a 52 días e involucra cuatro ciclos y medio del ciclo del epitelio seminífero (figura 3) (Clermont, 1972). La espermatogénesis es un proceso continuo y depende tanto de factores intrínsecos (células de Sertoli y germinales) como extrínsecos al testículo (producción de andrógenos) (Hess y de Franca, 2008).

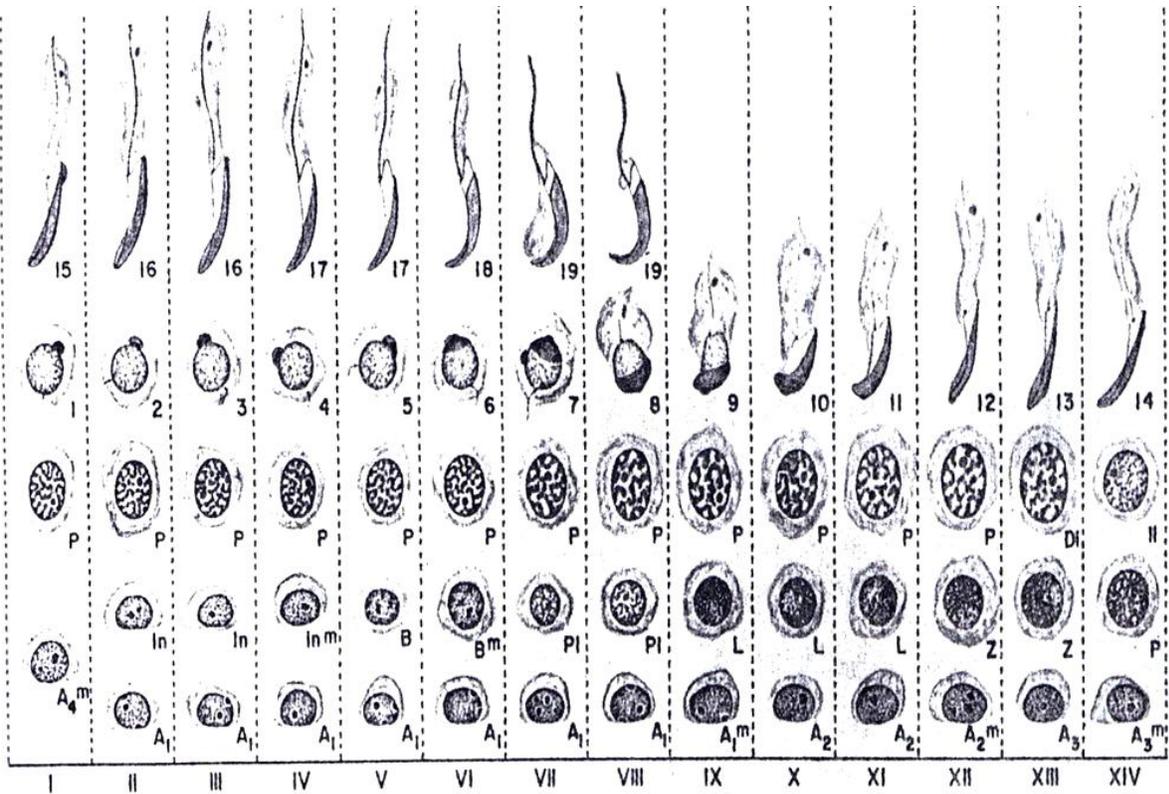


Figura 3. Diagrama del ciclo del epitelio seminífero de la rata. En las filas horizontales se observa el desarrollo de las células germinales. Nomenclatura:  $A_{(1-4)}$ : espermatogonias tipo A; In: espermatogonias intermedias; B: espermatogonias tipo B; PI, L, Z, P y Di: espermatocitos primarios en preleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno y en paquiteno diploide, respectivamente; II: espermatocito secundario. Las etapas de la espermiogénesis (1-19) se indican junto a cada espermátida. Tomado de O'Donnell y cols., 2006.

### 1.2.2 Fases de la espermatogénesis

Las células germinales primordiales (espermatogonias tipo AO) llegan a la gónada masculina durante el desarrollo embrionario y se replican por múltiples mitosis para formar más espermatogonias tipo A. Estas células se encuentran en los cordones sexuales y comienzan a dividirse mitóticamente hasta la pubertad, lo que marca el inicio de la espermatogénesis.

La espermatogénesis se divide en cuatro etapas principales: espermatocitogénesis, meiosis, espermiogénesis y espermiación.

1) La espermatocitogénesis inicia con las espermatogonias, células germinales diploides ( $2n$ ) indiferenciadas ubicadas en la base de la lámina basal del túbulo seminífero. Existen cuatro clases de espermatogonias: espermatogonias A indiferenciadas [ $A_s$  simple,  $A_{pr}$  pareada,  $A_{al}$  alineada]; espermatogonias A diferenciadas ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ ); espermatogonias intermedias ( $I_n$ ) y espermatogonias B (Russell y cols., 1990).

Las espermatogonias indiferenciadas experimentan varias divisiones mitóticas para producir más espermatogonias, algunas de estas maduran y se diferencian en espermatogonias A diferenciadas, las cuales se dividen mitóticamente hasta convertirse en espermatogonias intermedias y, posteriormente, en espermatogonias B. Éstas últimas pierden todo contacto con la lámina basal del túbulo seminífero, para convertirse en espermatocitos primarios en preleptoteno ( $2n$ ), los cuales inician la primera división meiótica.

2) Meiosis I, la profase de la primera división meiótica se inicia con la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) en espermatocitos primarios en preleptoteno, los cuales atraviesan la barrera hematotesticular para trasladarse hacia el compartimento adluminal del epitelio seminífero. En este compartimento, los espermatocitos primarios inician la profase, la cual se divide en: leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno. Durante este tiempo se lleva a cabo: la sinapsis cromosómica (apareamiento de cromosomas homólogos); la formación del complejo sinaptonémico, formado por un par de cromosomas homólogos, denominados bivalentes y la formación de los nódulos de recombinación, sitio en el que se produce el intercambio o entrecruzamiento del material genético. En la metafase, los cromosomas bivalentes, se colocan en el plano ecuatorial de las

células, y durante el anafase, los cromosomas homólogos se separan. Durante la telofase hay una reducción en el número de cromosomas y la subsecuente formación de dos células hijas, denominadas espermatocitos secundarios. Estas células inician rápidamente la segunda división meiótica, durante la cual se forma una membrana nuclear alrededor de cada par de cromosomas hijos para formar cuatro núcleos haploides, enseguida, el citoplasma se divide y se originan cuatro espermatidas redondas (Leblond y Clermont, 1952; de Kretser y Kerr, 1994; Hess y de Franca, 2008), cada una con un número haploide de 23 cromosomas, las cuales se transformarán en espermatozoides (de Kretser y Kerr, 1998), durante la espermiogénesis.

Las espermatidas están interconectadas entre sí mediante puentes citoplasmáticos que mantienen sincronizado su crecimiento. El ARNm y ribosómico continúan siendo transcritos desde los autosomas haploides y no hay transcripción dentro de la espermatida.

3) Espermiogénesis, en esta etapa las espermatidas se transforman en espermatozoides; el proceso puede tomar de 1 a 3 semanas, dependiendo de la especie. El proceso de diferenciación de espermatida a espermatozoide involucra varios eventos citológicos descritos a continuación e ilustrados en la figura 4:

a) Fase de Golgi, esta fase se caracteriza por la formación de gránulos pro-acrosómicos derivados del aparato de Golgi adyacentes al núcleo de la espermatida redonda, formados dentro de vesículas que contienen glicoproteínas y enzimas que digieren proteínas y carbohidratos complejos.

b) Fase del acrosoma, los gránulos se fusionan para formar el acrosoma que se alarga, se superpone y se extiende sobre la superficie nuclear. Esta

estructura modificada recibe el nombre de casquete o capuchón acrosómico, el cual es un organelo similar a un lisosoma, contiene enzimas como: acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas que participan en la penetración de la zona pelúcida del ovocito, al momento de la fecundación.

La porción de la envoltura nuclear que se encuentra por debajo del capuchón pierde sus poros y se engrosa. Durante este tiempo, inicia la reducción progresiva en el tamaño del núcleo y la condensación de la cromatina asociada con la sustitución de histonas por protaminas. Los cambios producidos en la forma del núcleo durante la espermiogénesis, son conducidos por la matriz nuclear, compuesta por una red fibrosa de proteínas, ácido ribonucleico (ARN), azúcares y una lámina con estructuras porosas nucleares. En esta fase el núcleo condensado se aplana y se alarga. El núcleo y su acrosoma se mueven hacia una posición contigua anterior a la membrana plasmática y el citoplasma es desplazado hacia atrás. Al mismo tiempo, los microtúbulos se organizan en una vaina cilíndrica, llamada manchette, que se extiende desde el borde posterior del acrosoma hacia el lado posterior de la espermatida.

c) Formación del flagelo, este se desarrolla de los centriolos longitudinal y proximal, los cuales migran hacia el polo posterior de la espermatida. La formación del filamento axial inicia del centriolo longitudinal. Al mismo tiempo, se forma una hendidura en la membrana celular, conocida como canal citoplasmático, que rodea la porción proximal del filamento axial. Enseguida, los centriolos y el filamento axial se colocan en el polo posterior del núcleo para formar la pieza de conexión o región del cuello. A partir de los centriolos adheridos al núcleo surgen nueve fibras gruesas que se extienden en forma de fibras densas externas que cubren a los

microtúbulos del axonema. El axonema, estructura interna axial del flagelo, está compuesto por nueve pares de microtúbulos periféricos que rodean a dos microtúbulos centrales; los cuales se extienden en toda la longitud del flagelo. Mientras el flagelo se va formando en la espermatida en elongación, las mitocondrias, localizadas en la periferia, se organizan de manera helicoidal alrededor de la base del flagelo para conformar la pieza intermedia del espermatozoide. Finalmente, la pieza principal se extiende hasta la parte final del flagelo cubierto por una vaina fibrosa que rodea a las fibras densas externas.

e) Espermiación, conforme la espermiogénesis avanza, la espermatida se va desplazando hacia el lumen del túbulo y al finalizar la elongación, el citoplasma de las células de Sertoli se retrae de la cabeza del espermatozoide, retirándole el citoplasma y se forma la gota citoplasmática o cuerpo residual que contiene restos citoplasmáticos (Kerr y cols., 2006).

Los espermatozoides son células especializadas, adaptadas para el movimiento y para transferir su ADN al óvulo. En términos generales, los espermatozoides de los mamíferos constan de: una cabeza que contiene un núcleo haploide y la cromatina, completamente condensada; por el acrosoma, ubicado en la superficie del núcleo, rodeado por una membrana que contiene enzimas hidrolíticas; por un flagelo compuesto por un axonema, componente motor, rodeado por fibras externas densas; por mitocondrias ubicadas en la parte intermedia del flagelo y por la parte posterior de la cola, compuesta por una vaina fibrosa que envuelve a las fibras densas externas (figura 4) (Eddy, 2006).

Tanto el flagelo como la cabeza están cubiertos por la membrana plasmática que contiene un citoplasma escaso. A pesar de que los

espermatozoides muestran estas características generales, existen diferencias en cuanto a tamaño y forma de la cabeza, longitud y tamaño del flagelo entre las diferentes especies de mamíferos.

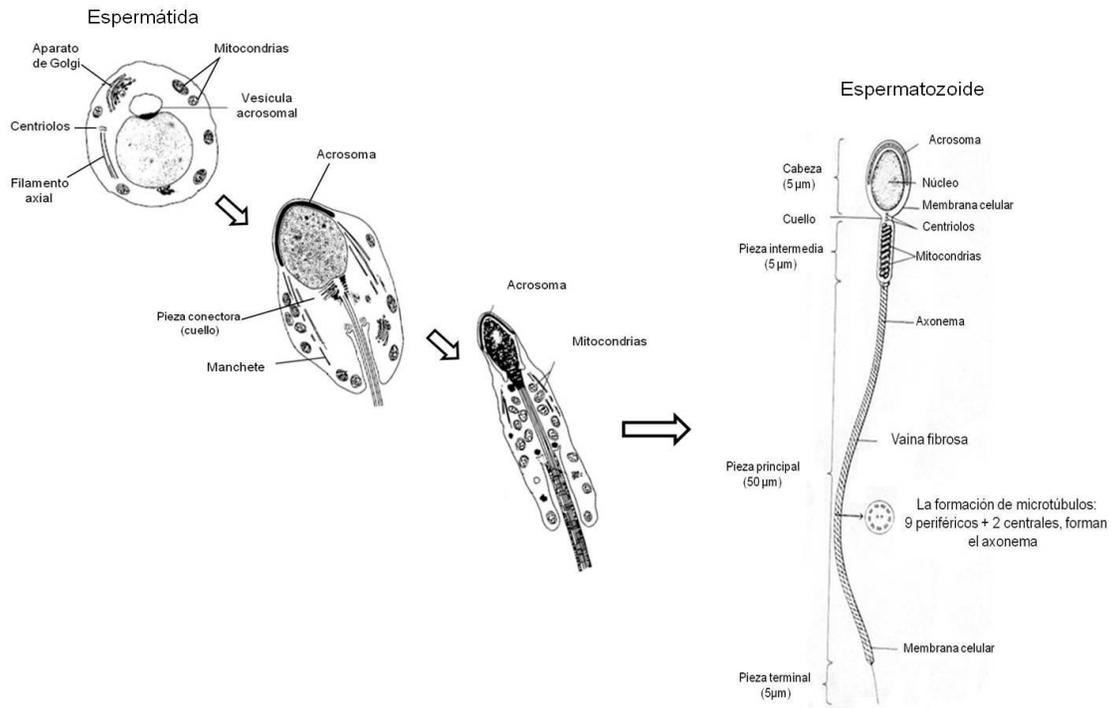


Figura 4. Ilustra los principales eventos citológicos involucrados en la diferenciación de espermátida redonda a espermatozoide. Esquema adaptado de Kerr y cols., 2006.

### 1.3 Esteroidogénesis

La testosterona es el principal andrógeno secretado por los testículos y es un factor importante para el desarrollo de la espermatogénesis así como para el proceso de maduración de los espermatozoides durante su paso por el epidídimo. Esta hormona se sintetiza a partir del colesterol en las células de Leydig, ubicadas en el compartimento intersticial de los testículos. La síntesis de testosterona está bajo el control de la liberación pulsátil de la LH, la cual a su vez

es controlada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) del hipotálamo (Stocco y McPhaul, 2006).

La LH estimula la biosíntesis de testosterona en las células de Leydig unos minutos después de que la LH interacciona con receptores específicos, acoplados a proteínas G, ubicados en la membrana plasmática de dichas células (Dufau, 1997; Ascoli y cols., 2002; Stocco y McPhaul, 2006). El complejo LH-Receptor (LH-R) inicia una cascada de señalización que activa a la adenilato ciclasa (AC), que promueve la formación de Adenosina 3'5'-monofosfato cíclico (AMPc) intracelular y la activación de la proteína cinasa A (PKA) (Stocco y McPhaul, 2006), conduciendo así a la disociación de la subunidad catalítica (Griffin y Wilson, 2003).

El AMPc activa a la enzima colesterol éster hidrolasa requerida para la formación de colesterol libre. Éste es un paso limitante en la síntesis de testosterona debido a que requiere de una serie de pasos para transportar el colesterol libre a la membrana mitocondrial interna, en donde se lleva a cabo la conversión del colesterol en pregnenolona. El AMPc induce la liberación de ácido araquidónico a partir de fosfolípidos intracelulares y araquidonil-CoA por acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y una tioesterasa acyl-CoA, conocida como ARTIST (ácido araquidónico relacionado con la tioesterasa involucrada con la esteroidogénesis). La liberación del ácido araquidónico y la conversión de uno o más metabolitos son requeridos para la biosíntesis *de novo* de esteroides. La combinación entre la actividad de la PKA y los metabolitos del ácido araquidónico dan como resultado la síntesis *de novo* de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda, conocida

como StAR, esta proteína facilita el transporte del colesterol desde el espacio intracelular hasta la membrana mitocondrial interna.

Las células de Leydig utilizan dos vías diferentes en la síntesis de andrógenos (figura 5): la vía  $\Delta 4$  (delta 4) que se encuentra en la mayoría de los roedores incluyendo la rata y el ratón y la vía  $\Delta 5$  (delta 5) que se encuentra en perros, conejos, humanos y primates. La síntesis de testosterona inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona; por acción de la enzima citocromo P450<sub>scc</sub> (enzima que escinde la cadena lateral del colesterol), localizada en la membrana mitocondrial interna. La pregnenolona, si se utiliza la vía  $\Delta 4$ , es convertida en progesterona por la enzima  $3\beta$ -HSD y, posteriormente, es convertida a  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona e inmediatamente a androstendiona, por acción de la P450  $17\alpha$ -hidroxilasa/ $17,20$  liasa.

Si se utiliza la vía  $\Delta 5$ , la pregnenolona es convertida en  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona por la enzima P450  $17\alpha$ -hidroxilasa/ $17,20$  liasa y, posteriormente, a dehidroepiandrosterona (DHEA). Subsecuentemente la DHEA es convertida a androstendiona por la enzima  $3\beta$ -HSD. Finalmente, la androstendiona es convertida en testosterona por la enzima  $17$ -cetoesteroide reductasa. Una vez sintetizada, la testosterona es liberada hacia la circulación; en donde se une a la proteína unidora de andrógenos (ABP) y es transportada hasta las células blanco, y dependiendo de la célula blanco que se trate, la testosterona es convertida en dihidrotestosterona (DHT), por acción de la enzima  $5\alpha$ -reductasa (Stocco y McPhaul, 2006).

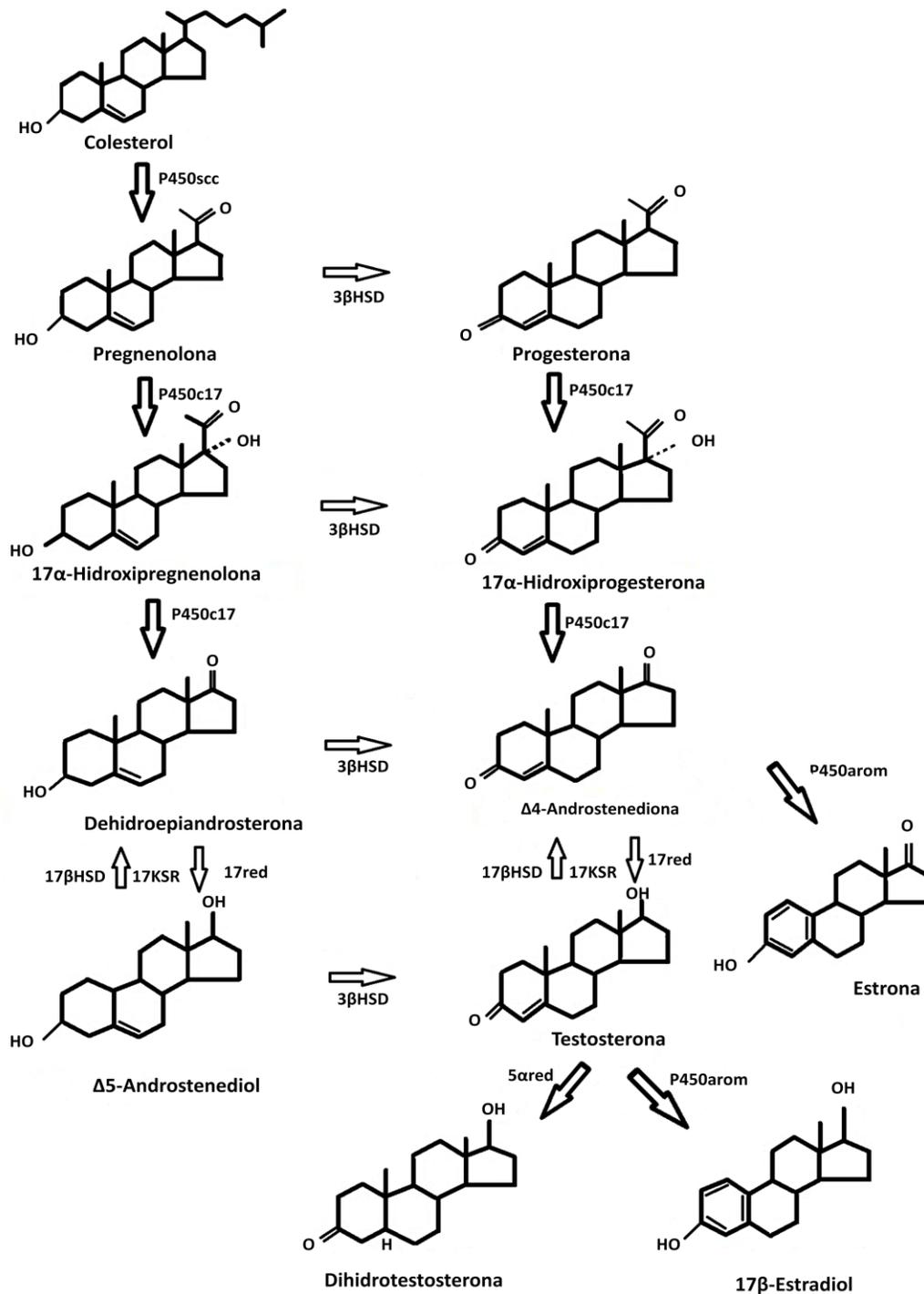


Figura 5. Biosíntesis de esteroides en las células de Leydig. Biosíntesis de testosterona. En la figura se muestran los esteroides precursores y las enzimas involucradas en la conversión enzimática del colesterol a testosterona. Esquema adaptado de Stocco y McPhaul, 2006.

La testosterona producida por las células de Leydig ayuda al desarrollo y conservación de las características sexuales masculinas, como son los órganos sexuales internos y genitales externos; ejerce un papel importante en el funcionamiento de las glándulas sexuales masculinas; en el proceso de maduración de los espermatozoides epididimarios (Robaire y cols., 2006) y mantiene la espermatogénesis en todas sus etapas (Barret y cols., 2013).

#### **1.4 Regulación neuroendocrina de la espermatogénesis**

En los mamíferos la producción de espermatozoides así como la secreción de testosterona, dependen de la liberación pulsátil de las gonadotropinas de la hipófisis: LH y FSH, que, a su vez, son controladas por la GnRH, secretada por el área preóptica media y el núcleo arcuato del hipotálamo. La GnRH es liberada de manera pulsátil a la circulación del sistema portahipofisiario a través de las terminales nerviosas de la eminencia media y es transportada hasta la hipófisis anterior (Jeong y Kaiser, 2006), en donde se une a receptores membranales acoplados a proteínas G ubicados en la membrana de los gonadotropos (Hawes y Conn, 1993).

En la hipófisis, la GnRH estimula la síntesis y secreción de FSH y LH, las cuales son liberadas a la circulación sistémica y transportadas hasta los testículos (Jeong y Kaiser, 2006; Shalet, 2009), en donde estimulan la secreción de testosterona y promueven un microambiente testicular en donde prevalecen altas concentraciones de esta hormona, las cuales son necesarias para el desarrollo normal de la espermatogénesis.

Las células de Sertoli tienen receptores específicos tanto para la FSH como para la testosterona. Estas células forman parte del epitelio seminífero y junto con

la testosterona producida por las células de Leydig, ejercen un papel importante en la regulación de la espermatogénesis. La FSH ejerce su acción a través de receptores membranales, acoplados a proteínas G, y tiene un papel importante en la estimulación de la síntesis de ADN, en la mitosis de las espermatogonias B, en la meiosis de los espermatoцитos primarios en fase de preleptoteno y, junto con la testosterona, estimula la capacidad secretora de las células de Sertoli, para proveer de nutrientes, proteínas y factores de crecimiento necesarios para el desarrollo de las células germinales (O'Donnell y cols., 2006). En el epitelio seminífero, las células germinales necesitan estar en contacto directo con las células de Sertoli para sobrevivir, este contacto se mantiene mediante puentes citoplasmáticos, los cuales son dependientes de andrógenos.

Las células de Sertoli forman uniones estrechas entre células de Sertoli adyacentes cerca de la lámina basal, formando la barrera hematotesticular que impide el paso de grandes moléculas provenientes del espacio intersticial y divide el túbulo en dos compartimentos principales: el compartimento basal (cerca de la lámina basal) y el compartimento adluminal (cerca de la luz tubular). La testosterona atraviesa esta barrera con facilidad y junto con la FSH ejerce un estricto control sinérgico en la liberación de los espermatozoides del epitelio seminífero durante la espermiación (McLachlan y cols., 2002).

Por otro lado, la FSH estimula la producción de varias proteínas en las células de Sertoli, como la ABP e inhibina. Esta última actúa de manera directa sobre la hipófisis anterior para regular la secreción de FSH. Mientras que la testosterona regula la secreción de LH al actuar directamente sobre la hipófisis anterior e inhibir la secreción de GnRH en el hipotálamo (figura 6) (Shalet, 2009).

En general, la testosterona es esencial para la espermatogénesis, pero la participación conjunta de las gonadotropinas y los andrógenos controlan su inicio y mantenimiento en todos los mamíferos estudiados (O'Donnell y cols., 2006). Asimismo, la testosterona junto con la FSH previene la apoptosis en las células germinales, debido a que actúan como factores de supervivencia (Henriksen y cols., 1996; Shetty y cols., 1996). Además de esto, la testosterona es necesaria para el mantenimiento de la estructura y función del epidídimo.

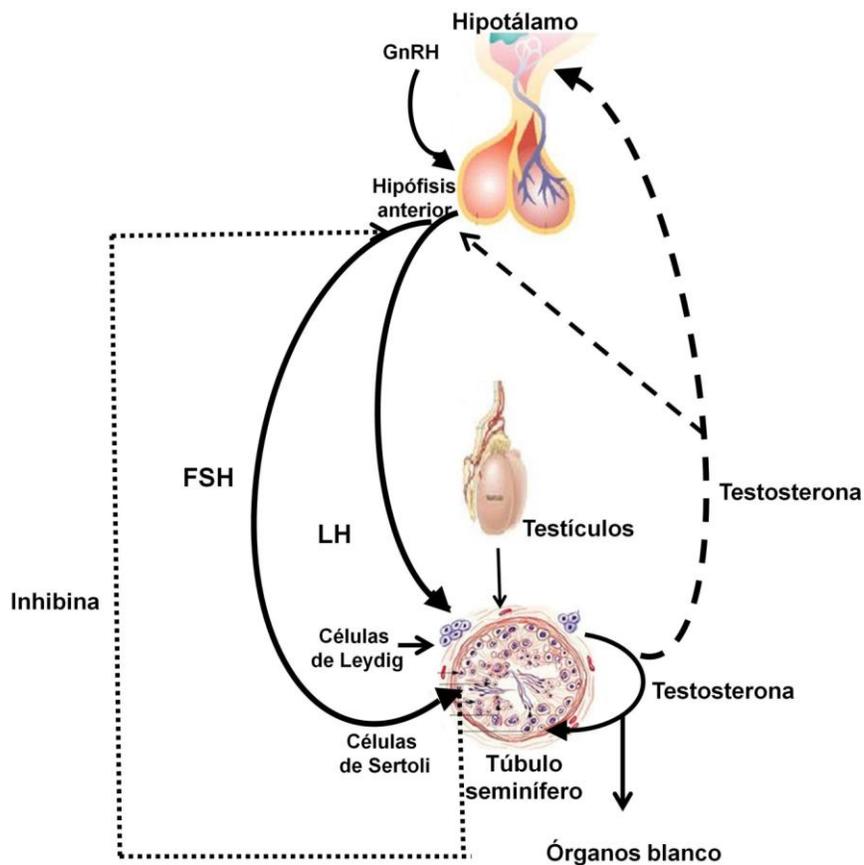


Figura 6. Diagrama que ilustra la regulación hormonal de la espermatogénesis. Las hormonas producidas por el hipotálamo y la hipófisis ejercen una influencia positiva (líneas sólidas) en las funciones testiculares: exocrina y endocrina. Debido al proceso de retroalimentación negativa, tanto la testosterona como la inhibina, producidas por las células de Leydig y de Sertoli, respectivamente, ejercen efectos inhibitorios (líneas punteadas) en la secreción de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), la FSH (hormona estimulante del folículo) y LH (hormona luteinizante). Esquema adaptado de O'Donnell y cols., 2006.

## 1.5 Maduración espermática

Los espermatozoides recién formados son liberados en el lumen del epitelio seminífero y son transportados desde los túbulos seminíferos hacia los túbulos rectos, que forman una red de conductos, denominada red testicular (*rete testis*). Enseguida, los espermatozoides son transportados fuera del testículo a través de los conductos eferentes, que desembocan en el epidídimo, en donde continuarán con su proceso de maduración (Robaire y cols., 2006). Los espermatozoides recién liberados de los testículos son completamente inmóviles y no tienen la capacidad de fertilizar al óvulo. Estas habilidades las adquieren durante su paso por el epidídimo (Dacheux y Dacheux, 2014).

Durante su paso por el epidídimo, los espermatozoides experimentan cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos característicos, como parte del proceso de maduración, a través de una organizada interacción entre el epitelio epididimario, los componentes del fluido luminal epididimario y los espermatozoides en proceso de maduración (Klinefelter, 2002). Las modificaciones involucradas en la maduración espermática, incluyen: la adquisición de la movilidad progresiva, cambios en la membrana plasmática (Fernández y cols., 2007) y la habilidad para fertilizar al óvulo. Además, el epidídimo se encarga del transporte, protección, concentración y almacenamiento de los espermatozoides (Hermo y Robaire, 2002). Todas estas funciones son favorecidas por un ambiente altamente especializado creado en el interior del conducto epididimario (Franca y cols., 2005).

## 1.6 Epidídimo

El epidídimo es un órgano del sistema reproductor masculino que se ubica a todo lo largo del borde medial del testículo, es un conducto altamente contorneado dividido en cuatro regiones anatómicas y funcionalmente distintas: el segmento inicial, cabeza, cuerpo y cola o cauda (figura 7). El epidídimo presenta tres elementos estructurales bien definidos: el lumen que contiene células espermáticas y fluido epididimario; un epitelio que recubre al lumen; y el tejido extraductal conformado por músculo liso, tejido conectivo, elementos vasculares y nerviosos.

El conducto epididimario está revestido por un epitelio pseudoestratificado compuesto por diversos tipos celulares como son: células principales, basales, apicales, estrechas, claras y halo; cuyas funciones principales son la síntesis y secreción de proteínas, las cuales forman parte importante del fluido luminal epididimario (Robaire y cols., 2006).

Durante su paso por el epidídimo, los espermatozoides se encuentran en contacto directo con el fluido luminal epididimario, el cual es un medio enriquecido modificado, producido por las actividades de secreción/absorción de proteínas y reabsorción de agua por parte de las células epiteliales del epidídimo. Este fluido está compuesto por diferentes tipos de proteínas como: clusterina, lactoferrina, glutatión peroxidasa (GPX), prostaglandinas, glutatión transferasa-S (GST), actina,  $\beta$ -galactosidasa, entre muchas otras; por enzimas, factores de crecimiento, por carnitina, inositol, etc; por diferentes tipos de iones:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{+2}$ , bicarbonato ( $HCO_3$ ) y altas concentraciones de testosterona y DHT (Robaire y cols., 2006;

Dacheux y Dacheux, 2014), creando así un ambiente luminal único necesario para el proceso de maduración de los espermatozoides (Cornwall, 2009).

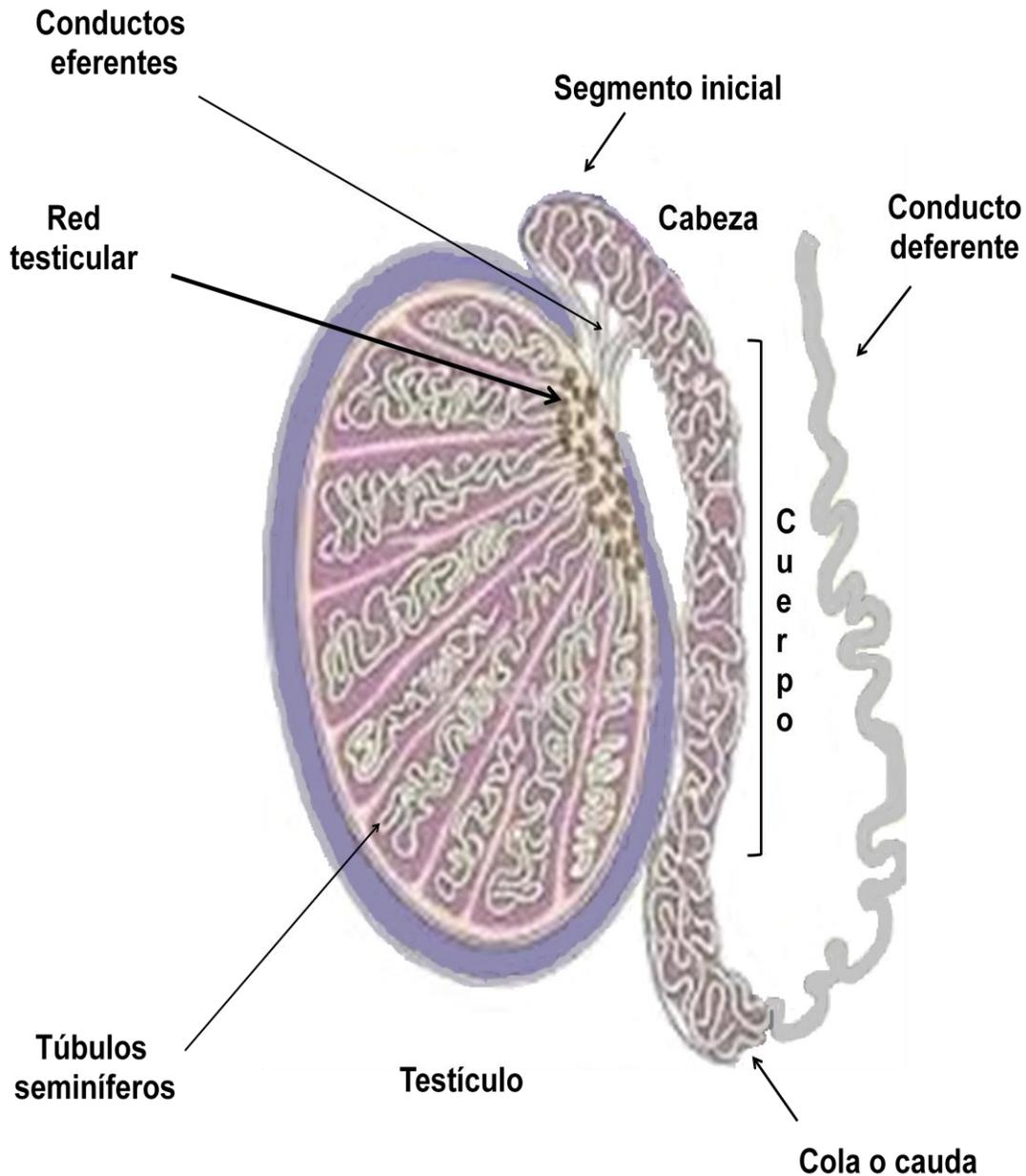


Figura 7. Esquema representativo del epidídimo de la rata. Los testículos y el epidídimo están conectados entre sí a través de la red testicular y los conductos eferentes. El epidídimo, ubicado a todo lo largo del borde medial del testículo, se divide en cuatro regiones principales: segmento inicial, cabeza, cuerpo y cola. Esquema adaptado de Robaire y cols., 2006.

En el epidídimo, los espermatozoides adquieren la habilidad de moverse hacia adelante de manera gradual, conforme avanzan a lo largo del epidídimo, alcanzando la movilidad progresiva al llegar a la región de la cauda (Dacheux y Dacheux, 2014), en donde son almacenados. Se ha propuesto que la movilidad inicia en la cabeza del epidídimo, que es la región con mayor actividad metabólica, debido a que secreta del 70-80% del total de proteínas lumbales epididimarias. La adquisición de la movilidad depende principalmente del AMPc intracelular generado por la AC, que cataliza la conversión de ATP en AMPc, el cual a su vez activa a la PKA, desencadenando la fosforilación de tirosinas en los brazos de dineína (en el orden de nanosegundos), que tienen actividad de ATPasa (Dacheux y Dacheux, 2014). Estas actividades inician una propagación de ondas y el batido flagelar mediante el deslizamiento alternado de microtúbulos en toda la longitud del flagelo (Morisawa, 1994; Dacheux y Dacheux, 2014). La concentración de AMPc intracelular de los espermatozoides incrementa progresivamente desde la región del cuerpo hasta la cauda (Dacheux y Paquignon, 1980; Dacheux y Dacheux, 2014), simultáneamente, con el incremento en la capacidad metabólica y la producción de ATP (Inskeep y Hammerstedt, 1982). Los iones  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  son dos componentes importantes del fluido luminal, debido a que estos controlan directamente la concentración intracelular de AMPc en los espermatozoides epididimarios y, consecuentemente, activan la fosforilación de proteínas y la movilidad (Dacheux y Dacheux, 2014).

La adquisición de la capacidad fertilizante es un proceso que requiere de cambios en la membrana plasmática del espermatozoide, incluyendo: modificaciones en la composición de lípidos, en la distribución de proteínas

intramembranales y en los niveles de glicosilación. Durante este proceso, el espermatozoide adquiere la habilidad de unirse a la zona pelúcida y a la membrana del óvulo (Dacheux y Dacheux, 2014).

La membrana plasmática del espermatozoide, contiene microdominios formados por esteroides, esfingolípidos, glicolípidos, proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) y balsas lipídicas (rafts) (Harder y cols., 1998). Las proteínas integrales de membrana, adquiridas durante la maduración del espermatozoide, se anclan a la membrana plasmática del espermatozoide y se unen al GPI (Frenette y cols., 2005). De esta manera, los espermatozoides adquieren una gran cantidad de proteínas, las cuales son necesarias para la activación de la movilidad y la adquisición de la capacidad fertilizante.

La supervivencia y maduración de los espermatozoides dentro del epidídimo, dependen de altas concentraciones de andrógenos, principalmente de testosterona, la cual es transportada por la ABP hasta las células principales del epitelio epididimario donde es liberada y metabolizada a DHT. Tanto la testosterona como la DHT se unen al mismo receptor androgénico y sus efectos se complementan entre sí. Sin embargo, la testosterona ejerce un papel fundamental en el proceso de maduración de los espermatozoides epididimarios, debido a que la disminución de esta hormona causa pérdida de la movilidad espermática, de la capacidad fertilizante, y muerte (Robaire y cols., 2006).

La producción y maduración de espermatozoides, es un proceso largo y complejo que inicia en la gónada masculina y finaliza en el conducto epididimario (Dacheux and Dacheux, 2014). En el epidídimo, los espermatozoides adquieren la capacidad de moverse progresivamente hacia adelante; sin embargo, no pueden

fertilizar al óvulo. Esta habilidad la adquieren durante su paso por el tracto reproductor femenino, por un proceso conocido como capacitación (Travis y cols., 1998). Cualquier cambio o alteración en este proceso, puede afectar la producción de espermatozoides testiculares así como el proceso de maduración de los mismos, lo que se puede reflejar en problemas en la función reproductiva masculina (de Kretser y cols., 1998).

### **1.7 El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) inhibe al eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG)**

La función reproductiva es una de las principales funciones que son inhibidas durante la respuesta de estrés. En 1946 Hans Selye, sugirió que la exposición crónica a los estresores incrementa la actividad del eje HHA y al mismo tiempo inhibe la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG). Esto se debe a que el estrés estimula la secreción de varios componentes del eje HHA, como la CRH, la ACTH, las  $\beta$ -endorfinas y los glucocorticoides, los cuales ejercen efectos inhibitorios en la actividad del eje HHG en todos sus niveles (figura 8) (Selye, 1946; Charmandari y cols., 2005). El mecanismo por el que el estrés puede inhibir la actividad del eje HHG, involucra los siguientes niveles: en el hipotálamo, la secreción de la GnRH es inhibida directamente por la CRH o indirectamente vía los péptidos opioides endógenos ( $\beta$ -endorfinas principalmente) (Bidzinska y cols., 1993). Al mismo tiempo, los glucocorticoides ejercen efectos inhibitorios en la secreción de GnRH del hipotálamo. En la hipófisis, los glucocorticoides inhiben directamente la secreción de gonadotropinas (Bambino y Hsueh, 1981); a nivel gonadal ejercen efectos inhibitorios directos en la función de las células de Leydig, disminuyendo su respuesta a la LH, a través de la reducción en los receptores

testiculares de LH (LH-R), alterando la secreción de testosterona (Bambino y Hsueh, 1981; Johnson y cols., 1992).

Además, los glucocorticoides pueden alterar la síntesis de esteroides sexuales y causar resistencia a las hormonas esteroides sexuales en sus órganos blanco (Johnson y cols., 1992). De esta manera, el estrés crónico puede provocar un efecto general inhibitorio en la función hipófisis-gónada, mediante la disminución en la secreción de LH y testosterona (figura 8) (Tsigos y Chrousos, 2002).

Se ha propuesto que los glucocorticoides mediante la unión con sus receptores citoplasmáticos, pueden inducir apoptosis en las células de Leydig, disminuyendo así la secreción de testosterona (Gao y cols., 2003). Se ha demostrado que la disminución de testosterona, provoca un aumento en la incidencia de apoptosis en las células germinales del epitelio seminífero de la rata (Russell y Clermont, 1977; Kim y cols., 2001).

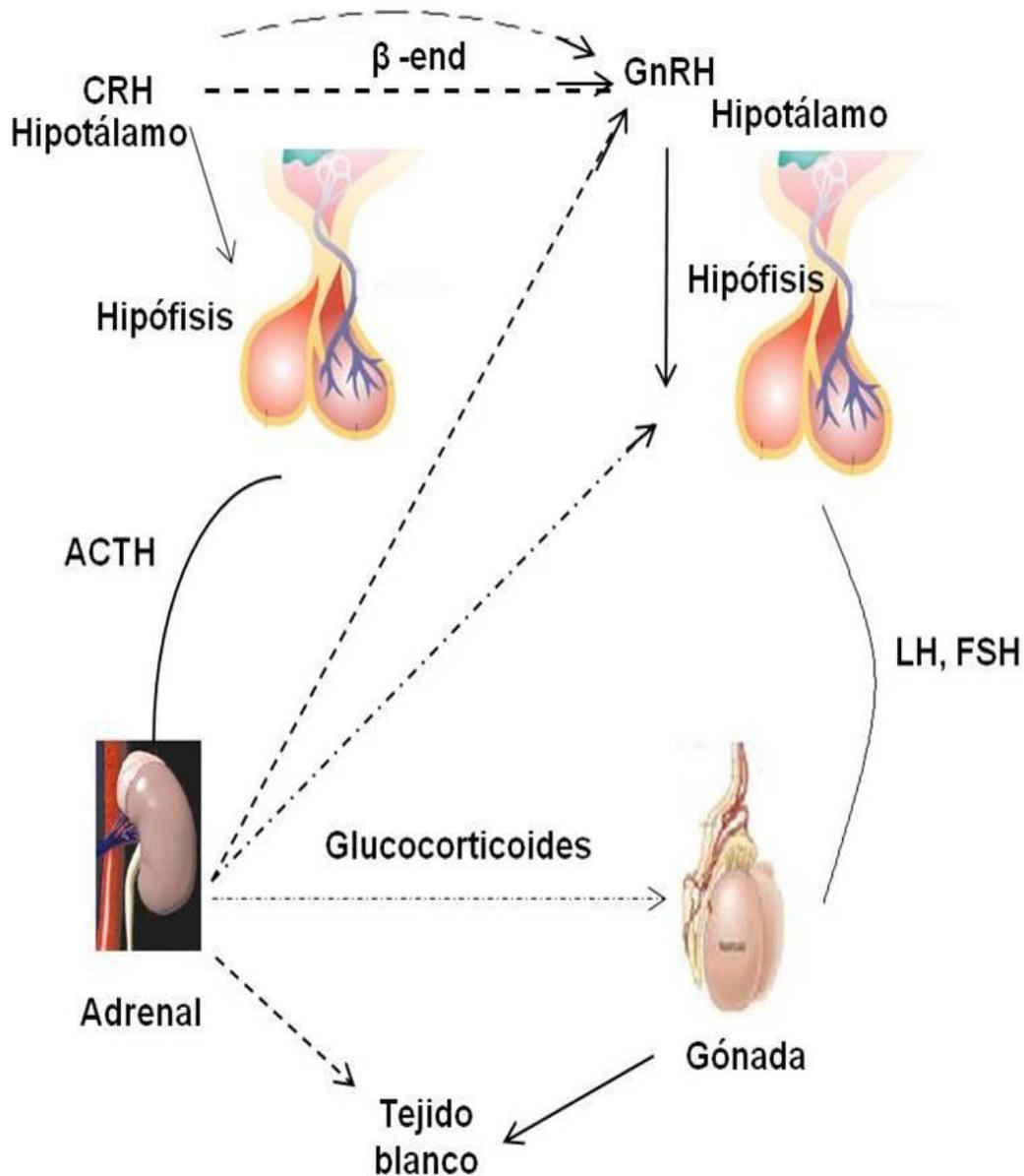


Figura 8. El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y el eje hipotálamo hipófisis gónada (HHG) están relacionados entre sí. Durante el tiempo de exposición al estrés, la actividad de las neuronas encargadas de secretar a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es directamente inhibida por la hormona liberadora de corticotropinas (CRH) o indirectamente por las  $\beta$ -endorfinas producidas por las neuronas pro-opiomelanocortinas (POMC) del núcleo arcuato del hipotálamo. Los glucocorticoides inhiben la actividad del eje HHG en todos sus niveles, incluyendo el hipotálamo, la hipófisis, las gónadas y los tejidos que son blanco de los esteroides sexuales. Las líneas sólidas representan efectos estimulantes, las líneas punteadas representan efectos inhibitorios de los glucocorticoides. Esquema adaptado de Johnson y cols., 1992.

## 1.8 Apoptosis en las células germinales

La apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado, programado genéticamente, que una vez activado, induce la muerte celular a través de cambios bioquímicos y morfológicos característicos, que culminan con la fragmentación de la célula y la eliminación de los cuerpos apoptóticos por fagocitosis (Dubin y Stoppani, 2000). La apoptosis es esencial durante el desarrollo de los organismos y para el mantenimiento de la homeostasis en órganos y tejidos en el organismo adulto (Dubin y Stoppani, 2000; Cascales-Angosto, 2003).

Se han descrito de manera general dos vías de señalización involucradas en la activación de la apoptosis: la vía extrínseca, la cual se inicia por la unión de un ligando con su receptor, ubicado en la superficie de la membrana celular. Y la vía intrínseca, que se puede activar por cambios producidos en la integridad de la membrana mitocondrial (Blatt y Glick, 2001). En la activación de la apoptosis participan moléculas tanto antiapoptóticas como proapoptóticas, encargadas de regular las vías de señalización de la apoptosis, las cuales convergen en un componente en común, la activación de la caspasa 3, la principal caspasa efectora (figura 9) (Hengartner, 2000). La unión del ligando Fas (FasL) con el receptor Fas (vía extrínseca) ubicado en la membrana celular o el incremento en la relación Bax/Bcl-2 (vía intrínseca) en la membrana mitocondrial, inducen la activación de las caspasas 8 y 9, respectivamente; las cuales una vez activadas, rompen y activan a la caspasa 3 (Said y cols., 2004), iniciando el proceso de muerte (figura 9). Las caspasas, tienen un papel importante en la transducción de la señal apoptótica en las células destinadas a morir (Earnshaw y cols., 1999). La

activación de las caspasas ocurre por auto-activación o por acción de otras caspasas (Kim y cols., 2001).

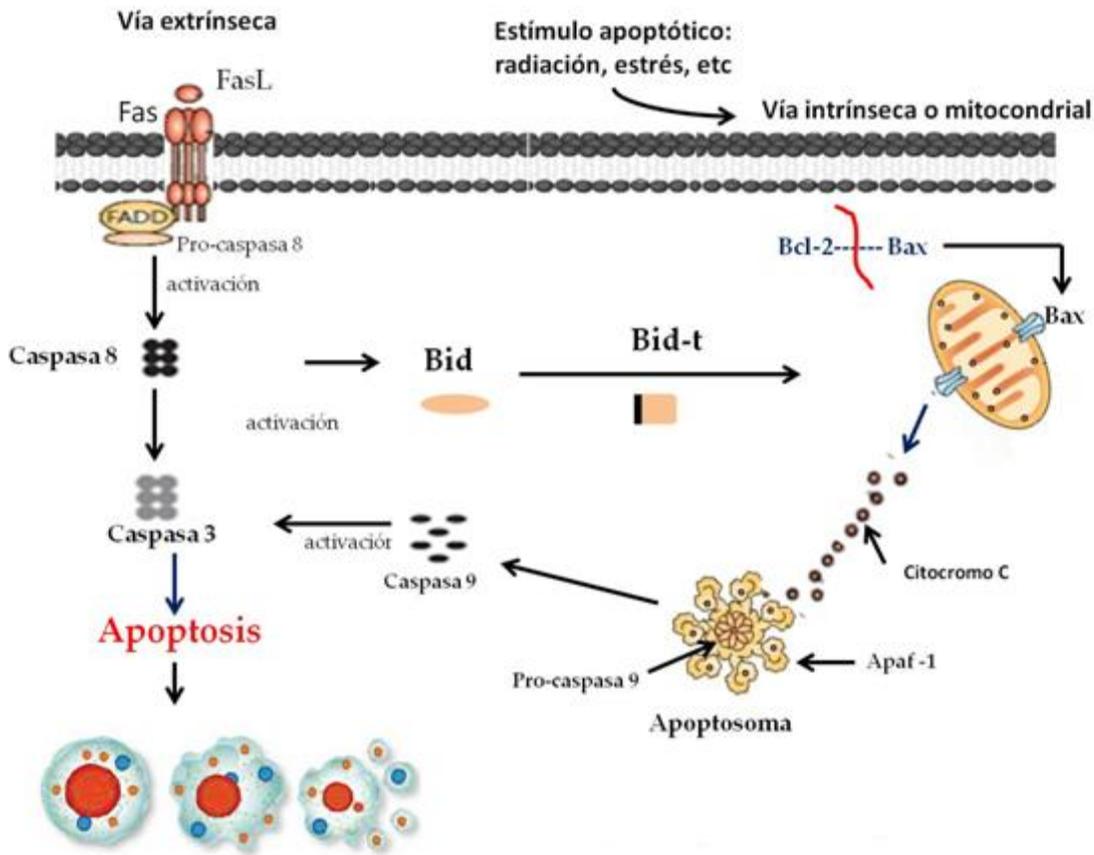


Figura 9. Componentes involucrados en las vías de señalización intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Esquema adaptado de Shaha y cols., 2010.

La apoptosis es un proceso importante que se encuentra involucrado en el desarrollo de la espermatogénesis. Durante este proceso, una gran población de células germinales en desarrollo muere por apoptosis (Pentikainen y cols., 1999; Sinha y cols., 2003), afectando principalmente a las espermatogonias, espermatocitos primarios y espermátidas, en diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero (Lee y cols., 1997; Sinha y cols., 2003). En los testículos, la apoptosis es un proceso importante que cumple con diversas funciones como son: eliminar células germinales que presentan errores genéticos, daño en el ADN o células

producidas en exceso (Lee y cols., 1997; Nakanishi y Shiratsuchi, 2004), para garantizar la calidad de los gametos (Braun, 1998).

No obstante, la apoptosis en los testículos puede ser activada por factores externos como el estrés producido por el frío o el calor, por la exposición a la radiación o bien por estímulos internos como: la disminución de testosterona (Hardy y cols., 2005) o de gonadotropinas (Sinha y cols, 1997), entre otros factores.

## **1.9 Antecedentes**

### **1.9.1 Activación de la apoptosis en las células testiculares por efecto del estrés agudo**

Diversos factores externos pueden activar la apoptosis en las células testiculares, particularmente el estrés producido por la exposición al calor o al frío, ambos estresores pueden incrementar la incidencia de apoptosis en las células testiculares. Se han diseñado modelos experimentales en donde exponen directamente los testículos de las ratas a temperaturas muy elevadas (hipertermia) o frías (hipotermia), para evaluar la aparición de apoptosis en las células germinales del epitelio seminífero.

En los testículos de la rata macho, expuestos a estrés por calor (43°C durante 15 min), se observó un incremento en la activación de la apoptosis en las células germinales del epitelio seminífero, afectando principalmente a espermatocitos primarios y espermatidas redondas ubicadas en las etapas I a IV y XII a XIV del ciclo del epitelio seminífero (Lue y cols., 1998; Rockett y cols., 2001). Se ha reportado, que este estresor puede inducir la translocación citoplasmática de Bax (proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia de proteínas Bcl-2)

hacia una región perinuclear (Yamamoto y cols., 2000), la cual es acompañada por la liberación del citocromo c y la consiguiente activación de la caspasa 9, que a su vez activa a la caspasa 3 (Sinha y cols., 2003).

Por otro lado, el congelamiento directo de los testículos (10°C durante 30 min) induce apoptosis en las células germinales (etapas XII y XIV), mostrando una mayor incidencia dos horas posteriores a la exposición al estresor (Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1997). Del mismo modo, el congelamiento directo de los testículos con solución Ringer de 0-1°C durante 60 minutos, causó pérdida de células germinales vía apoptosis, dentro de las ocho horas subsecuentes a la exposición al estresor (Zhang y cols., 2004). Los resultados obtenidos en estos trabajos, muestran una marcada activación de la apoptosis en las células germinales, principalmente en espermatogonias, espermatocitos primarios y espermatidas en etapas específicas del ciclo del epitelio seminífero, lo cual provoca interrupción de la espermatogénesis.

Asimismo, el estrés producido por el choque térmico (40°C durante dos horas) así como el estrés producido por frío (4°C durante dos horas) induce apoptosis en espermatocitos primarios y espermatidas. Este efecto está asociado con el incremento en la actividad de la caspasa 3, 8 y 9. La activación de la cascada de las caspasas indica que ambas vías de señalización (extrínseca e intrínseca) podrían estar involucradas en la apoptosis de las células germinales (Wang y cols., 2012). Sin embargo, el mecanismo preciso a través del cual el estrés activa la apoptosis en dichas células, aún no ha sido completamente entendido.

### **1.9.2 Activación de la apoptosis en las células testiculares por efecto del estrés crónico**

Además de los modelos experimentales anteriormente descritos, existen otros modelos que pueden inducir apoptosis en las células germinales, interrupción de la espermatogénesis y afectar la fertilidad masculina. En un estudio realizado en ratas expuestas a estrés por inmovilización dos horas diarias durante siete días consecutivos, se observó un incremento en el porcentaje de túbulos seminíferos que contenían células germinales apoptóticas (Yazawa y cols., 1999). Se ha propuesto que la disminución en la concentración sérica de testosterona, inducida por el aumento en los niveles séricos de corticosterona, en las ratas estresadas, podría ser responsable, al menos en parte, de la activación de la apoptosis en los testículos de estos animales (Yazawa y cols., 1999; Yazawa y cols., 2000).

Estudios realizados *in vivo* han mostrado que la disminución de testosterona puede estimular la actividad de la caspasa 3 (Kim y cols., 2001), e inducir apoptosis en diferentes tipos de células testiculares (Nirupama y cols., 2012), incluyendo a las células de Sertoli (Tesarik y cols., 2002). Es probable, que el incremento en la actividad de la caspasa 3 involucre tanto a la vía intrínseca como extrínseca de la apoptosis (Kim y cols., 2001; Said y cols., 2004).

En ratas expuestas a estrés crónico por inmovilización (1 hora) seguido por nado forzado (15 min diarios) durante 60 días consecutivos, se observó un incremento en la aparición de apoptosis de las células germinales, principalmente de las espermatogonias tipo A, espermátocitos primarios en paquiteno, espermátidas redondas y elongadas, situadas en la etapa VII del ciclo del epitelio

seminífero. Al mismo tiempo, causó disminución en la concentración de espermatozoides del epidídimo (Nirupama y cols., 2012). Es probable que la disminución gradual y progresiva de la espermatogénesis, por efecto del estrés crónico, sea responsable de la disminución en la producción de espermatozoides maduros.

Un estudio realizado en humanos que presentaban oligozoospermia y azoospermia obstructiva, se observó un incremento de la apoptosis en diferentes tipos de células germinales del epitelio seminífero, involucrando principalmente a espermatoцитos primarios, espermatidas y células de Sertoli. Los datos obtenidos en este trabajo, proponen que tanto la vía intrínseca como extrínseca podrían estar involucradas en este proceso, debido al incremento en la expresión y actividad de las caspasas 8, 9 y 3 (Almeida y cols., 2013). Estas alteraciones frecuentemente están asociadas con la infertilidad masculina y con el aumento en la frecuencia de apoptosis en las células germinales del epitelio seminífero (Sinha y cols., 1997).

Por otro lado, se han diseñado modelos experimentales utilizados para evaluar directamente el efecto de los glucocorticoides en testículos de rata. Está demostrado que la administración exógena del glucocorticoide sintético dexametasona durante siete días consecutivos, induce apoptosis en las células germinales testiculares (Yazawa y cols., 2000) a través del incremento en la expresión *in situ* de la proteína proapoptótica Bax, principalmente en las etapas VII y VIII del ciclo del epitelio seminífero (Mahmoud y cols., 2009).

### **1.9.3 Efecto del estrés en la calidad de los espermatozoides epididimarios**

Se ha propuesto que el incremento en la secreción de glucocorticoides así como la disminución de testosterona, por efecto del estrés, podría repercutir en la producción de espermatozoides y afectar el proceso de maduración de los mismos (Saki y cols., 2009; Nirupama y cols., 2012), conduciendo a una reducción en la movilidad y en la cuenta espermática (Nirupama y cols., 2012) así como en la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Saki y cols., 2009).

Actualmente existen modelos experimentales utilizados para evaluar directamente el efecto del estrés en los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo. En la rata, una hora de estrés por inmovilización reduce la movilidad espermática 30 minutos posteriores a la exposición al estresor (Ren y cols., 2010). Por otro lado, el estrés por nado forzado (3 min diarios) durante 50 días consecutivos, disminuye la concentración espermática, la movilidad total y progresiva de espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo (Saki y cols., 2009). En un estudio realizado en ratas jóvenes (40 días de edad), inmovilizadas 6 horas diarias durante 60 días consecutivos, se observó una disminución significativa en la concentración de espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo (Almeida y cols., 1998). Resultados similares se han obtenido en ratas inmovilizadas 5 horas diarias, durante 15 días consecutivos. El análisis espermático de estos roedores, mostró una disminución significativa en la concentración y viabilidad espermática así como una reducción en la movilidad progresiva en los espermatozoides epididimarios, todos estos cambios fueron asociados con la disminución en la secreción de testosterona del suero (Dhanabalan y cols., 2010). Es probable, que la disminución en la secreción de

testosterona en los machos estresados, sea responsable de los cambios producidos en los espermatozoides epididimarios, lo cual puede ocasionar disminución de la fertilidad (Fenster y cols., 1997).

En los humanos, el estrés psicológico puede ser considerado como una de las principales causas de infertilidad idiopática en el hombre (Saki y cols., 2009). Existen reportes de que el estrés psicológico severo provocado por el fallecimiento de un familiar o de la esposa, reduce de manera constante la producción de espermatozoides (Fenster y cols., 1997), afectando de manera importante la fertilidad masculina (Gerhard y cols., 1992).

#### **1.9.4 Efecto del estrés en la secreción de testosterona**

Diversos estudios han demostrado que el incremento en la secreción de glucocorticoides debido a la activación crónica del eje HHA durante la respuesta de estrés, inhibe directamente la secreción de testosterona en las células de Leydig (Dong y cols., 2004; Hardy y cols., 2005; Chen y cols., 2012). La exposición prolongada a diferentes estresores como la inmovilización (Dong y cols., 2004; Chen y cols., 2012), la privación de sueño (Andersen y cols., 2004), los choques eléctricos en las patas (Retana-Márquez y cols., 2003) o el estrés por inmersión en agua fría (Retana-Márquez y cols., 2003; Chen y cols., 2012), aplicados en ratas, incrementan significativamente la concentración plasmática de corticosterona y disminuye la concentración de testosterona en el plasma (Sapolsky, 1985; Retana-Márquez y cols., 2003). Esta disminución en la secreción de testosterona puede atribuirse directamente a los glucocorticoides plasmáticos, ya que estos pueden inhibir la liberación de LH en la hipófisis (Briski y Silvestre, 1994), afectando

directamente la producción de testosterona en las células de Leydig (Dong y cols., 2004).

Un estudio realizado en ratas expuestas a estrés crónico impredecible durante 21 días consecutivos, mostró que el estrés crónico puede inducir apoptosis en las células de Leydig (Chen y cols., 2012) a través de un mecanismo regulado por el receptor a glucocorticoides (RG), ubicado en el citoplasma de las células de Leydig (Sasagawa y cols., 2001). La activación de la apoptosis en estas células puede estar relacionada con la activación del sistema Fas, de la caspasa 3 activa, con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y con el aumento de especies reactivas del oxígeno (Hardy y cols., 2005).

En los últimos años, se ha investigado el efecto del estrés crónico por inmersión en agua fría en diversos aspectos de la función reproductiva, como son: la conducta sexual, la secreción de testosterona y la espermatogénesis (Retana-Márquez y cols., 2003; Retana-Márquez y cols., 2014) en la rata macho. Se ha demostrado que este estresor tiene un profundo efecto inhibitorio en la concentración plasmática de testosterona, la cual disminuye significativamente, y al mismo tiempo, causa un incremento significativo en la concentración de corticosterona plasmática (Retana-Márquez y cols., 2003). Asimismo, se ha demostrado que el estrés por inmersión en agua fría (15°C durante 15 min) durante 20 o 50 días consecutivos, causa pérdida de células germinales así como daño en el epitelio seminífero (Retana-Márquez y cols., 2014). Estos resultados muestran que el estrés por inmersión en agua fría es un potente activador del eje HHA e inhibidor del eje HHG.

Aunque está claro que el aumento de los glucocorticoides en la sangre por efecto del estrés, está relacionado con la disminución de testosterona y con la aparición de la apoptosis en las células testiculares, las consecuencias a largo plazo en diversos aspectos de la función reproductiva no han sido completamente estudiadas. Pocos estudios se han conducido a investigar el efecto del estrés por inmersión en agua fría en la activación de la apoptosis en las células testiculares y en los espermatozoides epididimarios. Con base en estas consideraciones, en este trabajo se evaluó la activación de las vías de señalización intrínseca y extrínseca en la apoptosis de las células testiculares así como sus consecuencias en la calidad de espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo, utilizando a la rata macho como modelo experimental de mamífero.

## **2.0 Planteamiento del problema**

Si bien se ha demostrado que el estrés crónico incrementa la secreción de glucocorticoides, disminuye la secreción de testosterona e induce apoptosis en las células testiculares, aún no está completamente definido cuáles son las vías de señalización involucradas en la activación de la apoptosis en las células del testículo y sus consecuencias en la calidad espermática.

## **3.0 Justificación**

Aunque se ha establecido que el estrés causa apoptosis en las células testiculares, altera el desarrollo de la espermatogénesis en el testículo y afecta la calidad de los espermatozoides epididimarios, actualmente no existen reportes que relacionen la activación de la apoptosis en las células testiculares con la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas que participan en la activación de ambas vías de señalización de la apoptosis testicular con los cambios producidos

en la calidad de los espermatozoides epididimarios, así como con las concentraciones de corticosterona y testosterona del suero, durante el tiempo de exposición al estrés agudo y crónico.

Por lo tanto en el presente trabajo se evaluó la participación de algunos marcadores apoptóticos involucrados en la activación de las vías de señalización intrínseca y extrínseca de la apoptosis testicular así como su repercusión en la calidad de los espermatozoides epididimarios. Considerando que el estrés incrementa la concentración de glucocorticoides y que estos inhiben la secreción de testosterona y causan apoptosis en las células testiculares, se evaluaron los cambios producidos en las concentraciones de corticosterona y testosterona del suero, en ratas macho expuestas a estrés agudo o crónico por inmersión en agua fría.

#### **4.0 Pregunta de investigación**

¿De qué manera el incremento de la corticosterona del suero, inducido por el estrés, inhibe la secreción de testosterona, activa la apoptosis en las células testiculares y cómo afecta la calidad de los espermatozoides epididimarios?

#### **5.0 Hipótesis**

La exposición al estrés agudo y crónico inducirá apoptosis en las células del testículo. Este proceso implicará la activación de marcadores apoptóticos involucrados en las vías de señalización intrínseca y extrínseca de la apoptosis testicular. Al mismo tiempo, afectará los parámetros espermáticos de espermatozoides epididimarios. Estos cambios estarán relacionados con el aumento en la concentración de corticosterona y con la disminución de testosterona del suero.

## **6.0 Objetivo general**

- Determinar cuáles son las vías de señalización que se activan durante la apoptosis de las células testiculares y los cambios producidos en la calidad de los espermatozoides epididimarios de la rata macho en respuesta al estrés agudo y crónico.

## **7.0 Objetivos particulares**

- Evaluar la aparición de apoptosis en las células testiculares de ratas macho control y estresadas.
- Determinar si las vías intrínseca y extrínseca participan en la activación de la apoptosis en las células testiculares de la rata macho, por efecto del estrés agudo y crónico.
- Evaluar el efecto del estrés agudo y crónico en los espermatozoides epididimarios de la rata macho.
- Determinar las concentraciones de corticosterona y testosterona del suero en respuesta al estrés agudo y crónico.

## **8.0 Diseño experimental**

### **8.1 Materiales y métodos**

Todos los procedimientos utilizados en el presente estudio con el uso de animales de laboratorio, se ajustaron a la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

### **8.2 Animales de laboratorio**

Se utilizaron ratas macho (n= 60) adultas de la cepa Wistar, de tres meses de edad de 250-300g de peso corporal, producidas en el bioterio de la Universidad

Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Se mantuvieron 5 ratas por caja (cajas de acrílico de 50 X 30 X 20 cm), bajo condiciones habituales de bioterio en un cuarto con temperatura controlada de  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$  y con un ciclo de luz-oscuridad invertido 12:12 (la luz se prendió a las 9:00 pm), con agua y alimento *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en estas condiciones una semana antes de iniciar las sesiones de estrés, y fueron asignados a uno de los siguientes grupos: a) control: 1, 20, 40 y 50 días (n=5 por grupo); b) estrés agudo (una sola exposición): 1, 3, 6, 12 y 24 horas (n=5 por periodo de tiempo) posteriores a la exposición al estresor; c) estrés crónico: 20, 40 y 50 días consecutivos (n=5 por periodo de tiempo).

### **8.3 Estrés por inmersión en agua fría**

Las sesiones de estrés se realizaron al inicio de la fase oscura del ciclo luz-oscuridad. Las cajas de las ratas estresadas se trasladaron a otro cuarto, donde se aplicó el estresor, para evitar alteraciones en las ratas de los grupos control.

El modelo de estrés por inmersión en agua fría, consistió en colocar a las ratas individualmente en un tanque de agua fría a una temperatura de  $15^{\circ}\text{C}$ , a una profundidad de 15.5 cm, en donde los animales permanecen en posición vertical, de pie sobre sus patas traseras, manteniendo la cabeza por encima del nivel del agua, durante periodos de 15 minutos. Al terminar las sesiones de estrés, los animales se secaron con un trapo y se regresaron a sus cajas (Retana-Márquez y cols., 1996). Este procedimiento se realizó durante 1 (estrés agudo), 20, 40 y 50 días consecutivos (estrés crónico). Los animales de los grupos control se mantuvieron en sus cajas sin alteraciones hasta el día de la prueba.

#### **8.4 Obtención de las muestras**

Las ratas expuestas a estrés agudo se anestesiaron con pentobarbital sódico (25 mg/kg de peso corporal administrado por vía intraperitoneal) a las 1, 3, 6, 12 y 24 horas posteriores a la exposición al estresor. Los animales expuestos a estrés crónico se anestesiaron una hora después de la última sesión de estrés. Una vez anestesiados, se disectaron y pesaron ambos testículos. El testículo izquierdo se utilizó para evaluar la fragmentación del ADN en las células germinales con la técnica de TUNEL. El testículo derecho fue almacenado a -70°C para la extracción de proteínas y realización del Western blot. Se obtuvieron espermatozoides de la cauda del epidídimo para determinar la movilidad, viabilidad y la concentración espermática. Se obtuvo sangre por punción cardíaca (3-4 ml), inmediatamente después de que se obtuvieron los testículos y la cauda del epidídimo (~ 3 min), enseguida se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min para la obtención del suero. Estas muestras fueron almacenadas a -20°C y se utilizó para determinar las concentraciones de las hormonas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

#### **8.5 Disección y procesamiento de los testículos.**

El testículo derecho se perfundió a través de la arteria testicular con PBS (NaCl 137mM, KCl 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.03 mM y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.47 mM) y con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, USA). Enseguida se colocaron en un vial que contenía la solución fijadora y se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas.

## 8.6 Inclusión en parafina

Al día siguiente, se realizaron varios lavados con PBS, para eliminar el exceso de paraformaldehído. Después de eliminar el fijador, los tejidos se lavaron 3 veces con alcohol al 70% y se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas. Después de la fijación y lavado de los tejidos, estos se colocaron en el procesador automático, Histoquinet (Leica, TO 1020, Leica Biosystem Richmond, Inc. USA) el cual se programa para que trabaje de manera automática durante la noche y se puedan incluir los tejidos al día siguiente.

Los tejidos se deshidrataron en baños sucesivos con soluciones de concentraciones crecientes de alcohol etílico y, posteriormente, se impregnaron con solventes intermedios como el xileno (conocidos como líquidos diafanizadores o aclarantes) (tabla 1).

Al día siguiente, los tejidos fueron embebidos en Paraplast-plus (McCormick<sup>TM</sup> Scientific, Leica Biosystems Richmond, Inc. USA) y se dejaron enfriar durante 24 horas. Una vez que se obtuvieron los bloques de parafina, se realizaron cortes transversales de 5  $\mu\text{m}$  de grosor utilizando el micrótopo de rotación (Leica microtome, Leica Biosystem Richmond, Inc. USA) (Montalvo-Arenas, 2010) y se montaron en portaobjetos previamente tratados con poli-lisina (Poly-L-Lysine Hidrobromide, Sigma Aldrich, Ind., USA).

Tabla 1. Proceso de deshidratación, diafanización e impregnación de la parafina de los tejidos.

	Volumen	Tiempo
Alcohol 80%	1.5 L	1.5 h
Alcohol 96%	1.5 L	1.5 h
Alcohol 96%	1.5 L	1.5 h
Alcohol 96%	1.5 L	1.5 h
Alcohol absoluto	1.5 L	1.5 h
Alcohol absoluto	1.5 L	1.5 h
Alcohol absoluto	1.5 L	1.5 h
Alcohol absoluto-xilol	1.5 L	1h
Xileno I	1.5 L	1h
Xileno II	1.5 L	1h
Parafina I		2 h
Parafina II		2 h

## 8.7 Detección *in situ* de la fragmentación del ADN

### 8.7.1 Método de TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated deoxy-UTP nick end labeling)

Los cortes de testículo de 5  $\mu\text{m}$  de grosor fueron desparafinados y rehidratados de acuerdo con el protocolo estándar establecido en el laboratorio. Las laminillas se colocaron en una estufa a una temperatura de 60°C, durante una hora. Posteriormente, se realizaron dos lavados con xilol de 5 minutos cada uno. Enseguida, los tejidos se hidrataron con concentraciones descendientes de etanol: 100, 96, 80 y 70 %, durante 3 minutos en cada uno de los alcoholes. Al finalizar, los tejidos se mantuvieron en PBS hasta que inicio la prueba.

La técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated deoxy-UTP nick-end labeling) para la detección de células con apoptosis se realizó con el In-Situ Cell Detection kit (POD kit, Roche, Germany). Los tejidos fueron tratados con 50  $\mu$ l de proteínasa K (Proteinase K, recombinant PCR Grade, Roche, Germany) a una concentración de 20  $\mu$ g/ml, se incubaron a 37 °C, durante 30 min dentro de una cámara oscura húmeda. Al finalizar, los tejidos se lavaron 2 veces con PBS.

Enseguida, los tejidos se incubaron con 100  $\mu$ l de solución de permeabilización (Triton X-100 0.1% disuelto en citrato de sodio 0.1%) a 4 °C, durante 5 minutos. Al finalizar, los tejidos se lavaron 2 veces con PBS.

Inmediatamente, los tejidos fueron tratados con 25  $\mu$ l de una mezcla compuesta por: desoxi-nucleotidil-transferasa-(TdT) y trifosfato de dideoxiuridina con fluoresceína no radioactiva-(dUTP) (dilución 1:10), se incubaron a 37 °C durante 60 min dentro de una cámara oscura húmeda.

Las células positivas a TUNEL fueron identificadas primero con el microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus, HBO 50/Ac, Carl Zeiss) y, posteriormente, se utilizó el microscopio confocal (LSM 780 multiphoton confocal microscope, Carl Zeiss) a una longitud de onda de 450-500 nm de excitación y en un rango de detección de 515-565 nm (luz verde), para obtener fotografías de los túbulos con células positivas a TUNEL. Las células positivas a TUNEL se caracterizaron por presentar una fluorescencia verde intensa en los núcleos apoptóticos y las células normales no presentaban fluorescencia. Por cada espécimen, se analizaron 50 túbulos al azar y se calculó el porcentaje de túbulos

que contenían células germinales positivas a TUNEL así como el número de células germinales positivas a TUNEL contenidas en estos túbulos.

### **8.7.2 Conversión a campo claro**

Al terminar, los tejidos se cubrieron completamente con 50  $\mu$ l del convertidor POD (Converter POD- HRP) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos dentro de una cámara oscura húmeda. Al finalizar, los tejidos se lavaron 2 veces con PBS. Enseguida, los tejidos fueron tratados con 50  $\mu$ l de DAB (3-3'Diaminobenzidine tetrahydrochloride) al 0.05%, durante un minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, las laminillas se lavaron tres veces con PBS. Los tejidos fueron contrateñidos con Hematoxilina, se cubrieron con una solución de glicerol/PBS (relación 1:1), se les colocó un cubreobjetos y se dejaron secar. Se analizaron los túbulos con el microscopio de luz (Olympus Light Microscope CX 41), con el objetivo de 40x, para identificar cuáles eran las células germinales positivas a TUNEL, las cuales se caracterizaron por presentar una coloración café intensa (modificado de Yazawa y cols., 1999).

## **8.8 Western blot**

### **8.8.1 Extracción de proteínas**

Las proteínas totales se obtuvieron de túbulos seminíferos mantenidos a -70°C, mediante disrupción mecánica. Se colocaron 0.2 g de tejido en un tubo de microcentrífuga (2 ml), que contenía 300  $\mu$ l de PBS frío (pH 7.4) y se homogeneizó hasta disgregar el tejido completamente. Se centrifugó en una microcentrífuga durante 30 segundos y se retiró cuidadosamente el sobrenadante. Enseguida, se agregaron 100  $\mu$ l de Buffer de lisis [IGEPAL 1%, Tris-HCl 20 mM, NaCl 120 mM e inhibidores de proteasas: Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche

Molecular Biochemical, Indianapolis, IN)], se homogeneizó y se dejó incubando en hielo durante 15 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12,000 X g durante 10 min a 4°C (Kim y cols., 2001). Se recuperaron los sobrenadantes y se pasaron a tubos nuevos, perfectamente rotulados, y se conservaron en hielo. Con los sobrenadantes obtenidos se cuantificaron las proteínas en el espectrofotómetro (The Thermo Scientific NanoDrop 2000c) en un rango de absorbancia a 280 nm.

### **8.8.2 Preparación de las proteínas**

Se colocaron 2 µl de buffer de muestra (SDS Protein Gel Loading Solution 2x, Quality Biological, Inc) en cada uno de los tubos de microcentrífuga (correspondientes a cada una de las muestras obtenidas), se agregó el volumen de la proteína equivalente a 300 µg de proteínas totales y se incubaron en baño maría a 95°C durante 5 minutos.

### **8.8.3 Preparación de los geles**

Se consideraron las cantidades indicadas en la tabla 2 para preparar: el gel de corrida y el gel concentrador.

### **8.8.4 Electroforesis y transferencia de proteínas**

El análisis electroforético fue realizado de acuerdo al método reportado por Laemmli, en 1970. Una vez listos los geles, se colocaron en la cámara de electroforesis y se llenó tanto el exterior como el espacio entre los cristales, con el buffer de electroforesis (Tris-base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 1%). Enseguida, se colocaron cada una de las muestras en los carriles del gel y se corrió la electroforesis a 120 V en una cámara Mini-Protein II Cell (Bio-Rad) en presencia

de un marcador de peso molecular estándar (NuPAGE Novex, Invitrogen Corp) durante 90 minutos.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la elaboración del gel de corrida y gel concentrador.

Reactivos	Gel de corrida (12%)	Gel concentrador (3%)
Agua desionizada estéril	3.34 ml	3.05 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	-----
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	-----	1.25 ml
SDS 10%	100 µL	50 µl
Acilamida-bis	4 ml	650 µl
TEMED	10 µl	10 µl
Persulfato de amonio	50 µl	25 µl

Terminado el tiempo de la electroforesis, se despegaron los geles de los cristales y se colocaron en un recipiente que contenía buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%). Las proteínas fueron transferidas desde el gel a la membrana por electroforesis, de acuerdo al método reportado por Towbin, en 1979. El procedimiento se inició apilando sucesivamente papel filtro, la membrana en contacto directo con el gel y más papel filtro, empapados en buffer de transferencia, en el siguiente orden:

**2 papel filtro/la membrana nitrocelulosa/ el gel/2 papel filtro**

Una vez listos todos los componentes, se colocaron en el sistema de transferencia de proteínas Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) y se corrió la transferencia a 120 V durante 30 min. Una vez terminada la transferencia, se sacaron las membranas con la cara de transferencia hacia arriba y se bloquearon con leche

descremada al 5% disuelta el TBS-Tween 20 (NaCl 137 mM, Tris-HCl 20 mM, Tween-20 0.1%, pH 7.6) durante 30 min, en agitación constante.

Al finalizar, se eliminó el exceso de leche y las membranas se incubaron con su respectivo anticuerpo primario [anti-Bax 1:500 (Bax Monoclonal Antibody, BioVision); anti-Bcl-2 1:500 (Bcl-2 Polyclonal Antibody, BioVision)]; anti-active caspase-3 1:500 (Cell Signalling); anti-active caspase-8 1:500 (Santa Cruz Biotechnology), diluido en 10 ml de TBS-Tween 20 (para dos membranas), durante toda la noche a 4°C en agitación suave.

Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con TBS-Tween 20 y, enseguida se incubaron con su respectivo anticuerpo secundario: peroxidase-conjugated goat antirabbit or antimouse (Vector Laboratories) a una dilución 1:10,000 (1 µl de anticuerpo secundario en 10,000 ml de TBS-Tween 20), durante 2 horas en agitación suave y a temperatura ambiente. Al terminar, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con TBS-Tween 20. La intensidad de las bandas se determinó mediante el Quantity One software from Kodak. Para confirmar la especificidad de los anticuerpos, se utilizaron extractos de proteína de testículos de ratas tratadas con benzoato de estradiol (10 µg/0.2 ml aceite, sc) los cuales se utilizaron como control positivo. Al finalizar, las membranas se desnudaron con Tris-Base 50 mM, pH 2.0 e inmediatamente se incubaron con β-actina (β-actin monoclonal antibody, Sigma, St Louis, Mo) para comprobar la carga completa de proteínas.

### **8.9 Obtención de espermatozoides de la cauda del epidídimo**

Se obtuvieron los epidídimos y se colocaron en un vaso de precipitado de 10 ml, que contenía 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos salino PBS (NaCl,

137mM, KCl, 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8.03 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM, pH 7.4) a 37°C. Se realizó un corte en la cauda del epidídimo, con unas tijeras de disección de punta fina e inmediatamente se liberaron los espermatozoides almacenados en la cauda, los espermatozoides se distribuyeron homogéneamente en el PBS, para su inmediato análisis.

### **8.9.1 Análisis espermático**

#### **8.9.2. Viabilidad**

Se determinó utilizando un colorante compuesto con 1% de eosina, 5 % de nigrosina y 2.9% de citrato de sodio, disueltos en 100 ml de agua destilada (Lucio, R. A y Tlachi-López, 2009). Se colocaron 10 µl de la suspensión de espermatozoides sobre un portaobjetos, se agregaron 10 µl del colorante y se cubrieron con un cubreobjetos. Las laminillas fueron analizadas con el microscopio de luz (Olympus Light Microscope CX 41) con el objetivo de 40x. Se contaron 200 espermatozoides al azar, en diferentes campos. Los espermatozoides no teñidos se consideraron vivos y los teñidos, muertos. Los resultados obtenidos fueron expresados como el porcentaje de espermatozoides vivos.

#### **8.9.3 Concentración**

La concentración espermática se determinó con una cámara de recuento celular (Neubauer-improved, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany). En un tubo de micro-centrífuga se depositaron 500 µl de agua destilada más 25 µl de la muestra (dilución 1:21). Se colocaron 10 µl de la muestra diluida en cada una de los dos extremos de la cámara de Neubauer y se observaron con el objetivo de 20x. El análisis se realizó en la cuadrícula central, conocida como E, considerando los espermatozoides de ocho sub-cuadros específicos. Se contaron los

espermatozoides cuyas cabezas se encontraban dentro de estos sub-cuadros pequeños. La concentración se determinó con la siguiente fórmula: número de espermatozoides contados X el número de sub cuadros (8) X el factor de dilución (21) X 10, 000 y se dividió entre 2. El número de espermatozoides fue expresado en millones por mililitro (modificado de Lucio, R. A y Tlachi-López, 2009).

#### **8.9.4 Movilidad**

Se depositaron 10 µl de la muestra en una cánula (100 µm de profundidad), la cual se colocó en el sistema analizador de movilidad HTM-IVOS (Hamilton Thorne IVOS CASA instrument, MA, USA), versión de software 10.6. Los campos analizados se capturaron a 60 Hz bajo iluminación de campo oscuro 4x, magnificación de 1.95. Se analizaron 5 ratas por cada intervalo de tiempo. Se determinó el porcentaje de movilidad total y progresiva de los espermatozoides.

#### **8.10 Determinación de corticosterona y testosterona**

Se obtuvo sangre (3-4 ml) por punción cardiaca. La sangre obtenida se depositó en tubos de ensayo e inmediatamente fue centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos, para separar el suero, éste se colocó en tubos de ensayo y se congelaron a -20 °C para su posterior evaluación. Al finalizar los 50 días de estrés se descongelaron los sueros para determinar la concentración sérica de corticosterona y testosterona por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La extracción de los esteroides del suero se realizó de acuerdo con una modificación de Woodward y Emery, en 1987. Se obtuvo 1 ml de suero, se le añadieron 100 µl de hidróxido de sodio 0.03 M, 5 ml de éter-dietílico-diclorometano (proporción V/V 60:40) y se homogenizaron en un vortex durante 2 minutos y se centrifugaron a 2 500 rpm durante 5 minutos.

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

#### **8.10.1 Cuantificación de corticosterona y testosterona por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).**

La pre-columna (Symmetry C18, tamaño de la partícula de 3.5  $\mu\text{m}$ , 2.1 X 10 mm; Waters Corp., Milford, Ma., USA) y la columna fueron equilibradas con acetonitrilo-agua (65:35 v/v) con una velocidad de flujo de 0.4 ml/min. Las separaciones se realizaron a una temperatura de 40 °C, con una columna de Waters Symmetry C18 (tamaño de la partícula 5  $\mu\text{l}$ ; tamaño de la columna 2.0 X 150 mm; Waters Corp., Milford, Ma., USA).

Se utilizó un sistema controlador Waters 600 MS para separar la fase móvil y los esteroides se evaluaron con un detector ultravioleta (UV) (486 Waters UV absorbance detector) a una absorbancia de 245 nm. Para la calibración, se utilizaron estándares (nortestosterona, androstendiona, testosterona y corticosterona) cuyas concentraciones cubren el rango de 30 ng/ml, para la testosterona y de 0-50  $\mu\text{g/dl}$  para la corticosterona. La regresión lineal de la concentración de testosterona y corticosterona fue calculada y se usó para determinar las concentraciones de las muestras biológicas. Para la testosterona, la regresión lineal fue de:  $y = -0.774 + 0.2181x$  ( $r^2 = 0.99896$ ) y, para la corticosterona, la regresión lineal fue de:  $y = 0.6464 + 0.01655x$  ( $r^2 = 0.99893$ ). El límite de

detección del ensayo para la testosterona y la corticosterona fueron de 0.2–8 ng/ml y de 1.5–50 µg/dl, respectivamente.

## **9.0 Análisis estadístico**

Los datos se muestran como la media  $\pm$  error estándar ( $X \pm E.E$ ) y los parámetros espermáticos como porcentajes. El número de túbulos seminíferos con células germinales positivas a TUNEL, el número de células germinales positivas a TUNEL contenidas en dichos túbulos así como las concentraciones de corticosterona y testosterona del estrés agudo, se analizaron mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía. El número de túbulos seminíferos con células germinales positivas a TUNEL, los parámetros espermáticos así como la concentración de corticosterona y testosterona del estrés crónico, se analizaron mediante un análisis de varianza ANOVA de dos vías, con la condición y los días como factores. Los datos obtenidos del Western blot se analizaron con una ANOVA de una vía. Las diferencias entre los grupos se analizaron con una prueba post hoc de Newman-Keulls. El nivel de significancia se fijó en  $p < 0.05$ .

## **10.0 Resultados**

### **10.1 Porcentaje de túbulos seminíferos con células germinales positivas a TUNEL**

En los testículos de los machos sometidos a estrés agudo, se observó un incremento en el porcentaje de túbulos que contenían células germinales positivas a TUNEL que fue de  $30.6 \pm 3.3\%$  una hora después de la exposición al estresor hasta  $52.6 \pm 6.7\%$ . Estos porcentajes fueron significativamente mayores que en los testículos de los machos del grupo control, en los cuales se observó  $10 \pm 3.3\%$  de túbulos con células germinales positivas a TUNEL ( $p < 0.01$ ) (figura 10).

En los testículos de los machos sometidos a estrés crónico, se observó mayor porcentaje de túbulos con células germinales positivas a TUNEL desde el día 20 de estrés. Los valores observados fueron similares en todos los días de estrés crónico evaluados entre  $39.6 \pm 2.7$  y  $43.6 \pm 3.7\%$  de túbulos con células germinales positivas a TUNEL. Este porcentaje fue significativamente mayor que en los testículos de los machos del grupo control, en los cuales se observó  $14 \pm 2.3\%$  de túbulos con células germinales positivas TUNEL ( $p < 0.01$ ) (figura 11).

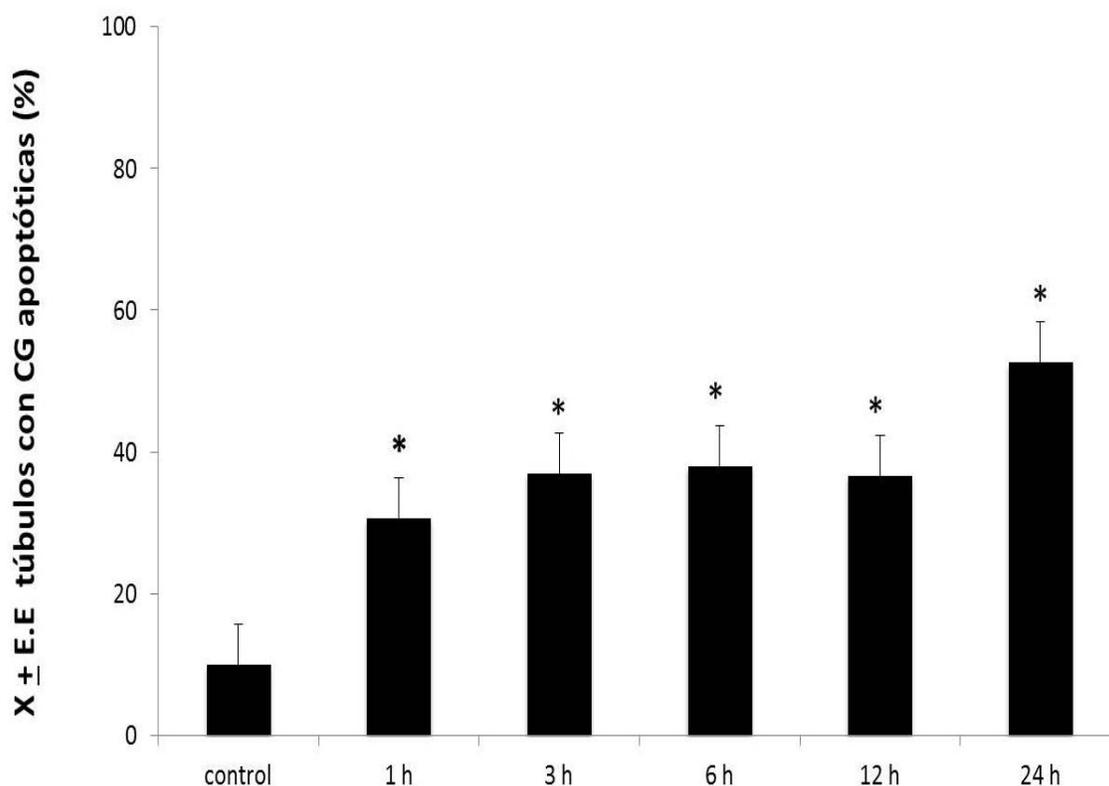


Figura 10. Porcentaje de túbulos seminíferos con células germinales (CG) positivas a TUNEL, evaluados en diferentes intervalos de tiempo una hora después de la exposición al estresor. Los porcentajes fueron significativamente más altos desde la primera hora, alcanzando un máximo 24 horas posteriores a la exposición al estresor. Los datos se muestran como la media  $\pm$  E.E. Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls  $*p < 0.01$  comparado con el grupo control.

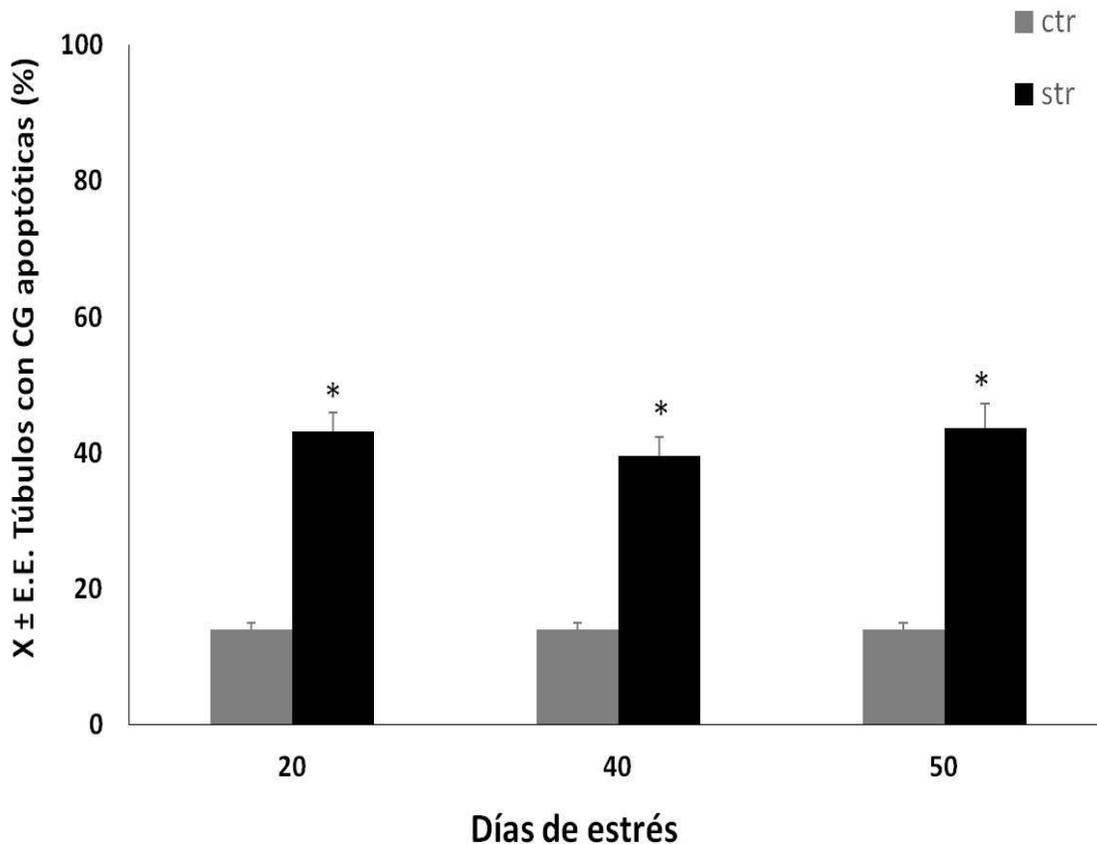


Figura 11. Porcentaje de túbulos seminíferos con células germinales (CG) positivas a TUNEL evaluados durante 20, 40 y 50 días de exposición a estrés crónico. Los porcentajes fueron significativamente más altos en comparación con los testículos de los machos del grupo control. Los datos se muestran como la media  $\pm$  E.E. Se analizaron con una ANOVA de dos vía, seguida por una prueba post hoc de Newman-Keuls  $*p < 0.01$ .

### 10.2 Número de células germinales positivas a TUNEL contenidas en los túbulos seminíferos

Las células positivas a TUNEL se caracterizaron por presentar una fluorescencia verde intensa en los núcleos de las células apoptóticas (figura 12). En los testículos de los machos control, se observaron escasas células positivas a TUNEL (figura 12A); mientras que en los testículos de los machos sometidos a estrés agudo, se observó un incremento significativo en el número de células testiculares positivas a TUNEL (figura 12B y 14), una hora posterior a la exposición al estresor, pero no en las horas siguientes. En los testículos de los

machos sometidos a estrés crónico, las células positivas a TUNEL se observaron dispersas dentro de los túbulos seminíferos analizados (figura 12C y 14).

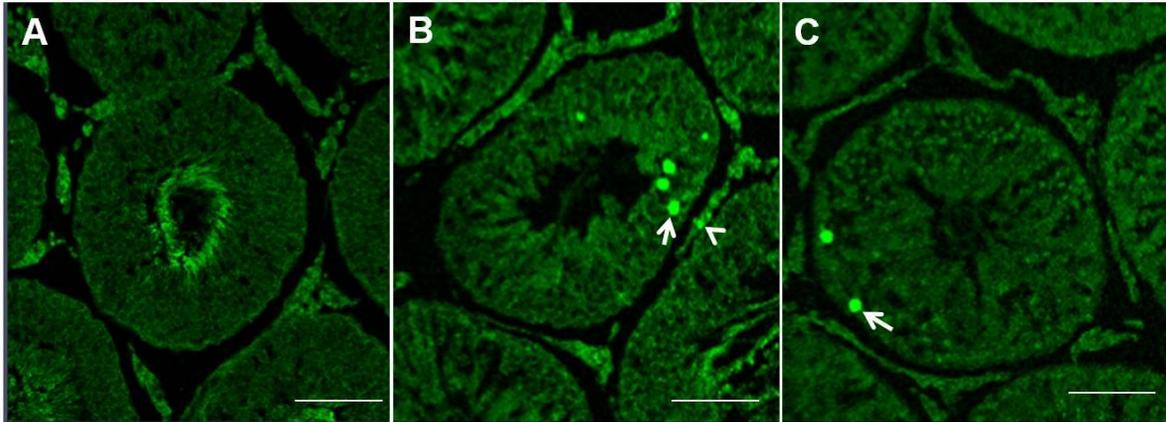


Figura 12. Cortes transversales de testículos de machos control y expuestos a estrés agudo y crónico analizados mediante la técnica de TUNEL. En: A) los testículos de los machos control, se observaron túbulos con escasas células positivas a TUNEL; en B) se observó el mayor número de células positivas a TUNEL contenidas dentro de los túbulos seminífero, una hora después de la exposición al estresor, pero no en las horas subsecuentes. En C) los testículos de los machos sometidos a estrés crónico, las células positivas a TUNEL se observaron dispersas dentro de los túbulos analizados. Los tejidos fueron analizados con el microscopio confocal. Tamaño de la barra: 50  $\mu$ m

Con respecto al número de células germinales positivas a TUNEL contenidas en los túbulos seminíferos de los testículos de los machos sometidos a estrés agudo, se observó un incremento significativo en la primera hora posterior al estrés, en comparación con los machos control ( $p < 0.05$ ). Estos datos se ilustran en la figura 13. En los machos sometidos a estrés crónico, no se observaron diferencias significativas en el número de células germinales positivas a TUNEL en los túbulos, comparados con los machos del grupo control, los datos se muestran en la tabla 3.

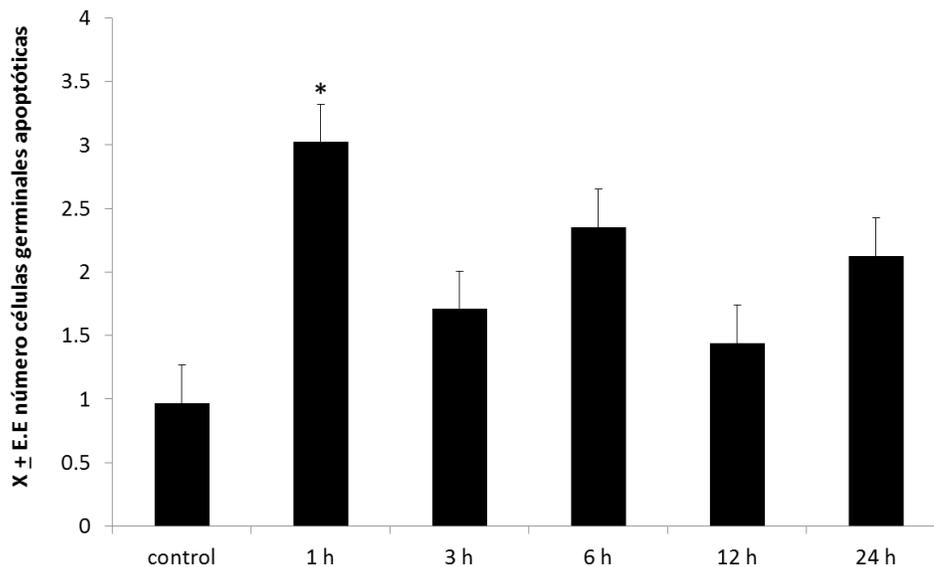


Figura 13. Número de células germinales positivas a TUNEL contenidas en los túbulos seminíferos en los testículos de los machos sometidos a estrés agudo. El número de células germinales apoptóticas fueron significativamente más altas que en los testículos de los machos control, una hora posterior a la exposición al estresor. Los datos se muestran como la media  $\pm$  E.E. Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por una prueba post hoc de Newman-Keuls \* $p < 0.01$ .

Tabla 3. Número de células germinales positivas a TUNEL (CGT) contenidas en los túbulos seminíferos (TS) durante 20, 40 y 50 días de exposición a estrés crónico.

	Control	20 días	40 días	50 días
<b>CGT contenidas en los túbulos seminíferos</b>	<b>1.3 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>2.1 <math>\pm</math> 0.09</b>	<b>1.9 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>2.1 <math>\pm</math> 0.2</b>

Los datos se muestran como la media  $\pm$  error estándar (X  $\pm$  E.E.).

### 10.3 Análisis cualitativo de células germinales positivas a TUNEL

Las células positivas a TUNEL analizadas con el microscopio de luz, se caracterizaron por presentar una coloración café intensa (figura 14), en los núcleos apoptóticos. En los testículos de los machos control, no se observaron células positivas a TUNEL (figura 14A). En los testículos de los machos sometidos a

estrés agudo (figura 14B), es probable que las espermatogonias, espermatocitos primarios y espermátidas ubicadas en las etapas VI-VIII del ciclo del epitelio seminífero, fueran más susceptibles a la apoptosis. Mientras que en los machos sometidos a 50 días de estrés crónico, las espermatogonias, espermatocitos primarios y espermátidas redondas y alargadas ubicadas en las etapas VII-VIII y XII-XIV del ciclo del epitelio seminífero, probablemente, fueron las más susceptibles de experimentar apoptosis (figura 14C).

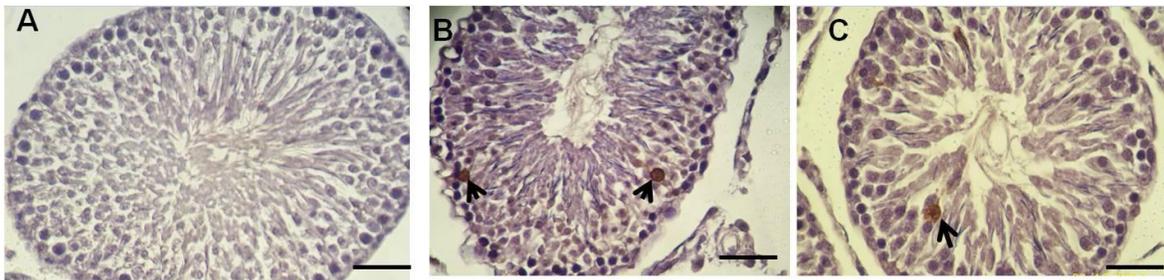


Figura 14. Cortes transversales de testículos de machos control y expuestos a estrés agudo y crónico analizados mediante la técnica de TUNEL. En a) los testículos de los machos control, no se observaron túbulos con células positivas a TUNEL; en b) los testículos de los machos sometidos a estrés agudo, las espermatogonias y los espermatocitos primarios de las etapas VI-VIII (flechas cortas), probablemente fueron las más susceptibles de experimentar apoptosis, una hora después de la exposición al estresor. En c) los testículos de los machos sometidos a estrés crónico, la activación de la apoptosis, al parecer involucró a las espermatogonias, espermatocitos primarios y espermátidas alargadas de las etapas VII-VIII y XII-XIV (flecha larga) del ciclo del epitelio seminífero, las cuales se observaron dispersas dentro de los túbulos. Los tejidos fueron analizados con el microscopio de luz. Tamaño de la barra: 40  $\mu$ m.

#### 10.4 Contenido de proteínas

En los machos expuestos a estrés agudo, el contenido de caspasa 3 activa (17 kDa) incremento desde la primer hora posterior a la exposición al estrés (figura 15A), asimismo se observó un incremento significativo de la caspasa 8 activa (18 kDa) ( $p < 0.05$ ) desde la primera hora y a las 24 horas posteriores a la exposición al estrés (figura 15B). Por otro lado, el contenido de la proteína Bax (21 kDa) incremento significativamente ( $p < 0.05$ ) a las 1, 12 y 24 horas posteriores a la

exposición al estresor (figura 15C). Con respecto a Bcl-2 (25 kDa), el contenido de ésta proteína disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ), en todos los tiempos analizados (1, 3, 6, 12 y 24 horas posteriores a la exposición al estresor) (figura 15D), comparados con el grupo control. Estos datos coinciden con el incremento en el número de células germinales positivas a TUNEL una hora después de la exposición al estrés agudo, observado con la técnica de TUNEL.

Con respecto al estrés crónico, se observó un incremento significativo en la caspasa 3 activa (figura 16A) así como un incremento en el contenido de la caspasa-8 activa (figura 16B) ( $p < 0.05$ ), en los testículos durante los 20, 40 y 50 días. Asimismo, el contenido de la proteína pro-apoptótica Bax (figura 16C) junto con una disminución significativa Bcl-2 ( $p < 0.05$ ) durante los 20, 40 y 50 días de exposición al estrés (figura 16D). Estos datos coinciden con el incremento en el porcentaje de túbulos con células germinales positivas a TUNEL, indicando que la vía intrínseca puede ser activada durante el estrés crónico.

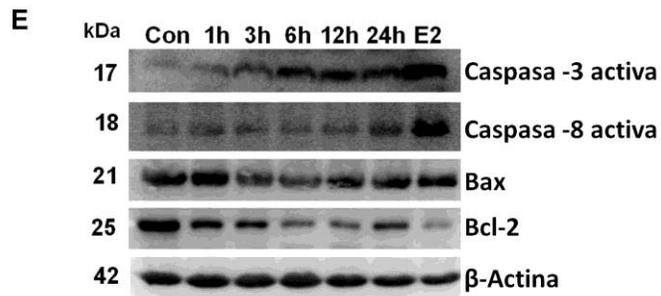
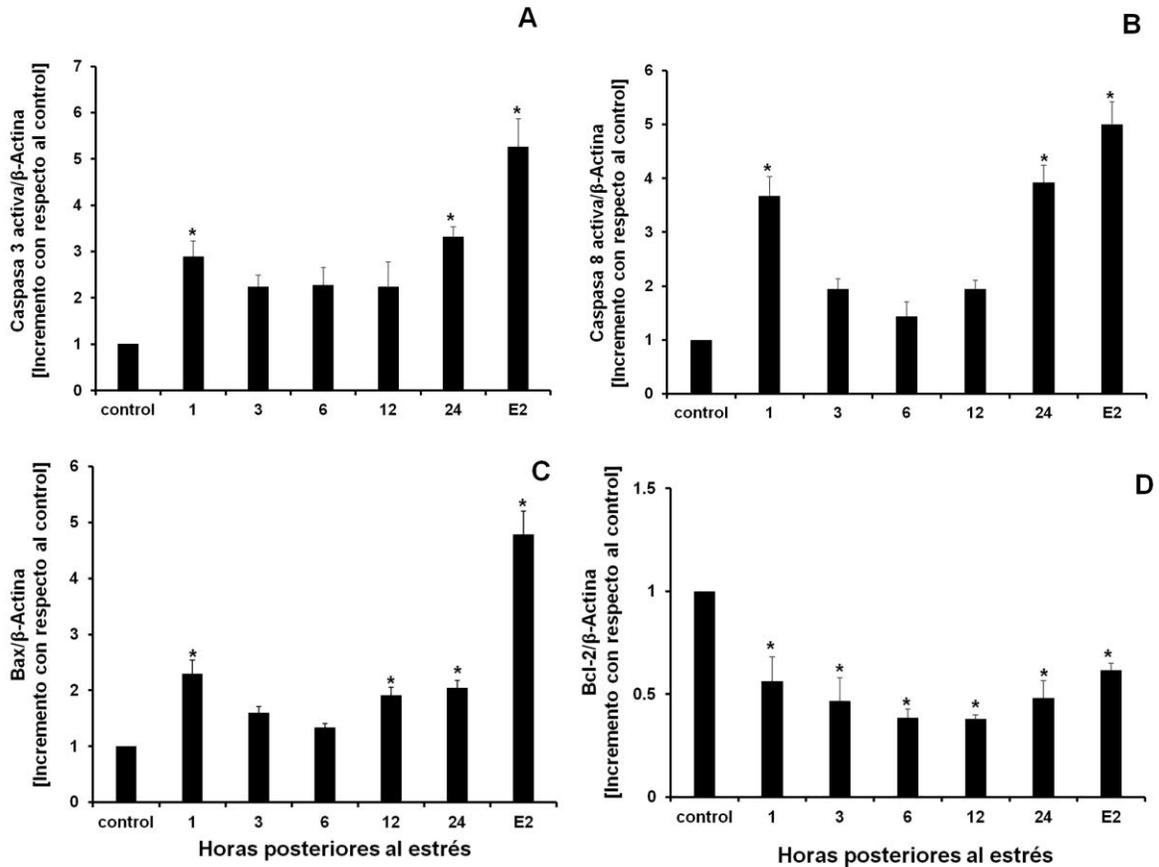


Figura 15. El análisis por Western blot de las proteínas en: A) caspasa-3 activa; en B) caspasa-8 activa; en C) Bax y en D) Bcl-2. Estradiol (E2), como control positivo. Los datos son presentados como la expresión relativa de proteína (DO: densidad óptica) normalizada con  $\beta$ -actina. E) Geles representativos de cinco proteínas en cada intervalo de tiempo. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar ( $X \pm E.E$ ) ( $n=5$ )  $*p<0.05$  comparados con el control.

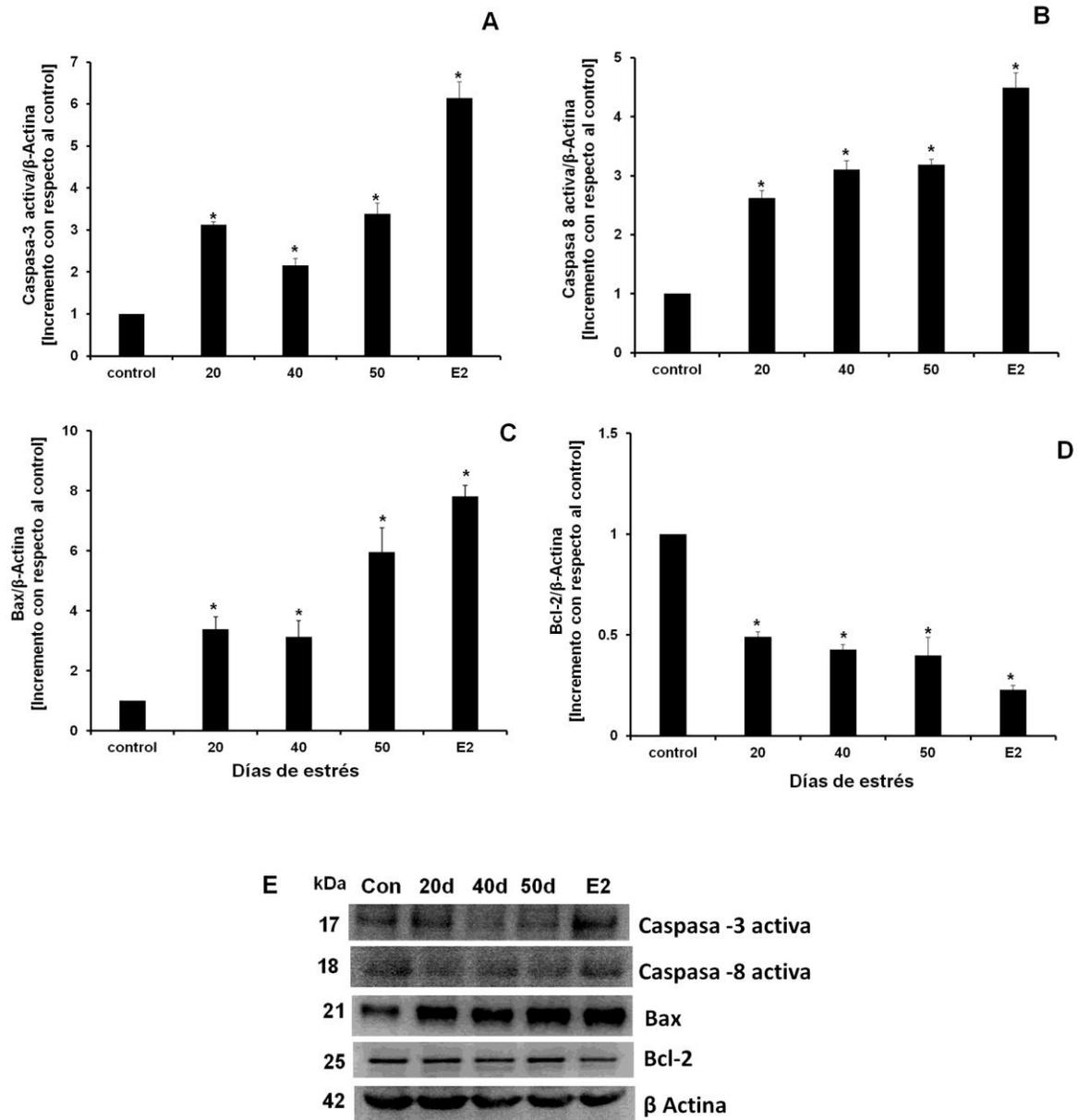


Figura 16. El análisis por Western blot de las proteínas en: A) caspasa-3 activa; en B) caspasa-3 activa; en C) Bax y en D) Bcl-2. Estradiol (E2), como control positivo. Los datos son presentados como la expresión relativa de proteína (DO: densidad óptica) normalizada con  $\beta$ -actina. E) Geles representativos de cinco proteínas en cada intervalo de tiempo. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar ( $X \pm E.E$ ) ( $n=5$ )  $*p<0.05$  comparados con el control.

La relación del cociente óptico relativo entre Bax/Bcl-2 incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) en los testículos de los machos expuestos tanto al estrés agudo como crónico (figuras 17A y 17B).

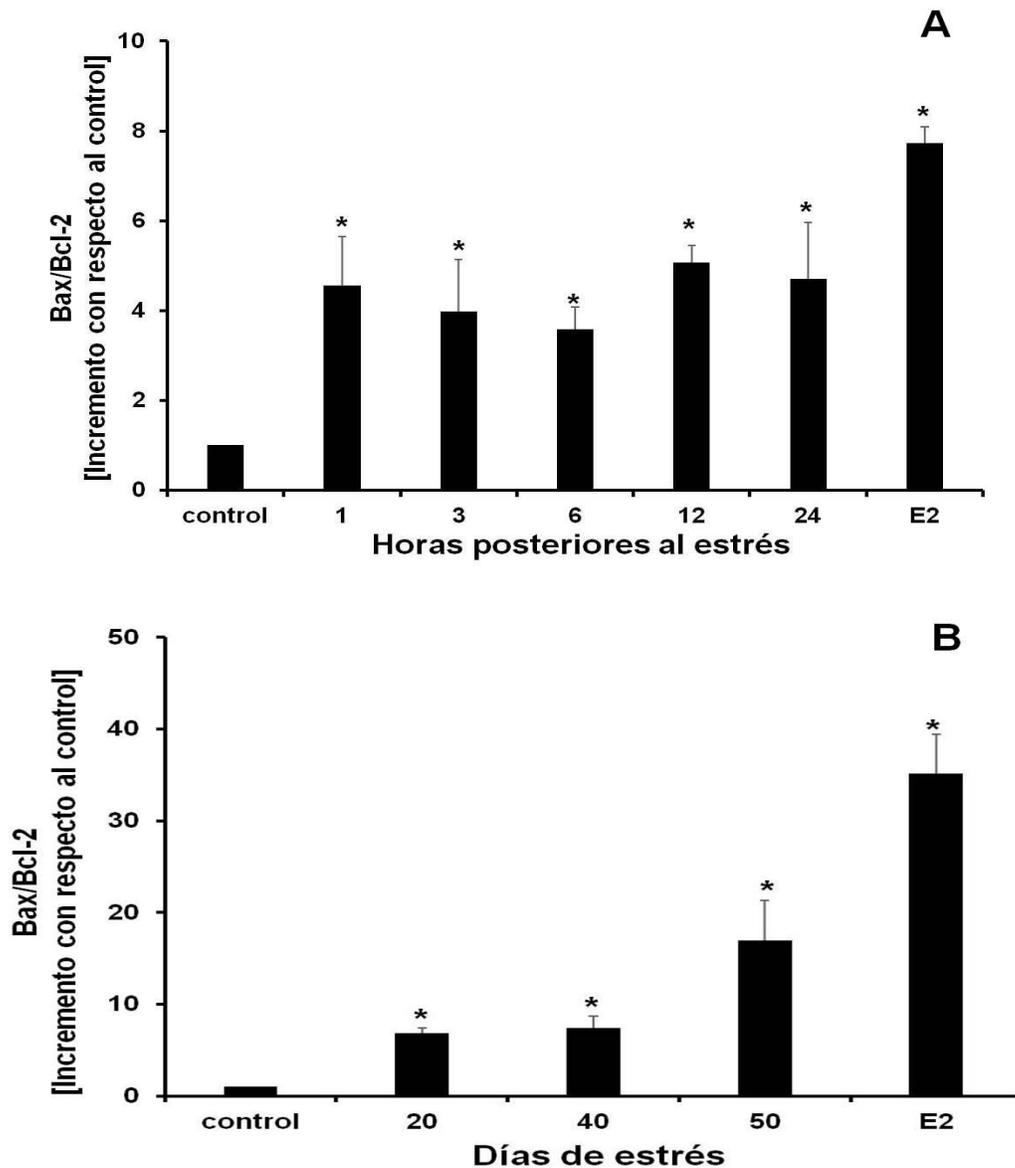


Figura 17. Relación relativa Bax/Bcl-2. En los machos expuestos a estrés agudo (A) y crónico (B), en el cociente óptico relativo entre Bax/Bcl-2 mostró un incremento significativo de Bax en relación con Bcl-2. Los datos son presentados como la expresión relativa entre Bax y Bcl-2. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar ( $X \pm E.E$ ) ( $n=5$ ) \* $p < 0.05$  comparados con el control.

## 10.5 Análisis espermático

La exposición al estrés agudo no causó modificaciones en ninguno de los parámetros analizados (tabla 4).

En los machos sometidos a estrés crónico, se observó entre  $68.8 \pm 2.8$  (día 20) y  $72.2 \pm 4.3\%$  (día 50) de espermatozoides vivos, estos porcentajes fueron significativamente menores que los observados en los machos del grupo control, en los cuales se observaron valores entre  $79.3 \pm 0.6$  y  $83.4 \pm 1.4\%$  de espermatozoides vivos (figura 18A). Con respecto a la concentración espermática, en los machos estresados de manera crónica se contaron entre  $77.2 \pm 9.4$  (día 20) y  $94.8 \pm 3.7$  (día 50) millones de espermatozoides por ml, valores significativamente menores que en los machos control, en los cuales se contaron entre  $108.3 \pm 2.0$  y  $137.5 \pm 6.1$  millones de espermatozoides por ml ( $p < 0.01$ ) (figura 18B).

En cuanto a la movilidad de los espermatozoides analizados por el equipo CASA, en los machos sometidos a estrés crónico se observó entre  $68.7 \pm 3.7$  (en el día 20) y  $72.1 \pm 4.1\%$  (en el día 50) de movilidad espermática total. Este porcentaje fue significativamente menor que los machos control ( $p < 0.01$ ), en los cuales se encontró entre  $83.8 \pm 1.0$  y  $84.7 \pm 1.2\%$  (figura 18C). El porcentaje de movilidad espermática progresiva de los machos sometidos a 20 días de estrés crónico, no fue significativamente diferente a su grupo control. En los machos expuestos a 40 y 50 días de estrés crónico, se observó  $27.6 \pm 2.1$  y  $35.6 \pm 1.0\%$  de movilidad espermática progresiva, respectivamente. Estos porcentajes fueron significativamente menores en comparación con los machos control ( $p < 0.01$ ), en

los cuales se observó  $37.0 \pm 2.3$  a  $44.0 \pm 2.2\%$  de movilidad progresiva (figura 18D).

Tabla 4. Efecto del estrés agudo en la viabilidad, concentración, movilidad total y progresiva de los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo de la rata.

	Control	1h post-estrés	3h post-estrés	6h post-estrés	12h post-estrés	24h post-estrés
Viabilidad (%)	$84.8 \pm 1.7$	$86.2 \pm 1.0$	$85 \pm 0.8$	$82.3 \pm 1.8$	$88.9 \pm 1.1$	$80.6 \pm 2.3$
Concentración ( $10^6/\text{ml}$ )	$116.5 \pm 2.5$	$115.7 \pm 11.1$	$118.1 \pm 8.4$	$101.3 \pm 6.7$	$108.7 \pm 8.5$	$117.2 \pm 9.2$
Movilidad total (%)	$80.8 \pm 2.8$	$78.2 \pm 1.7$	$77.8 \pm 1.0$	$78.7 \pm 2.6$	$75.4 \pm 1.8$	$73.5 \pm 1.8$
Movilidad progresiva (%)	$35.8 \pm 1.7$	$39.7 \pm 1.1$	$39.0 \pm 1.5$	$38.2 \pm 5.0$	$36.0 \pm 1.2$	$36.5 \pm 2.3$

Los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar ( $X \pm E.E$ ).

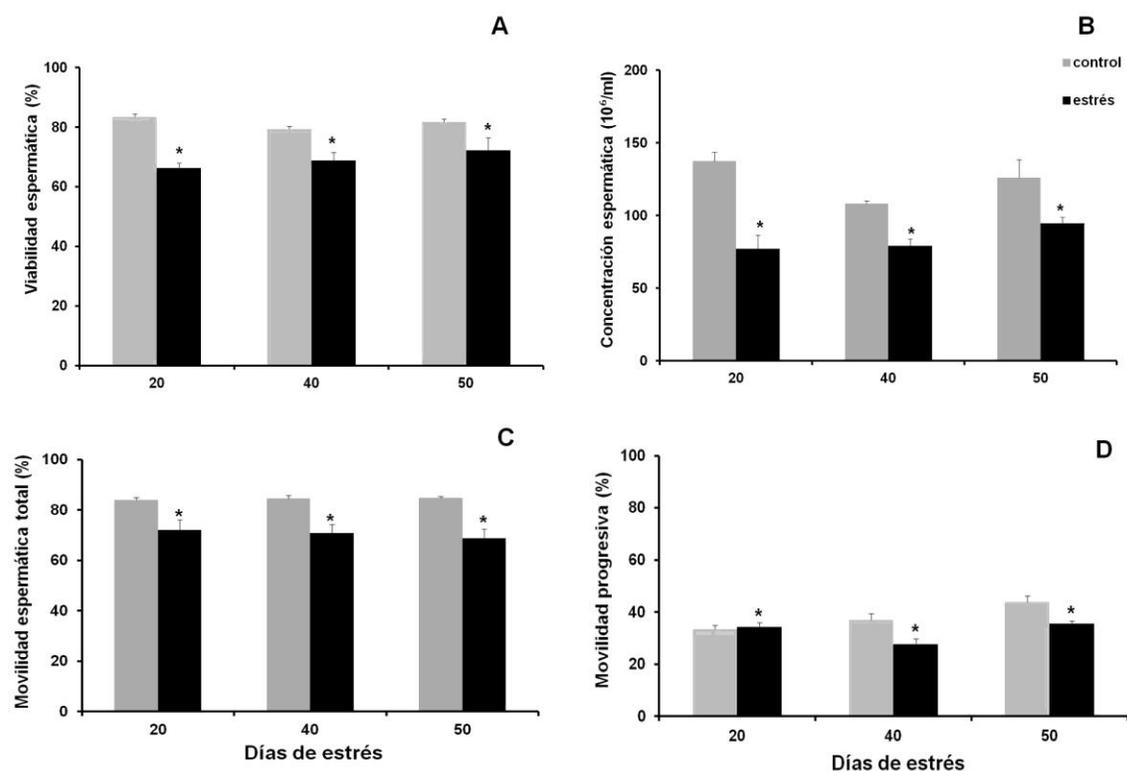


Figura 18. En: A) viabilidad espermática; B) concentración espermática; C) movilidad total y D) movilidad espermática progresiva de los espermatozoides epididimarios. Todos los parámetros fueron significativamente más bajos que el grupo control, respectivamente. Los datos se muestran como la media  $\pm$  error estándar ( $X \pm E.E$ ). Se analizaron con una ANOVA de dos vías, seguida por una prueba post hoc de Newman-Keuls \* $p < 0.01$

## 10.6 Concentración de corticosterona y testosterona

Como se muestra en la figura 19A, en los machos expuestos a estrés agudo, se observó una variación circadiana en la concentración sérica de corticosterona; tanto en el grupo control como en el grupo de estrés agudo (una hora posterior a la exposición al estresor) se observaron los niveles más altos de corticosterona, los cuales disminuyeron en las horas subsecuentes (3, 6 y 12 horas). Con respecto a la concentración sérica de testosterona, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de esta hormona (figura 19B).

En los machos sometidos a estrés crónico, se observaron valores entre  $38.8 \pm 1.08$   $\mu\text{g/dl}$  (día 20) y  $43.28 \pm 1.8$   $\mu\text{g/dl}$  (en el día 50) de corticosterona sérica. Esta concentración fue significativamente mayor que los machos control ( $p < 0.01$ ), en los cuales se encontró entre  $18.6 \pm 0.6$  y  $19.5 \pm 0.5$   $\mu\text{g/dl}$  de corticosterona (figura 19C). En cuanto a la concentración sérica de testosterona, se encontraron valores entre  $0.536 \pm 0.03$   $\text{ng/ml}$  (día 20) y  $0.21 \pm 0.02$   $\text{ng/ml}$  (día 50). Estos valores fueron significativamente menores que en los machos control ( $p < 0.01$ ), en los cuales se encontró entre  $2.07 \pm 0.08$  a  $2.20 \pm 0.12$   $\text{ng/ml}$  de testosterona sérica (figura 19D).

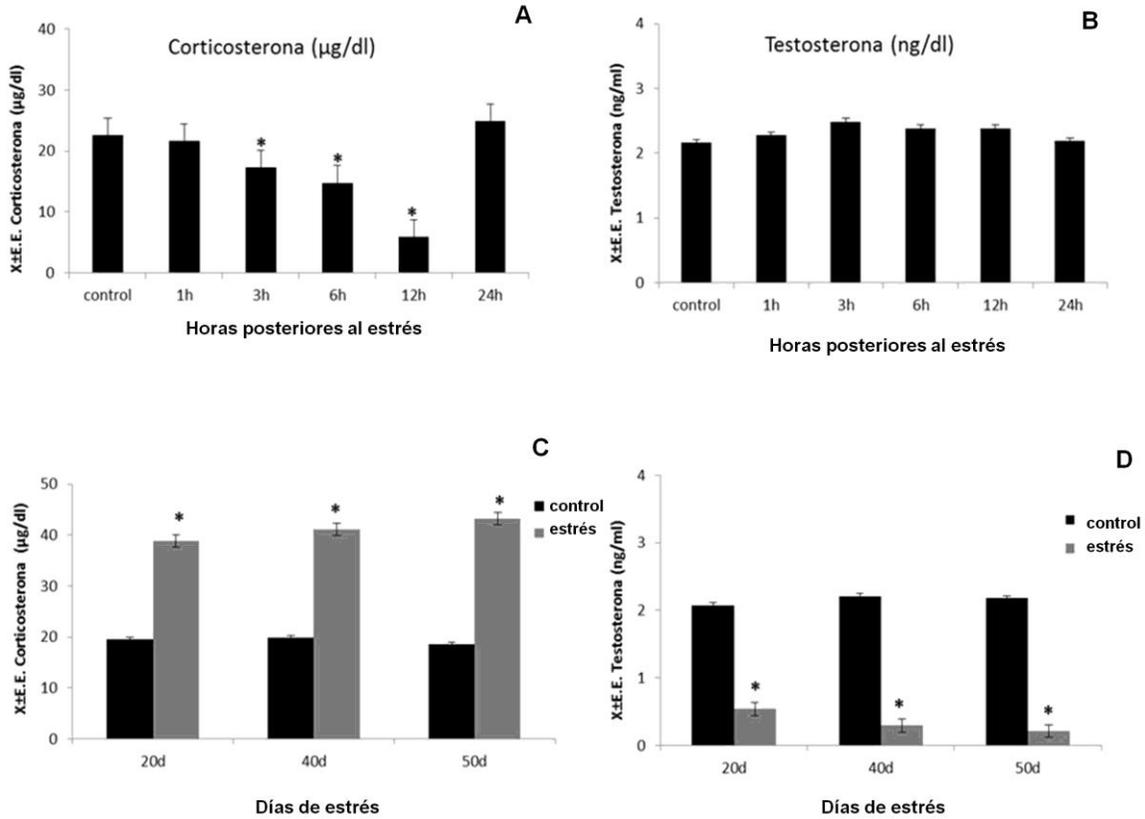


Figura 19. Concentración de corticosterona (A) y testosterona (B) del suero en los machos expuestos a estrés agudo. No se observaron cambios después de la exposición al estrés agudo en estas hormonas. En los machos sometidos a estrés crónico la concentración de corticosterona (C) incremento significativamente en comparación con los machos del grupo control ( $p < 0.01$ ). La concentración de testosterona durante el estrés crónico (D) fue significativamente más baja que en los machos del grupo control. Los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar ( $X \pm E.E$ ). Se analizaron con una ANOVA de dos vías, seguida por una prueba post hoc de Newman-Keuls  $*p < 0.01$ .

## 11.0 Discusión

En el presente estudio se demostró que la exposición al estrés por inmersión en agua fría activa tanto la vía intrínseca como la extrínseca de la apoptosis en las células testiculares. En los testículos de los machos expuestos a estrés agudo, se observó una mayor incidencia en el porcentaje de túbulos que contenían células germinales positivas a TUNEL desde de la primera hora, alcanzando un máximo 24 horas posteriores a la exposición al estresor. Al mismo tiempo, se observó un incremento en el número de células germinales positivas a TUNEL contenidas en dichos túbulos una hora posterior a la exposición al estresor, pero no en las siguientes horas. La evaluación de la apoptosis con la técnica de TUNEL reveló que probablemente las espermatogonias, espermatocitos primarios y espermatidas ubicadas en las etapas VI a VIII del ciclo del epitelio seminífero, fueron las más susceptibles de experimentar apoptosis. Resultados similares se han observado en testículos expuestos a hipotermia leve (30 min a 10°C), en donde las espermatogonias y espermatocitos primarios mostraron mayor incidencia en la aparición de la apoptosis dos horas después de la exposición al estresor (Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1997).

Los resultados de TUNEL son coherentes con el análisis del Western blot, que mostró un incremento significativo en el contenido de la caspasa 3 activa una hora posterior al estresor. La caspasa 3 pudo ser activada por el incremento en la concentración de la caspasa 8 activa (marcador extrínseco), desde una hora posterior a la exposición al estresor, lo cual es indicativo de la activación de la vía extrínseca. Diversos estudios han demostrado que el sistema Fas es un importante regulador de la apoptosis testicular (Lee y cols., 1997; Eid y cols.,

2002). En los testículos, el receptor Fas, se encuentra principalmente en la membrana de los espermatocitos primarios, espermatidas y células de Leydig (Pentikainen y cols., 1999; Porcelli y cols., 2006). Mientras que el FasL, es un ligando producido por las células de Sertoli (Lee y cols., 1997; Francavilla y cols., 2002). La unión de Fas/FasL induce la trimerización del receptor, promoviendo la formación del complejo inductor de la señal de muerte, conocido como DISC, mediante el reclutamiento de la proteína adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas). El complejo DISC recluta a la pro caspasa 8, la cual es procesada proteolíticamente a su forma activa; de esta manera la caspasa 8 puede activar a la caspasa 3 (Said y cols., 2004). Es probable, que la rápida inducción de la apoptosis en las células testiculares una hora posterior a la exposición al estresor, promueva la activación de la vía extrínseca de la apoptosis vía Fas, mediante vías de señalización específicas de las células de Sertoli (Nagata, 1999; Griswold y McLean, 2006), las cuales no han sido completamente esclarecidas.

Por otro lado, el incremento en el contenido de Bax así como la disminución de Bcl-2, ambos marcadores de la vía intrínseca, una hora posterior a la exposición al estresor indica que la vía intrínseca también es activada por el estrés agudo. Los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 han sido propuestos como moduladores de la supervivencia y muerte de las células germinales (Knudson y cols., 1995; Yan y cols., 2000; Mahmoud y cols., 2009). Esta familia está formada por proteínas proapoptóticas (Bax, Bad, Bak y Bid) y por proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, A1, Boo, Bcl-w, Mcl-1) (Maheswari y cols., 2009). Tanto Bax como Bcl-2 han sido implicados como importantes moduladores en la apoptosis de las

células germinales (Knudson y cols., 1995; Yamamoto y cols., 2000). Se ha demostrado que en condiciones normales, Bax se encuentra localizado en el citoplasma de espermatogonias, espermatocitos primarios y espermátidas (Yamamoto y cols., 2000). Mientras que Bcl-2 reside en la membrana mitocondrial externa, en donde regula su homeostasis e integridad. En respuesta a señales externas, Bax se transloca a la mitocondria y produce cambios en el potencial de membrana mitocondrial (Kroemer y cols., 1997), que conducen a la liberación del citocromo c (Verhagen y cols., 2000). En el citosol, el citocromo c interactúa con Apaf-1 y, en presencia de ATP, se forma el complejo conocido como apoptosoma, que recluta y activa a la pro caspasa 9 (Nuñez y cols., 1998), que a su vez activa a la caspasa 3 (Maheswari y cols., 2009), conduciendo así a la activación de la apoptosis. Es posible que el incremento de Bax en relación a Bcl-2, en todos los tiempos evaluados, promueva la activación de la apoptosis, a través de cambios producidos en la integridad de la membrana mitocondrial externa, que conducen a la liberación de moléculas con actividad proapoptótica, como el citocromo c, del espacio intermembranal al citoplasma, conduciendo así a una marcada activación de la apoptosis en las células testiculares de los machos expuestos a estrés agudo.

Con respecto al estrés crónico, los resultados de este estudio mostraron una mayor incidencia en el porcentaje de túbulos con células germinales positivas a TUNEL en todos los días evaluados (20, 40 y 50). Aunque la incidencia en el número de células germinales positivas a TUNEL no se incrementó, el porcentaje de túbulos seminíferos con células positivas a TUNEL sí, este efecto se mantuvo constante durante todos los días evaluados. Resultados similares han sido

reportados en ratas sometidas a estrés crónico por inmovilización (Yazawa y cols., 1999). La disminución en el número de células germinales positivas a TUNEL durante el estrés crónico puede deberse a una eficiente eliminación por fagocitosis de las células germinales apoptóticas. Esto se debe a que en el epitelio seminífero las células germinales que experimentan apoptosis, frecuentemente son degeneradas o pueden llegar a ser desprendidas hacia el lumen del túbulo (Sofikitis y cols., 2008), si esto no ocurre, las células de Sertoli pueden identificar y fagocitar a las células germinales que inician la apoptosis mediante el reconocimiento de la fosfatidilserina que se transloca a la superficie de tales células. Este reconocimiento se lleva a cabo a través del receptor carroñero tipo I (SR-BI), presente en la superficie de las células de Sertoli (Nakanishi y Shiratsuchi, 2004). Es Probable que este mecanismo se active para asegurar que las células germinales sanas continúen con su desarrollo y con la producción de espermatozoides.

En este estudio, la exposición al estrés crónico incremento el contenido de la caspasa 3 activa, de la caspasa 8 activa y Bax en los testículos. Al mismo tiempo, el contenido de Bcl-2 disminuyó en todos los días evaluados. Estos resultados indican que tanto la vía de señalización intrínseca como extrínseca están involucradas en la apoptosis de las células testiculares inducida por estrés, convergiendo a nivel de la caspasa efectora 3 (Kaufmann y cols., 2012). La caspasa 3 activa es una importante caspasa efectora debido a que su activación marca el punto de no retorno en la señal apoptótica (Earnshaw y cols., 1999). Se ha demostrado que la pro caspasa 3 se encuentra en el citoplasma de las espermatogonias, espermatocitos primarios y espermátidas, una vez activa, se

transloca desde el citoplasma hacia el núcleo de estas células en donde induce la activación de una endonucleasa, conocida como CAD (desoxiribonucleasa activada por caspasas). CAD degrada inicialmente el ADN, en fragmentos nucleosomales de 50 a 300 kilobases (Kb) y, posteriormente, en fragmentos de 180 a 200 pares de bases (pb), los cuales son característicos en células que se encuentran en las últimas etapas del proceso apoptótico. Este mecanismo ha sido observado en la apoptosis de células germinales inducida por disminución de la testosterona intratesticular (Kim y cols., 2001).

Es probable que la apoptosis observada en las células germinales testiculares de los machos expuestos a estrés crónico, ocurra por la vía extrínseca a través de la unión del FasL con Fas en la membrana celular o por la vía intrínseca a través del incremento en la relación Bax/Bcl-2 (Said y cols., 2004) o por el entrecruzamiento de las dos vías. Esto puede llevarse a cabo mediante la activación proteolítica de la proteína pro-apoptótica Bid, la cual se mantiene inactiva hasta que es cortada por la caspasa 8 (Said y cols., 2004; Kaufman y cols., 2012), generando el fragmento tBid (Bid truncado). Una vez activado, tBid se transloca a la mitocondria en donde interactúa con miembros proapoptóticos, quizá aumentando las concentraciones de Bax, promoviendo la liberación del citocromo c y, la subsecuente activación del complejo Apaf-1/caspasa-9, induciendo así la activación de la vía intrínseca (Nagata, 1999). El entrecruzamiento de ambas vías permite la amplificación de la cascada de caspasas para asegurar una eficiente eliminación de las células germinales dañadas (Kaufmann y cols., 2012).

Asimismo, la apoptosis observada en los testículos de los machos estresados crónicamente, también podría ser atribuida a la disminución en la concentración de la testosterona del suero observada en este estudio. En el presente trabajo, en el epitelio seminífero de los machos expuestos a estrés crónico, se observó que probablemente las espermatogonias, espermatocitos primarios y espermátidas redondas y alargadas, ubicadas en las etapas VII-VIII y XII-XIV del ciclo del epitelio seminífero, fueron las más susceptibles de experimentar apoptosis. Se ha demostrado, por estudios realizados en la rata, que las etapas VII y VIII dependen de concentraciones adecuadas de testosterona (Parviven, 1993; Sharpe, 1994). Por lo tanto, es probable que durante la exposición al estrés crónico por inmersión en agua fría, la disminución en la concentración de testosterona sea responsable, al menos en parte, de la activación de la apoptosis en las células germinales del epitelio seminífero de la rata (Russell y Clermont, 1977; Sinha y cols., 2003).

Diversos estudios han demostrado que tanto la FSH como la testosterona actúan como factores importantes de supervivencia en las células germinales (Russell y cols., 1987; Parvinen, 1993; Sharpe, 1994). Se ha reportado que la activación del sistema Fas en las células germinales, puede ser inducido por la disminución de testosterona o gonadotropinas (Ruwanpura y cols., 2008), por exposición al estrés por calor o por tratamientos quimioterapéuticos (Stiblar-Martinic y cols., 2009). En un estudio anterior se demostró que la disminución en la testosterona intratesticular induce la activación de la caspasa 3 en los espermatocitos primarios (Kim y cols., 2001) y producir fragmentación del ADN en

diferentes tipos de células testiculares, incluyendo a las células de Sertoli (Tesarik y cols., 2002).

Actualmente no existen estudios dedicados a evaluar el efecto del estrés por inmersión en agua fría en la activación de la apoptosis testicular, por lo que, este es el primer trabajo en demostrar que este estresor es un potente activador de la apoptosis en las células testiculares mediante la activación de la vía intrínseca y extrínseca. Sin embargo, es necesario ampliar este campo de estudio para esclarecer la participación de Fas/FasL así como de otros miembros proapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2, como Bid, en la apoptosis de las células testiculares.

En el presente trabajo, la disminución de la testosterona es explicada por el incremento de la corticosterona observada durante el estrés crónico, debido a que los glucocorticoides inhiben directamente la transcripción de genes que codifican a enzimas que participan en la síntesis de testosterona (Payne y Sha, 1991) como la  $3\beta$ -HSD y la  $17\alpha$ -hidroxilasa/17-20 liasa (Hales y Payne, 1989; Orr y cols., 1994). Asimismo, la excesiva exposición a la corticosterona induce apoptosis en las células de Leydig (Gao y cols., 2003), contribuyendo así con la reducción en la secreción de testosterona (Hardy y cols., 2005).

Además de esto, la apoptosis también puede ser inducida por los glucocorticoides, a través de la unión de estos con sus receptores citoplasmáticos, los cuales han sido identificados en los espermatocitos primarios, en las espermatidas y en las células de Sertoli (Schultz y cols., 1993). Resultados similares se han obtenido con el glucocorticoide sintético dexametasona que puede inducir apoptosis en las células germinales (Yazawa y cols., 2000), en

etapas específicas del ciclo del epitelio seminífero (VII-VIII), a través de la translocación citoplasmática de Bax hacia el núcleo de espermatogonias y espermatocitos primarios (Mahmoud et al., 2009), induciendo la activación de la vía intrínseca de la apoptosis.

Los glucocorticoides cuando entran a las células se unen al RG y forman el complejo esteroide-receptor. Este complejo se transloca al núcleo y actúa como un regulador de la transcripción. La regulación transcripcional inducida por los RGs pueden activar o inactivar la transcripción de múltiples genes (Greenstein y cols., 2002; Sionov y cols., 2006) involucrados con la supervivencia celular. Se ha propuesto que la inactivación involucra a factores de transcripción como c-jun/c-fos y NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B), que controlan varias vías de supervivencia. Es probable que la interacción del RG con estos factores tenga un papel importante en la activación de la apoptosis mediada por el RG (Sionov y cols., 2006). A pesar de esto, aún se desconocen los mecanismos involucrados en este proceso.

El incremento en la concentración de corticosterona puede estar relacionada con la activación de la apoptosis a través de un incremento en la generación de estrés oxidante, debido a que el estrés crónico por inmovilización provoca un incremento en la concentración de corticosterona así como en la generación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), peroxidación de lípidos y, al mismo tiempo, disminuye la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Dhanabalan y cols., 2010). En los testículos, el  $H_2O_2$  tiene la habilidad de inducir apoptosis en las células germinales testiculares involucrando al sistema Fas/FasL así como a las proteínas proapoptóticas: Bax,

Bid y Bad (Maheswari y cols., 2009). Por lo tanto, es probable que en los machos expuestos a estrés crónico, la disminución en la concentración de la testosterona del suero así como el incremento de la corticosterona, estén relacionados con la activación de la apoptosis en las células germinales testiculares a través del incremento en la generación de ERO y de estrés oxidante inducido en los testículos conduciendo a la activación tanto de la vía extrínseca como intrínseca de la apoptosis.

Con respecto al análisis de los espermatozoides epididimarios, el estrés crónico causó disminución en la viabilidad y en la concentración espermática, así como en la movilidad total y progresiva. Resultados similares fueron reportados por Saki y cols., en el 2009, quienes observaron que 50 días de estrés por nado forzado provoca disminución significativa en la concentración espermática, en la movilidad total y progresiva así como en la capacidad de fertilización. En el presente estudio los cambios producidos en la calidad y en la cantidad de espermatozoides almacenados en la cauda del epidídimo, se observaron desde el día 20 de estrés; este efecto se mantuvo relativamente constante durante los días 40 y 50 de exposición al estresor. Estos resultados podrían ser explicados tanto por el incremento de corticosterona así como por la disminución de testosterona debido al estrés crónico.

En el epidídimo, los espermatozoides experimentan cambios durante su proceso de maduración, ellos adquieren movilidad, condensación final del núcleo y capacidad de fertilizar. Estos procesos son todos dependientes de andrógenos, principalmente de testosterona y DHT. La privación de andrógenos provoca

pérdida de la movilidad espermática, de la capacidad de fertilización y eventualmente mueren (Robaire y cols., 2006).

La reducción en la concentración espermática del epidídimo puede estar relacionada con la disminución de la testosterona observada en el presente estudio. En los testículos, la disminución de testosterona afecta la conversión de las espermátidas redondas a elongadas durante la espermiogénesis en las etapas VII a VIII y provoca su desprendimiento prematuro, inhibiendo su proceso de elongación (O'Donnell y cols., 1996), esto puede provocar un aumento en la incidencia de apoptosis en las células germinales (Russell y Clermont, 1977), conduciendo a una gran pérdida de células germinales (Sinha y Swerdloff, 1993). Por lo que, eventualmente, disminuye la concentración de espermatozoides maduros almacenados en la cauda del epidídimo. Asimismo, la disminución en la viabilidad espermática que se observó en este estudio, podría deberse a los cambios producidos en el microambiente luminal interno del epidídimo, debido a que la condición oxidante como resultado del incremento de la corticosterona, provoca que los espermatozoides sean constantemente atacados por las ERO, principalmente por el  $H_2O_2$ , induciendo fragmentación del ADN y alteraciones en la membrana plasmática. Es probable que otros mecanismos puedan ser activados, tal como la apoptosis, con la finalidad de eliminar espermatozoides que contengan algún tipo de daño o aberración cromosomal. Por lo tanto, es probable que durante la exposición al estrés crónico, tanto la espermatogénesis como la maduración espermática sean severamente afectadas.

Por otro lado, la corticosterona liberada durante el estrés crónico puede afectar el medio ambiente interno del epidídimo debido a que los RG han sido

identificados en el citoplasma y núcleo de las células epiteliales (Schultz y cols., 1993; Silva y cols., 2010). La corticosterona induce la producción de ERO e incrementa la peroxidación de lípidos en el epidídimo (Dhanabalan y cols., 2010; 2011) esto podría explicar la disminución en la movilidad espermática y progresiva de los espermatozoides observada en este estudio. Los espermatozoides son susceptibles a la oxidación de lípidos causado por las ERO debido a que su membrana plasmática es rica en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son necesarios para mantener la fluidez de los espermatozoides. La disminución en la actividad de la SOD y CAT en el epidídimo puede causar que los espermatozoides sufran peroxidación de lípidos en sus membranas. Esto puede causar defectos en la pieza media (Rao y cols., 1989), disminución en la movilidad (Alvarez y Storey, 1982) por defectos en el axonema (De Lamirande y Gagnon, 1992a) y disminución de ATP (De Lamirande y Gagnon, 1992b).

Nuestros resultados nos indican que el estrés agudo y crónico causa apoptosis en las células testiculares. La apoptosis testicular puede ser activada por ambas vías de señalización, ya que el incremento de la caspasa 8 activa indica la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. Mientras que, el incremento de Bax así como con la disminución de Bcl-2, sugiere que la apoptosis también puede ser activada por la vía intrínseca. Debido a que ambas vías convergen en la activación de la caspasa 3, nuestros resultados indican que el estrés es capaz de activar tanto la vía intrínseca como extrínseca de la apoptosis en las células testiculares. Este proceso parece estar relacionado con el incremento de la corticosterona así como con la disminución de la testosterona. Con respecto a los espermatozoides epididimarios, la disminución de la viabilidad

y concentración espermática así como la movilidad total y progresiva observada en los machos expuestos a estrés crónico, sugiere que el estrés también afecta la calidad espermática, probablemente a través de efectos directos en el epidídimo.

## **12.0 Conclusión**

La exposición al estrés agudo y crónico por inmersión en agua fría induce apoptosis en las células testiculares, a través de la activación de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Además, el estrés crónico disminuye la calidad y cantidad de los espermatozoides epididimarios. Estos cambios pueden estar relacionados, al menos en parte, con la disminución de testosterona y con el incremento de corticosterona.

### 13.0 Bibliografía

Almeida, A.S., Anselmo-Franci, J.A., Rosa-e Silva, A.A.M., Lamano-Carvalho, T.L. 1998. Decreased spermatogenic and androgenic testicular functions in adult rats submitted to immobilization-induced stress from prepuberty. *Braz J Med Biol Res* 31:1443-1148.

Almeida, C., Correia, S., Rocha, E., Alves, Â., Ferraz, L., Silva, J., Sousa, M., Barros, A. 2013. Caspase signalling pathways in human spermatogenesis. *J Assist Reprod Genet* 30: 487-495.

Alvarez, J.G., Storey, B.T. 1982. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol Reprod* 27: 1102-1108.

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

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

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

Bartke, A. 1995. Apoptosis of male germ cells a generalized or a cell type-specific phenomenon. *Endocrinol.* 136: 3-4.

Barret, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., Brooks, H. 2013. Fisiología del aparato reproductor masculino. En: Barret, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., Brooks, H. *Ganong fisiología médica. Vigésimo cuarta edición.* MacGraw-Hill, pp 419.

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

Blanco-Rodriguez, J., Martínez-García, C. 1997. Mild Hypothermia induces apoptosis in rat testis at specific stages of the seminiferous epithelium. *J. of Androl.* 18(5): 535 – 539.

Blatt, N. B., Glick. G. C. 2001. Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorg. Med. Chem.* 9: 1371-1384.

Braun, R. E. 1998. Early sperm is sacred or is it?. *Nat. Genet.* 18: 202-204.

Briski, K.P., Sylvester, P.W. 1994. Antagonism of type II but not type I glucocorticoid receptors results in elevated basal luteinizing hormone release in male rats. *Neuroendocrinol* 60: 601-608.

Cascales-Angosto, M. 2003. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real. Acad. Nal. Farm.* 69 (1): 35-64.

Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev. Physiol.* 67: 259-284.

Chen, Y., Wang, Q., Wang, F-F., Gao, H-B., Zhang, P. 2012. Stress induces glucocorticoids-mediated apoptosis of rat Leydig cells. *Stress.* 15(1): 74-84.

Chrousos, G. P., Gold, P. W. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267: 1244-1252.

Chrousos, G. P. 2002. Organization and integration of the endocrine system. In *pediatric Endocrinol*, ed. M. Sperling, pp 1-14. Philadelphia: Saunders.

Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals. *Physiol. Rev.* 52: 198-204.

Cornwall, G. A. 2009. New insights into epididymal biology and function. *H. Reprod. Up.* 15(2): 213-227.

Dacheux, J-L., Dacheux, F. 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reprod and Fert.* 147: R27-42.

Dacheux, J.L., Paquignon, M. 1980. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reprod. Nutrit. Develop.* 20: 1085-1099.

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

de Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., Wreford, N. 1998. Spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 13(1): 1-8.

De Lamirande, E., Gagnon, C. 1992a. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 13: 368-378.

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

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

Dhanabalan, S., D'cruz, S.C., Mathur, P.P. 2010. Effect of corticosterona and 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin on epididymal antioxidant system in adult rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24: 242-249.

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

Dong, Q., Salva, A., Sottas, C. M., Niu, E., Holmes, M., Hardy, M. P. 2004. Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization. *J. of Androl.* 25(6): 973-981.

Dubin, M., Stoppani, A.O.M. 2000. Muerte celular programada y apoptosis. Función de las mitocondrias. *Medicina* 60: 375-386

Dufau, M. L. 1997. The luteinizing hormone receptor. In: Payne, A. H., Hardy, M. P. Russell, L. D. *The Leydig cell.* Vienna, IL: Cache River Press; 333- 350.

Earshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68: 383-424.

Eid, N.A.S., Shibata, M-A., Ito, Y., Kusakabe, K., Hammad, H., Otsuki, Y. 2002. Involvement of Fas system and active caspases in apoptotic signaling in testicular germ cells of ethanol-treated rats. *Int J Androl.* 25: 159-167.

Eddy, E.M. 2006. The spermatozoon. In: Neils. J.D., Plant, M.T., Donald, W.P., Challis, J.G.C., de Kretser, D.M., Richards, J.S., Wassarman, P.M. (Eds). *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*, third ed. Academic Press, St. Louis, pp 3-5.

Fenster, L., Katz, D. F., Wyrobek, A. J., Pieper, C., Rempel, D. M., Oman, D., Swan, S. H. 1997. Effects of psychological stress on human semen quality. *J. Androl.* 18: 194 -202.

Fernández, C. D. B, Porto, E. M., Arena, A. C., Kempinas, W. G. 2007. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *Inter. J Androl.* 31: 427-437.

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

Francavilla, S., D'Abrazio, P., Cordeschi, G., Pelliccione, F., Necozone, S., Ulisse, S., Properzi, G., Francavilla, F. 2002. Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* 8: 213-220.

Frenette, G., Legare, C., Saez, F., Sullivan, R. 2005. Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Mol. Hum. Reprod.* England, pp 575-582.

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

Gerhard, I., Lenhard, K., Eggert-Kruze, W., Runnebaum, B. 1992. Clinical data which influence seminal parameters in infertile men. *Hum. Reprod.* 7: 830-837.

Greenstein, S.K., Ghias, L., Krett, L., Rosen, S.T. 2002. Mechanisms of glucocorticoids-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res* 8: 1681-1694.

Griffin, J.E., Wilson, J.D. 2003. Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: P.R. Larsen, H. M. Kronenberg, S., Melmed, K.S., Polonky (Eds). *Williams textbook of Endocrinol*, Saunders, pp 709-769.

Griswold, M. D., McLean, D. 2006 The Sertoli cell. In: Neils. J.D., Plant, M.T., Donald, W.P., Challis, J.G.C., de Kretser, D.M., Richards, J.S., Wassarman, P.M. (Eds). *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*, third ed. Academic Press, St. Louis, pp

Habib, K. E., Gold, P. W., Chrousos, G, P. 2001. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 30: 695-728.

Hales D. B., Payne, A. H. 1989. Glucocorticoid-mediated repression of P450<sub>scc</sub> mRNA and de novo synthesis in cultured Leydig cells. *Endocrinol.* 124: 2099-2104.

Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., Simons, K. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell. Biol.* 141: 929-942.

Hardy, M. P., Hui-Bao, G., Qiang, D., Renshan G., Qian W., Wei R.Ch., Xing F. 2005. Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res.* 322, 147-153.

Hawes, W.E., Conn, P. M. 1993. Assessment of the role of G proteins and inositolphosphate production in the action of gonadotropin-releasing hormone. *Clin. Chem.* 39: 325-332.

- Hengartner, O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407: 770-776.
- Henriksen, K., Kangasniemi, M., Parvinen, M. 1996. In vitro follicle-stimulating hormone prevents apoptosis and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage specific fashion. *Endocrinol.* 132: 2607-2613.
- Hermo, L., Robaire, B. 2002. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire, B., Hinton, B. T. *The epididymis-from molecules to clinical practice*. Kluwer Academic/Plenum Publisher. N. Y. pp 81-102.
- Hess, R. A., de Franca, L. R. 2008. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng, C. Y. (ed). *Molecular mechanism in spermatogenesis*. Landes Biosci and Springer. Pp 1-15.
- Inskeep, P.B., Hammerstedt, R.H. 1982. Changes in metabolism of ram sperm associated with epididymal transit or induced by exogenous carnitine. *Biol Reprod.* 27: 735-743.
- Jeong, K-H., Kaiser, U. B. 2006. Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin biosynthesis and secretion. In: Neils. J.D., Plant, M.T., Donald, W.P., Challis, J.G.C., de Kretser, D.M., Richards, J.S., Wassarman, P.M. (Eds). *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*, third ed. Academic Press, St. Louis, pp 1635-1637.
- Johnson, E.O., Kamilaris, T. C. Chrousos, G. P., Gold, P. W. 1992. Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16, 115 – 130.
- Justel, N. R., Bentosela, M., Mustaca, A. E. 2009. Comportamiento sexual y ansiedad. *R. Lat. Psi.* 41(3): 429-444.
- Kaufman, T., Strasser, A. and Jost. P. J. 2012. Fas death receptor signaling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death and Different.* 19: 42-50.
- Keller-Wood, M., Dallman, M. 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrinol. Rev.* 5: 1-24.
- Kerr, J. B., Loveland, K. L., O'Bryan, M. K., de Kretser, D.M. 2006. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: Neils. J.D., Plant, M.T., Donald, W.P., Challis, J.G.C., de Kretser, D.M., Richards, J.S., Wassarman, P.M. (Eds). *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*, third ed. Academic Press, St. Louis, pp 829-59.
- Kim, J.M., Ghosh, S.R., Weil, A.C.P., Zirkin, B.R. 2001. Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinol.* 142 (9): 3809-3816.

Klinefelter, G. R. 2002. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: Robaire, B., Hinton, B. T. The epididymis-from molecules to clinical practice. Kluwer Academic/Plenum Publisher. N. Y. pp 353-369.

Knudson, C. M., Tung, K. S. K., Toutellotte W. G., Brown G. A. J., Korsmeyer, S. J. 1995. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Sci*. 270: 96-99.

Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S. A. 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today*. 18: 44-51.

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

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

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

Lee, J., Richburg, J. H., Younkin, S. C., Boekelheide, K. 1997. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinol*. 138: 2081-2088.

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

Lucio, R.A., Tlachi, J.L., López, A. A., Zempoalteca, R., Velázquez-Moctezuma, J. 2009. Análisis se los parámetros del eyaculado en la rata Wistar de laboratorio: descripción de la técnica. *Vet. Méx*. 40(4): 405-415.

Lue, Y.H, Amiya, P., Sinha-Hikim, R.S., Swerdloff, P.I., Khay, S. T., Tan, B., Andrew, L., Wang, C. 1998. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinol*. 140(4):1709-1717.

Maheshwari, A., Misro, M.M., Aggarwal, A., Sharma, R.K., Nandan, D. 2009. Pathways involved in testicular germ cell apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*. *J FEBS* 276: 870-881.

Mahmoud, H., Mahmoud, O., Layasadat, K., Naeim, A. 2009. Dexamethasone effects on Bax expression in the mouse testicular germ cells. *Fol. Histochem. Et. Cytobiol*. 47(2): 237-241.

McEwen, B. S. 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. 87: 873-904.

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

Morisawa, M. 1994. Cell signaling mechanism for motility. *Zoo. Sci.* 11: 647- 662.

Mucio-Ramírez, J. S. 2007. La neuroquímica del estrés y el papel de los peptidos opioides. *REB.* 26(4): 121-128.

Nagata, S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet.* 33: 29-55.

Nakanishi, Y., Shiratsuchi, A. 2004. Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol Pharm. Bull.* 27(1): 13-16.

Nirupama, M., Devaki, M., Nirupama, R., Yajurvedi, H.N. 2012. Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *J. Physiol. Biochem.* 69(1): 59-68.

Núñez, G., Benedict, M. A., Hu, Y., Inohara, N. 1998. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17: 3237-3245.

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

O'Donnell, L., Meachem, S. J., Stanton, P. G., McLachlan, R. I. 2006. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: Neils. J.D., Plant, M.T., Donald, W.P., Challis, J.G.C., de Kretser, D.M., Richards, J.S., Wassarman, P.M. (Eds). *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*, third ed. Academic Press, St. Louis, pp 1017-1037.

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

Parvinen, M. 1993. Cyclic function of Sertoli cells. In: Russell, L. D., Griswold, M. D. 1993. Clearwater, FL: Cache River Press. pp. 331-347.

Payne, A.H., Sha, L.L. 1991 Multiple mechanism for regulation of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase, 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450, and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultures of mouse Leydig cells. *Endocrinol.* 129(3): 1429-35.

Pentikainen, V., Erkkila, K., Dunkel, L. 1999. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am. J. Physiol.* 276: 310-316.

Porcelli, F., Megiollaro, D., Carnevali, A., Ferrandi, B. 2006. Fas ligand in bull ejaculated spermatozoa: A quantitative immunohistochemical study. *Acta Histochem.* 13: 287-292.

Rao, B., Sourfir, J.C., Martin, M., David, G. 1989. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gametes Res* 24: 127-134.

Ren, L., Li, X., Weng, Q., Trisomboon, H., Yamamoto, T., Pan, L., Watanabe, G., Taya, K. 2010. Effects of acute restrain stress on sperm motility and secretion of pituitary adrenocortical and gonadal hormones in adult male rats. *J Vet Med Sci* 72(11): 1501-1506.

Retana-Marqu ez, S, Bonilla-Jaime, H., V azquez-Palacios, G., Martínez-García, R., Velazquez-Moctezuma, J. 2003. Changes in masculina sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Horm. and Behav.* 44: 327-337.

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

Riccioli, A., Salvati, L., D'Alessio, A., Starace, D., Giampietri, C., De Cesaris, P., Filippini, A., Ziparo, E. 2003. The Fas system in the seminiferous epithelium and its possible extra-testicular role. 35: 64-70.

Robaire, B., Hinton, B.T., Orgebin-Crist, M.C. 2006. The epididymis. In: Neils. J.D., Plant, M.T., Donald, W.P., Challis, J.G.C., de Kretser, D.M., Richards, J.S., Wassarman, P.M. (Eds). *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*, third ed. Academic Press, St. Louis, pp 1071-1148.

Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Dix DJ. 2001. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol Reprod* 65: 229-239.

Russell, L. D., Alger, L. E., Nequin, L. G. 1987. Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinol.* 120: 1615-1632.

Russell. L. M., Clermont, Y. 1977. Degeneration of germ cell in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat. Rec.* 187: 347-366.

Russell, L. D., Ettlin, R.A., Sinha, H.A.P. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater. Cache River Press.

Ruwanpura, S. M., McLachlan, R. I., Mattiesson, K. L., Meachem, S. J. 2008. Gonadotrophins regulate germ cell survival, not proliferation, in normal adult men. *Hum. Reprod.* 23: 403-411.

Said, T. M., Paasch, U., Glander, H. J., Agarwarl, A. 2004. Role of caspases in male infertility. *H. Reprod. U.* 10: 39-51.

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

Salpolsky, R. M. 1985. Stress-induced suppression of testicular function in the wild baboon: role of glucocorticoids. *Endocrinol.* 116: 2273-2278.

Sasagawa, I., Yazawa, H., Suzuki, Y., Nakada, T. 2001. Stress and testicular germ cell apoptosis. *Arc Androl.* 47: 211-216.

Schultz, R., Isola, J., Parvinen, M., Honkaniemi, J., Wikström A. Ch., Gustafsson, J. A., Pelto-Huikko, M. 1993. Localization of the glucocorticoid receptor in testis and accessory sexual organs of male rat. *Molecular and cellular Endocrinol.* 95: 115-120.

Selye, H., 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrinol.* 6: 117 – 230. In: Johnson, E.O., Kamilaris, T. C. Chrousos, G. P., Gold, P. W. 1992. Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16, 115 – 130.

Shaha, C., Tripathi, R., Mishra, D. P. 2010. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Rev. Phil. Trans. R. Soc.* 365: 1501-1515.

Shalet, S. M. 2009. Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatr Blood Cancer.* 53: 285-288.

Sharpe, R. M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Neils. J.D., Plant, M.T., Donald, W.P., Challis, J.G.C., de Kretser, D.M., Richards, J.S., Wassarman, P.M. (Eds). *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*, third ed. Academic Press, St. Louis, pp 1363-1434.

Sharpley, C. F. 2009. Neurobiological pathways between chronic stress and depression: dysregulated adaptive mechanism? *Clin. Med: Psy.* 2: 33-45.

Shetty, J., Marathe, G.K., Dighe, R. R. 1996. Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinol.* 137: 2179 -2182.

Silva, E.J., Queiróz, D. B.C., Honda, L., Avellar, M.C.W. 2010. Glucocorticoid receptor in the rat epididymis: expression, cellular distribution and regulation by steroid hormones. *Mol. and Cell Endocrinol.* 325: 64-77.

Sinha, A.A.P., Swerdloff, R.S. 1993. Temporal and stage-specific changes in spermatogenesis of rat after gonadotropin deprivation by a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinol.* 133: 2161-2170.

Sinha, H.A.P., Rajavashisth, T.B., Sinha Hikim, I., Lue, Y., Bonavera, J.J., Leung, A., Wang, C., Swerdloff, R.S. 1997. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol. of Reprod.* 57: 1193-1201.

Sinha, H.A.P., Lue, Y., Diaz-Romero, M., Yen, P.H., Wang, C., Swerdloff, R.S. 2003. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J Ster Biochem and Mol Biol.* 85: 175-182.

Sionov, R.V., Cohen, O., Kfir, S., Zilberman, Y., Yefenof, E. 2006. Role of mitochondrial glucocorticoids receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med* 203 (1): 189-201.

Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P., Baltogiannis D., Giannakis, D., Pardalidis, N. 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J. Ster. Biochem. and Mol. Biol.* 109: 323-330.

Stiblar-Martincic. D. 2009. Morphometrical evaluation of germ cell apoptosis in infertile men. *Folia Biol. (Praha).* 55: 233-237.

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

Tesarik, J., Matinez, F., Rienzi, L., Lacobelli, M., Ubaldi, F., Mendoza, C., Greco, E. 2002. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Hum. Reprod.* 17: 1811-1819.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 76(9): 4350-4354.

Travis, A. J., Foster, J.A., Rosenbaum, N.A., Visconti, P.E., Gerton, G.L., Kopf, G.S., Moss, S.B. 1998. Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Mol Bio Cell.* 9: 263-276.

- Tsigos, C., Chrousos G. P. 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. of Psych. Res.* 53, 865 – 871.
- Ulrich-Lai Y. M., Herman, J.P. 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress response. *Nature Rev. Neurosci.* 10: 397-409.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Vaux, D. L. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 102: 43-53.
- Wang, D.H., Hu, J.R., Wang, L.Y., Hu, Y.J., Tan, F.Q., Zhou, H. 2012. The apoptotic function analysis of p53, Apaf1, caspase3 and caspase7 during the spermatogenesis of the Chinese fire-bellied newt *cynops orientalis*. *PLoS One* 7:e39920.
- Woodward, C., Emery, P. W. 1988. Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 419: 280 - 284.
- Yamamoto, C- M., Sinha, H. A. P., Huynh, P. N., Shapiro, B., Lue, Y., Salameh, W. A., Wang, C., Swerdloff, R. S. 2000. Redistribution of Bax is an early step in an apoptotic leading to germ cell death in rats, triggered by mild testicular hyperthermia. *Biol. Reprod.* 63: 1683- 1690.
- Yan, W., Suominen, J., Samson, M., Jegou, B., Toppari, J. 2000. Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cell in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 165: 115-129.
- Yazawa, H., Sasagawa, I., Ishigooka, M., Nakada, T. 1999. Effect of immobilization stress on testicular germ cell apoptosis in rats. *Human Reprod.* 14(7): 1917-1920.
- Yazawa, H., Sasagawa, I., Nakada, T. 2000. Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. *Human Reprod.* 15 (9): 1917-1920
- Zhang, Z., Short, R.V., Meehan, T., De Kretser, D.M., Renfree, M.B., Loveland, K.L. 2004. Functional analysis of the cooled rat testis. *J Androl* 25: 57-68

## 14.0 Apéndice

- **Soluciones para Disección y fijación de tejidos**

### Preparación de reactivos

#### **Solución amortiguadora de fosfatos salino (PBS)**

Pesar

- 8.06 g de cloruro de sodio (NaCl)
- 0.2 g de cloruro de potasio (KCl)
- 1.44 g de fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 0.24 g de fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.4 con HCl.

Aforar a 1000 ml.

#### **Paraformaldehído al 4%**

Pesar

- 40 g de paraformaldehído

Disolver en 800 ml de PBS (previamente preparado), para disolverlo sin necesidad de calentar, agregar NaOH agitar vigorosamente hasta que se disuelva, aforar a 1000 ml y ajustar el pH a 7.4.

- **Soluciones para TUNEL**

#### **Buffer de fosfatos salino (PBS), pH 7.4**

Para preparar 1000 ml, pesar:

8.06 g de cloruro de sodio (NaCl)

0.2 g de cloruro de potasio (KCl)

1.44 g de fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

0.24 g de fosfato de sodio ( $K_2HPO_4$ )

Disolver en 800 ml de agua desionizada, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1000 ml.

### **Proteinasa K**

Preparar Tris-HCl 10 mM/EDTA 0.1 mM, para preparar Proteinasa K a una concentración de 20 µg/ml

Para preparar 5 ml, pesar:

0.00187 g de EDTA

0.1211 g de Tris-HCl

Disolver en aproximadamente 3 ml de agua desionizada, ajustar a pH 8.0 y aforar a 5 ml.

Tomar 500 µl de la solución anterior y desechar 0.55 µl de la misma, agregar 0.55 µl de Proteinasa K.

### **Solución de permeabilización**

Preparar una solución de Tritón X-100 al 0.1%/Citrato de sodio al 0.1%\*.

Para preparar 10 ml, disolver:

0.1 g de citrato de sodio en 10 ml de agua desionizada, no ajustar pH.

Desechar 10 µl de la solución de citrato de sodio y agregar 10 µl de Tritón X-100.

\*Nota: mantener las soluciones en refrigeración y cubrir los frasquitos con papel aluminio o colocarlos en frascos ámbar.

- **Soluciones para el Western blot**

### **Extracción de proteínas:**

**Buffer de lisis, para 25 ml pesar:**

0.197 g Tris-HCl

0.1753 g NaCl

0.125  $\mu$ l IGEPAL 0.5%

Ajustar a pH 8.0 y agregar:

0.105 g NaF

0.006 g  $\text{NaVO}_3$

Finalmente agregar 80  $\mu$ l de cocktail anti-proteasa (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail), 1 pastilla en 2 ml de agua desionizada.

### **Preparación de los geles**

#### **Solución acrilamida-bis:**

14.6 g Acrilamida

0.4 g Bis-acrilamida

Disolver en 50 ml de agua desionizada

#### **SDS al 10%**

10 g SDS

Disolver en 100 ml de agua desionizada

Almacenar a temperatura ambiente

#### **Persulfato de amonio al 10%**

1 g Persulfato de amonio

Disolver el 10 ml de agua desionizada

Preparar sólo lo necesario o guardar por 10 días a 4°C

#### **Solución 1.5 M Tris-HCl pH 8.8**

18.17 g Tris-base

Ajustar a pH 8.8 con HCl y aforar a 100ml con agua desionizada

Almacenar a 4°C

#### **Solución 0.5 M Tris-Hcl pH 6.8**

6 g Tris-base

Ajustar a pH 6.8 con HCl y aforar a 100ml con agua desionizada

Almacenar a 4°C

### **Buffer para muestras 4X**

SDS Protein Gel Loading Solution 2x, Quality Biological, Inc

### **Buffer de electroforesis**

6.05 g de Tris-base

28.8 g de glicina

1 g de SDS

Aforar a 1000 ml con agua desionizada

No ajustar pH

### **Buffer de transferencia**

3.03 g de Tris-base

14.4 g de glicina

200 ml de metanol

Aforar a 1000 ml con agua desionizada

No ajustar el pH

### **TBS**

2.42 g de Tris-base

8 g de NaCl

Ajustar pH a 7.6 y aforar a 1000 ml con agua desionizada

### **TBS-Tween 20 0.05%**

0.5 ml de Tween 20 en 1000 ml de TBS

### **Leche al 5%**

2 g de leche descremada en 40 ml de TBS-Tween 20

- **Soluciones para el análisis espermático**

Agua destilada

Solución salina fisiológica al 0.9%

**Buffer de fosfatos salino (PBS) 0.01 M, pH 7.4**

Para preparar 1000 ml, pesar:

8.06 g de cloruro de sodio (NaCl)

0.2 g de cloruro de potasio (KCl)

1.44 g de fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

0.24 g de fosfato de sodio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )

Disolver en 800 ml de agua desionizada, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1000 ml.

**Colorante eosina-nigrosina:**

Para preparar 100 ml, pesar:

1g de eosina

5g de nigrosina

2.9g de citrato de sodio

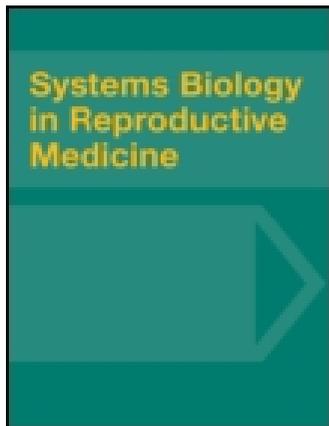
Disolver en 100 ml de agua destilada, filtrar siempre antes de usar.

This article was downloaded by: [Socorro Retana-Márquez]

On: 15 August 2015, At: 19:55

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: 5 Howick Place, London, SW1P 1WG



[Click for updates](#)

## Systems Biology in Reproductive Medicine

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/iaan20>

### Intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in rat testis by cold water immersion-induced acute and chronic stress

Adriana Lizbeth Juárez-Rojas<sup>a</sup>, Mario García-Lorenzana<sup>b</sup>, Andrés Aragón-Martínez<sup>d</sup>, Luis Enrique Gómez-Quiroz<sup>c</sup> & María del Socorro Retana-Márquez<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Biología Experimental,

<sup>b</sup> Departamento de Biología de la Reproducción,

<sup>c</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico, and

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

Published online: 14 Aug 2015.

To cite this article: Adriana Lizbeth Juárez-Rojas, Mario García-Lorenzana, Andrés Aragón-Martínez, Luis Enrique Gómez-Quiroz & María del Socorro Retana-Márquez (2015) Intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in rat testis by cold water immersion-induced acute and chronic stress, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61:4, 211-221, DOI: [10.3109/19396368.2015.1030473](https://doi.org/10.3109/19396368.2015.1030473)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/19396368.2015.1030473>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

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

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

RESEARCH ARTICLE

## Intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in rat testis by cold water immersion-induced acute and chronic stress

Adriana Lizbeth Juárez-Rojas<sup>1</sup>, Mario García-Lorenzana<sup>2</sup>, Andrés Aragón-Martínez<sup>4</sup>, Luis Enrique Gómez-Quiroz<sup>3</sup>, and María del Socorro Retana-Márquez<sup>2\*</sup>

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

### Abstract

Testicular apoptosis is activated by stress, but it is not clear which signaling pathway is activated in response to stress. The aim of this study was to investigate whether intrinsic, extrinsic, or both apoptotic signaling pathways are activated by acute and chronic stress. Adult male rats were subjected to cold water immersion-induced stress for 1, 20, 40, and 50 consecutive days. The seminiferous tubules:apoptotic cell ratio was assayed on acute (1 day) and chronic (20, 40, 50 days) stress. Apoptotic markers, including cleaved-caspase 3 and 8, the pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 proteins were also determined after acute and chronic stress induction. Additionally, epididymal sperm quality was evaluated, as well as corticosterone and testosterone levels. An increase in tubule apoptotic cell count percentage after an hour of acute stress and during chronic stress induction was observed. The apoptotic cells rate per tubule increment was only detected one hour after acute stress, but not with chronic stress. Accordingly, there was an increase in Bax, cleaved caspase-8 and caspase-3 proapoptotic proteins with a decrease of anti-apoptotic Bcl-2 in both acutely and chronically stressed male testes. In addition, sperm count, viability, as well as total and progressive motility were low in chronically stressed males. Finally, the levels of corticosterone increased whereas testosterone levels decreased in chronically stressed males. Activation of the extrinsic apoptotic pathway was shown by cleaved caspase-8 increase whereas the intrinsic apoptotic pathway activation was determined by the increase of Bax, along with Bcl-2 decrease, making evident a cross-talk between these two pathways with the activation of caspase-3. These results suggest that both acute and chronic stress can potentially activate the intrinsic/extrinsic apoptosis pathways in testes. Chronic stress also reduces the quality of epididymal spermatozoa, possibly due to a decrease in testosterone.

### Keywords

Apoptosis, extrinsic pathway, germ cells, intrinsic pathway, stress, testis

### History

Received 22 September 2014  
Revised 8 January 2015  
Accepted 11 January 2015  
Published online 9 April 2015

### Introduction

Apoptosis is an innate and evolutionarily conserved process of cellular death that can occur in tissue under both normal and pathological conditions. Apoptosis plays an essential role in the control of germ cell rate in the testes [Stiblar-Martinić 2009]. Testicular apoptosis is a common event that takes place during spermatogenesis in a variety of mammalian species, including humans [Allan et al. 1987; Stiblar-Martinić 2009], and can occur in spermatogenic cells at various stages of differentiation. During early development, particularly in the germ line ontogeny, apoptosis represents a pivotal event regulating of the germ cell:Sertoli cell ratio [Aitken and Baker 2013]. The progression to the first wave of spermatogenesis relies on the coordinated Fas/FasL activation and

Bax-dependent spermatogonia and spermatocytes physiological apoptosis [Koji 2001; Nagata and Golstein 1995; Print and Loveland 2000; Shaha et al. 2010]. In a healthy male adult, apoptosis is required as a cell production regulating process or when spermatogenesis cannot be supported by the testicular environment [Lee et al. 1999]. Thus, germ cell apoptosis may help in maintaining a viable number of germ cells that can be sustained by Sertoli cells [Braun 1998; Lee et al. 1997, 1999; Nakanishi and Shiratsuchi 2004].

Germ cell removal is another role for apoptosis when damage is induced in the seminiferous epithelium, this damage could be initiated by a broad range of physiological and environmental factors [Aitken and Baker 2013; Blanco-Rodríguez 1998; Francavilla et al. 2002] such as when serum testosterone [Shaha 2008] or gonadotrophin levels decrease [Pareek et al. 2007; Sinha Hikim et al. 1997], or by external factors such as UV or ionizing radiation [Ojala et al. 2005], endocrine disruptors [Jin et al. 2013], and stress [Ozawa et al. 2002]. Within this context, testicular heat stress (43°C for 15

\*Address correspondence to María del Socorro Retana-Márquez, Ph.D., Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Mexico City, C.P. 09340, Mexico. Tel: (52 55) 5804 4701. E-mail: [rems@xanum.uam.mx](mailto:rems@xanum.uam.mx)

minutes) causes an increase in rat testicular seminiferous epithelium germ cell apoptosis at stages I–VI and XII–XIV [Banks et al. 2005; Lue et al. 1999; Rockett et al. 2001]. In addition, immobilization stress for 7 consecutive days induces testicular germ cell apoptosis [Yazawa et al. 1999]. In a similar way, exogenous dexamethasone administration induces male germ cell apoptosis, affecting mainly the spermatogonia and primary spermatocytes [Mahmoud et al. 2009; Yazawa et al. 1999; Yazawa et al. 2000]. Testes exposed to mild hypothermia (30 minutes at 10°C) induces seminiferous epithelium germ cell apoptosis at specific stages (XII and XIV), displaying maximum damage after 2 hours of hypothermic exposure. Testes direct cooling achieved by using Ringer solution at 0°–1°C for 60 minutes, causes apoptosis-mediated germ cell loss within 8 hours. Stages XII–I pachytene spermatocytes are hypersensitive to cooling, thus, germ cell depletion is usually seen 2–24 hours after treatment [Zhang et al. 2004]. In addition, acute stress by heat shock (40°C for 2 hours) or cold-induced stress (4°C for 12 hours) leads to apoptosis in spermatids and sperm. Furthermore, these stressors can cause an increase in caspase-3 gene expression, as well as an induction of caspase-3, -8, and -9 activities, supporting a double apoptosis pathway activation (extrinsic/intrinsic) [Wang et al. 2012]. One hour immobilization-induced stress, followed by forced swimming (15 minutes) daily for 60 days in rats, causes an increase in testicular germ cell apoptosis and a decrease in epididymal sperm count [Nirupama et al. 2012]. Although in all these conditions germ cells undergo apoptosis, and it has been speculated that an apoptotic pathway (intrinsic, extrinsic) is activated, it is not clear which one of the apoptotic signaling pathways (intrinsic/extrinsic) is involved in the testes stress response. Therefore, the aim of this work was to investigate whether intrinsic, extrinsic, or both apoptotic signaling pathways activate during acute and chronic stress. Considering that an increase in germ cell apoptosis might cause an imbalance between cell proliferation and cell death, lowering sperm daily production and male fertility, count, and quality of epididymal spermatozoa was also assessed. Additionally, serum corticosterone and testosterone concentration changes were evaluated.

## Results

Total body and testicular weight of rats under acute stress were determined and data showed no significant variation

Table 1. Effect of acute stress on body and testes weights of male rats.

Weights (g)	Control	1 hour after stress	3 hours after stress	6 hours after stress	12 hours after stress	24 hours after stress
Body	299.8 ± 12	300.9 ± 22	296.3 ± 14.7	298.8 ± 20.7	298.3 ± 24.6	295.3 ± 17
Testes	1.76 ± 0.05	1.85 ± 0.04	1.75 ± 0.04	1.74 ± 0.04	1.81 ± 0.04	1.81 ± 0.03

Data expressed as mean ± SEM; *n* = 5 each group.

Table 2. Effect of chronic stress on body and testes weights of male rats.

Weights (g)	Control day 20	Stress day 20	Control day 40	Stress day 40	Control day 50	Stress day 50
Body	360.9 ± 9.5	330.3 ± 11.2 <sup>a</sup>	377.7 ± 3.4	338.7 ± 9.2 <sup>b</sup>	413.8 ± 10.3	371 ± 14.4 <sup>c</sup>
Testes	1.87 ± 0.03	1.78 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.01	1.81 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.97 ± 0.01	1.82 ± 0.01 <sup>c</sup>

Data are expressed as mean ± SEM for five animals per group. <sup>a</sup>*p* < 0.01 compared with control group from day 20; <sup>b</sup>*p* < 0.01 compared with control group from day 40; <sup>c</sup>*p* < 0.01 compared with control group from day 50.

(Table 1). In contrast, total body and testicular weight of rats under chronic stress was significantly lower than controls (*p* < 0.01) from day 20 to 50 days of chronic stress induction (Table 2). Testes from rats exposed to acute stress showed a significant increase in tubules apoptotic germ cell percentage at 1 and 24 hours after the stressor exposure (Figure 1). Tubules apoptotic germ cell percentage was significantly increased when compared with the control group (*p* < 0.01). Testes from rats exposed to chronic stress showed higher percentages of tubules with apoptotic germ cells starting at day 20 of stress induction. The percentages of tubules at 20, 40, and 50 days under chronic stress, were significantly higher than in the control group (*p* < 0.01) (Figure 2).

The number of apoptotic testes male germ cells exposed to acute stress were higher than in the control group (Figure 3A). This increase was significant only one hour after stress induction (*p* < 0.05) (Figures 3B and 4). No significant increase of the seminiferous tubules apoptotic germ cell rate was found in any of the chronic stress groups (Figure 3C, Table 3). Of note, Leydig apoptotic cells were observed in the testes of acutely stressed males (Figure 3B).

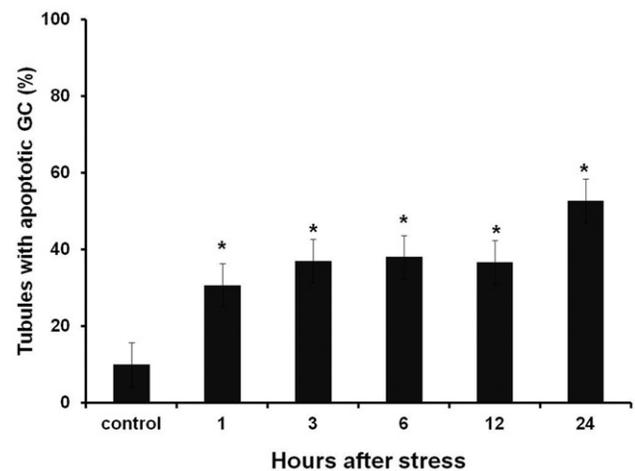


Figure 1. Percentage of seminiferous tubules with TUNEL-positive cells at different experimental times after a single stressor exposure. Percentages were significantly higher than those observed in control groups from the first hour until reaching a peak 24 hours after acute stress induction. Data shown as Mean ± SEM and subjected to one-way ANOVA and Newman-Keull's analysis. \**p* < 0.01 vs. control group.

In males exposed to acute stress, the level of cleaved-caspase-3 protein increased significantly ( $p < 0.05$ ) at one and twenty-four hours after stressor exposure (Figure 5A). The level of cleaved caspase-8 protein in total testes lysates also increased significantly ( $p < 0.05$ ) at one and twenty-four hours after stress induction (Figure 5B). Bax protein content increased significantly ( $p < 0.05$ ) at one, twelve, and twenty-four hours after stress exposure (Figure 5C). Bcl-2 expression decreased significantly ( $p < 0.05$ , when compared with the control group, at all the experimental times (1, 3, 6, 12, and 24 hours) after acute stress induction (Figure 5D).

The level of cleaved-caspase-3 protein increased significantly ( $p < 0.05$ ) every day that the rats were exposed to chronic stress (Figure 6A). Cleaved-caspase-8 levels also increased significantly ( $p < 0.05$ ) in the testes of chronically stressed males (Figure 6B). Similarly, Bax protein levels increased significantly ( $p < 0.05$ ) for chronic stress induction (Figure 6C) whereas Bcl-2 protein decreased significantly ( $p < 0.05$ ) (Figure 6D). The Bax/Bcl-2 ratio increased significantly ( $p < 0.05$ ) in both acute and chronic stressed males (Figure 7).

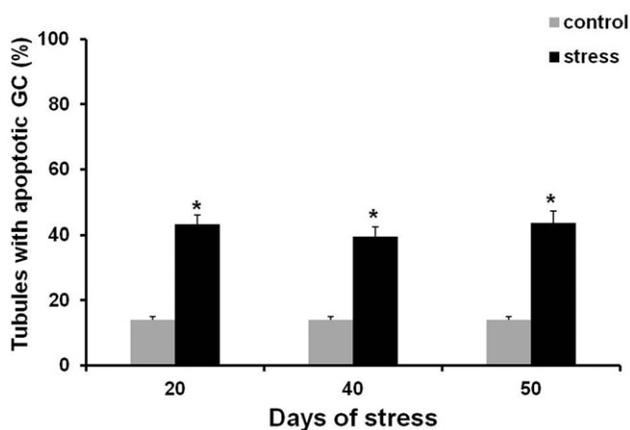


Figure 2. Seminiferous tubules TUNEL-positive cells at 20, 40, and 50 days after chronic stress induction. Percentages were significantly higher than those observed on control groups. Data shown as Mean  $\pm$  SEM and subjected to one-way ANOVA and Newman-Keull's analysis. \* $p < 0.01$  vs. control group.

### Physiological sperm analysis

Acute stress induction caused no changes in any of the analyzed parameters (Table 4). However, chronically stressed males showed a significantly lower percentage on sperm viability at 20, 40, and 50 days after stress induction in comparison with the control group ( $p < 0.01$ ) (Figure 8A). Chronically stressed males also displayed a lower sperm count at days 20, 40, and 50 after chronic stress induction when compared with the control group ( $p < 0.01$ ) (Figure 8B). Total sperm motility decreased significantly at 20, 40, and 50 days after stress induction. These percentages were significantly lower than those observed in the control groups ( $p < 0.01$ ) (Figure 8C). Interestingly, the percentage of progressively motile sperm from males exposed to 20 days of chronic stress was not different from the control group. Nevertheless, at 40 and 50 days after stress induction progressive motility percentage decreased significantly when compared with the control group ( $p < 0.01$ ) (Figure 8D).

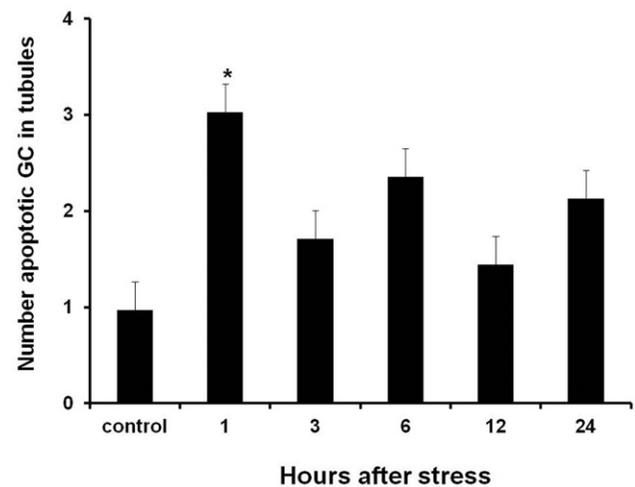


Figure 4. Number of apoptotic germ cells contained in seminiferous tubules in testes of males exposed to acute stress. The number of apoptotic germ cells was significantly higher than in testes of the control group one hour after exposure to the stressor. Data shown as mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA followed by Newman-Keull's test; \* $p < 0.01$  compared with control.

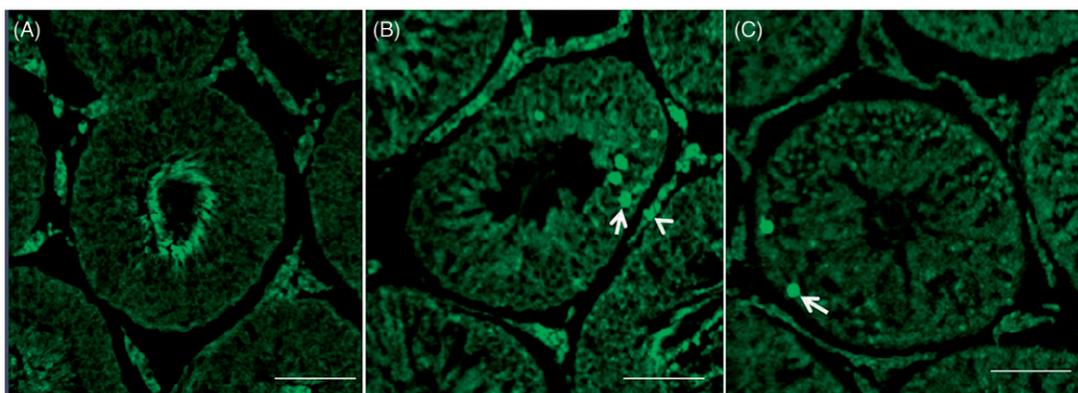


Figure 3. Control and stressed rat testicular sections. (A) Control testis showed non-significant TUNEL-positive cells. (B) Seminiferous tubules TUNEL-positive cells increase (arrows) observed only at 1 hour after acute stress induction. (C) Chronic stressed (50 days) seminiferous tubules displayed scattered TUNEL-positive cells. Some apoptotic Leydig cells were also observed (arrowhead). Bar = 50  $\mu$ m; magnification: 400 $\times$ .

Serum corticosterone from males exposed to acute stress did not show an increase at any of the evaluated experimental times. Instead, there was a decrease on this steroid level from 3 to 12 hours after stressor exposure, followed by an increase at 24 hours (Figure 9A). Rats exposed to chronic stress, showed a significant increase in corticosterone levels at all

experimental times ( $p < 0.01$ ) (Figure 9C). The level of testosterone showed no differences when compared with the control group after acute stress induction (Figure 9B), but decreased significantly in rats exposed to chronic stress, at all experimental times ( $p < 0.01$ ) (Figure 9D).

Table 3. Number of apoptotic germ cells (GC) contained in seminiferous tubules (ST) at days 20, 40, and 50 of chronic stress.

	Control	Stress day 20	Stress day 40	Stress day 50
Number of apoptotic GC contained in the ST	1.3 ± 0.1	2.1 ± 0.09	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2

Data expressed as mean ± SEM;  $n = 5$  each group.

## Discussion

Our data show that acute and chronic stress by cold water immersion eventually leads to apoptosis in testicular germ cells, and that both intrinsic and extrinsic pathways are involved in this process. In the acutely stressed males, the percentage of apoptotic germ cells and tubules increased during the first hour after stress exposure, reaching a peak at 24 hours. Cleaved caspase-3 increased one hour after stressor exposure, reaching a peak at 24 hours. Cleaved caspase-3 is

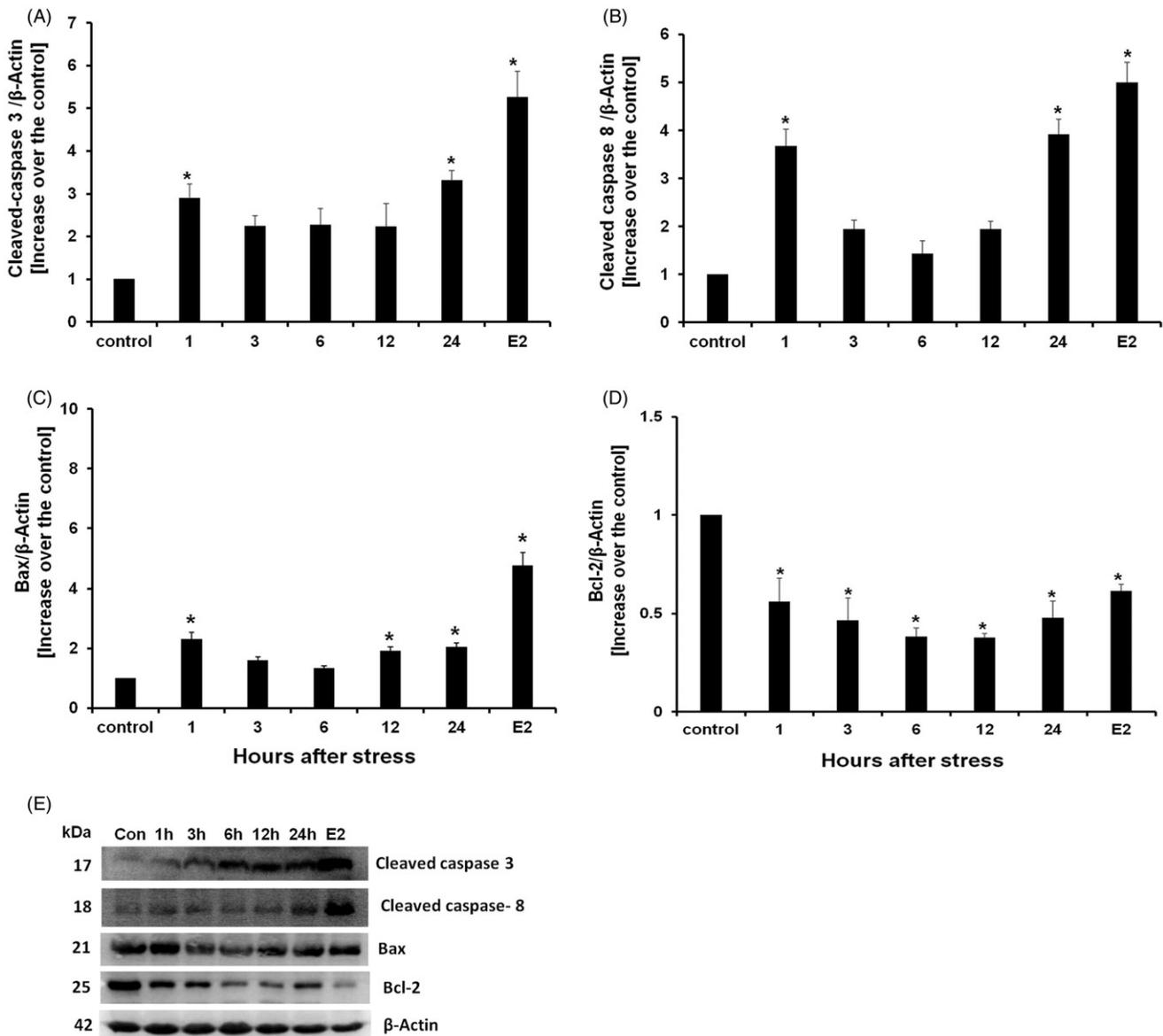


Figure 5. Western blot cleaved caspase-8, Bax, Bcl-2, cleaved-caspase-3 proteins detection, and estradiol benzoate ( $E_2$ ) treatment as apoptosis positive control. (A) Active caspase-3 content increased from one until 24 hours after acute stress induction. (B) Cleaved-caspase-8 content increased from one until 24 hours after acute stress induction. (C) Bax content increased from 1, 12, and 24 hours after acute stress induction. (D) Bcl-2 expression decreased at all experimental times. Data is presented as relative protein expression (optical density) normalized  $\beta$ -actin OD quantities from identical blots. (E) Gels from five protein expression analysis for all experimental times. Each data point represents the mean ± SEM;  $n = 5$ . \* $p < 0.05$  vs. control groups.

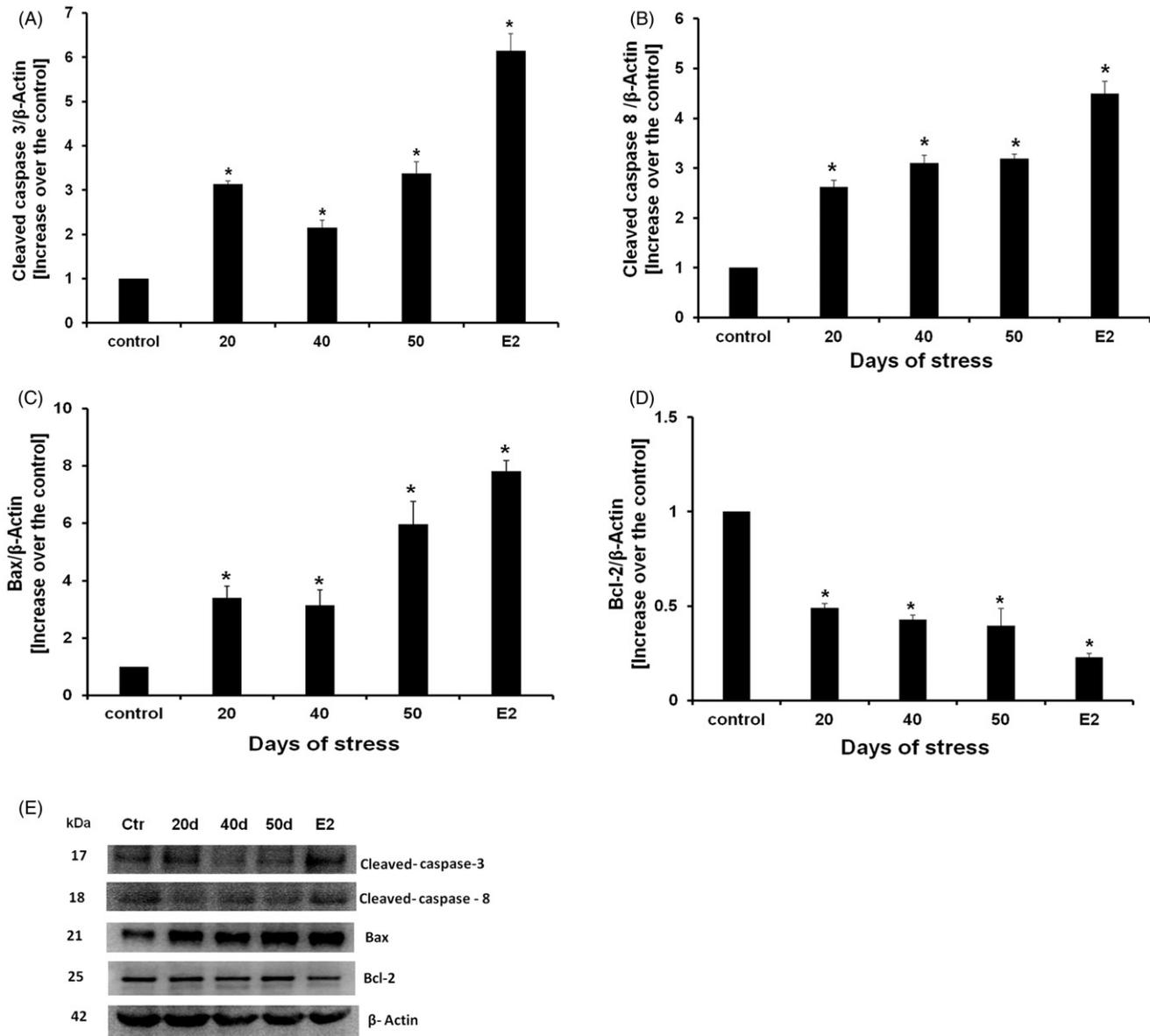


Figure 6. Western blot cleaved caspase-8, Bax, Bcl-2, cleaved-caspase-3 proteins detection, and estradiol benzoate ( $E_2$ ) treatment as apoptosis positive control. (A) Cleaved-caspase-3 content increased at all experimental times. (B) Cleaved-caspase-8 content increased at all experimental times in all days of stress. (C) Bax content also increased during chronic stress at all experimental times. (D) Bcl-2 content decreased in all experimental times. Data is presented as relative protein expression (optical density) normalized with  $\beta$ -actin OD quantities from identical blot. (E) Gels from five protein expression analysis for all experimental times. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM;  $n = 5$ . \* $p < 0.05$  vs. control groups.

an important effector caspase because activation marks the point of no return of apoptotic signaling [Earnshaw et al. 1999]. Cleaved-caspase 8 also increased at one and 24 hours after acute stress induction, indicative of the activation of the extrinsic apoptotic pathway, as early as one hour after stressor exposure, suggesting that acute stress can activate testes germ cell apoptosis through the extrinsic pathway. Moreover, it is known that the testes extrinsic apoptotic pathway involves the activation of the Fas receptor and its ligand (FasL), expressed by Sertoli, spermatocyte, and Leyding cells. Once bound to its ligand, Fas can trigger the apoptotic event [Pentikainen et al. 1999; Porcelli et al. 2006], by a caspase-8 dependent mechanism [Maheshwari et al. 2009; Said et al. 2004]. Caspase-8 is required for caspase-3 cleavage [Said et al. 2004] that is necessary to trigger apoptosis. However, the role of

Fas/FasL in activating acute stress-induced testicular apoptosis remains to be elucidated.

The level of Bax increased in contrast with Bcl-2 that decreased (both markers of the intrinsic apoptotic pathway) at all experimental times after stressor exposure. This, indicates that the intrinsic pathway is also activated by acute stress. It has been proposed that the Bcl-2 family proteins are either germ cell survival or death modulators [Knudson et al. 1995; Mahmoud et al. 2009; Yan et al. 2000]. Functions of the Bcl-2 related proteins comprise pro-apoptotic (Bax, Bad, and Bid) and anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-xL) proteins [Knudson et al. 1995; Maheshwari et al. 2009; Yamamoto et al. 2000]. Induction of Bax acute stress may promote changes in mitochondrial membrane permeability and release cytochrome C into the cytosol [Blatt and Glick 2001].

Once released, cytochrome C binds to apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) and pro-caspase-9 [Nuñez et al. 1998; Wang et al. 2012], activating the initiator caspase-9, that in turn activates caspase-3 [Maheshwari et al. 2009]. Therefore, it is possible that rapid stress-induced testes germ cell apoptosis involves both extrinsic and intrinsic apoptotic signaling pathways.

During chronic stress, a significant increase in the percentage of apoptotic germ cell tubules was observed at all experimental times (20, 40, and 50 days). Although the apoptotic germ cell rate did not increase with chronic stress, the seminiferous tubule apoptotic germ cells rate did, and remained high at all experimental times. In contrast, the number of tubules with apoptotic cells increased greatly after seven days of immobilization-induced stress [Yazawa et al. 1999]. The differences may reflect the experimental conditions. The steady apoptotic germ cells rate during chronic stress in the present study may reflect the efficient phagocytic

removal of seminiferous epithelium apoptotic cells. Moreover, Sertoli cells are capable of recognizing and then engulfing germ cells initiating apoptosis through scavenger receptor type 1 (SR-BI) binding, present on the Sertoli cell membrane [Nakanishi and Shiratsuchi 2004]. The increase in the number of tubules with apoptotic germ cells likely yields the reduction in testicular weight during chronic stress.

The present work showed that chronic stress paralleled increased levels of testicular caspase-3, caspase-8, and Bax. Accordingly, Bcl-2 content decreased at all experimental times. Taken together, these results indicate that both intrinsic and extrinsic signaling pathways are involved in testicular germ cell apoptosis during chronic stress, converging at caspase-3 activation [Kaufmann et al. 2012] that is tightly associated with DNA fragmentation [Maheshwari et al. 2009]. Increased apoptosis activation is demonstrated with the elevation of the Bax/Bcl2 ratio, which indicates an up-regulation of caspase-3 activation. The activation of testicular extrinsic and intrinsic apoptotic signaling pathways may also reflect the cross-talk between both pathways [Said et al. 2004] with caspase-8-mediated proteolytic activation of the pro-apoptotic protein Bid [Kaufmann et al. 2012; Said et al. 2004]. In this mechanism, truncated Bid (tBid) is then translocated to the mitochondria where it promotes cytochrome C Bax-dependent release and Apaf1-caspase-9 complex activation, followed by caspase-3 cleavage and activation that leads to apoptosis. The cross-talk between these pathway allows caspase-driven signal amplification to ensure efficient removal of damaged germ cells [Kaufmann et al. 2012].

Testicular apoptosis observed in chronically stressed males is consistent with the decrease in testosterone levels, since it has been shown that decreased intratesticular testosterone is sufficient to activate caspase-3 in primary spermatocytes [Kim et al. 2001]. The decrease in testosterone likely reflects the increase in corticosterone during chronic stress. This may be mediated by non-genomic mechanisms [Dong et al. 2004] or genetic mechanisms through the inhibition of genes encoding testosterone biosynthetic enzymes [Payne and Sha 1991], such as 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and 17 $\alpha$ -hydroxylase/17-20-lyase [Hales and Payne 1989; Orr et al. 1994]. Corticosterone also induces Leydig cell apoptosis [Chen et al. 2012], resulting in a significant reduction in the secretion of testosterone [Hardy et al. 2005] as confirmed by TUNEL. It appears that the number of apoptotic Leydig cells observed were not sufficient to cause a decrease in the level of testosterone after acute stress induction. As above, germ cell apoptosis might also be induced by corticosterone, since glucocorticoid receptors (GR) have been identified in the cytoplasm of primary spermatocytes [Schultz et al. 1993]. Therefore, corticosterone may be inhibiting, through a

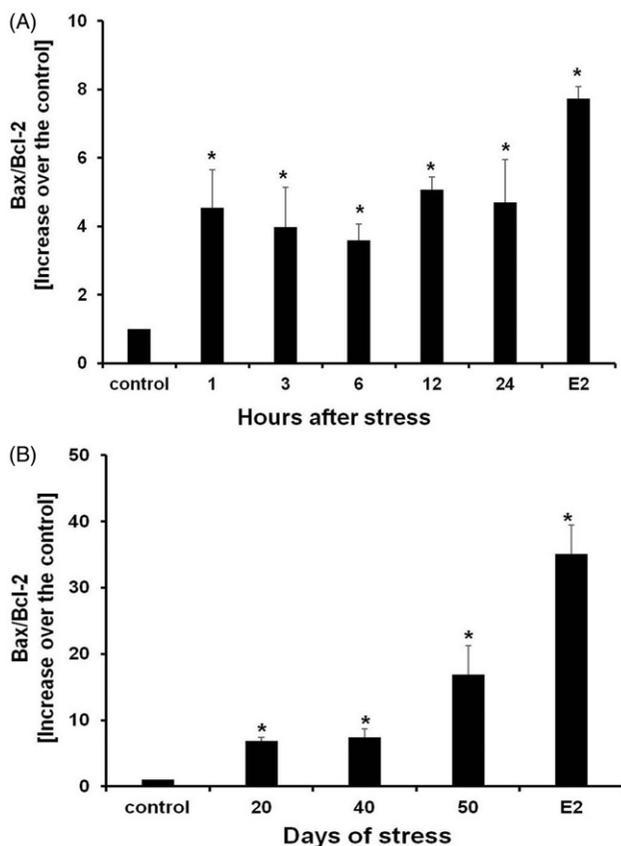


Figure 7. Bax/Bcl-2 relative ratios of acute stress (A) and chronic stress (B). Bax content was significantly increased. Data is presented as Bax and Bcl-2 relative expression. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM;  $n = 5$ . \* $p < 0.05$  vs. control groups.

Table 4. Effect of acute stress on viability, concentration, motility, and total and progressive motility of spermatozoa obtained from the cauda epididymis of the rat.

	Control	1 hour after stress	3 hours after stress	6 hours after stress	12 hours after stress	24 hours after stress
Sperm viability (%)	84.8 $\pm$ 1.7	86.2 $\pm$ 1.0	85 $\pm$ 0.8	82.3 $\pm$ 1.8	88.9 $\pm$ 1.1	80.6 $\pm$ 2.3
Sperm concentration ( $10^6$ /ml)	116.5 $\pm$ 2.5	115.7 $\pm$ 11.1	118.1 $\pm$ 8.4	101.3 $\pm$ 6.7	108.7 $\pm$ 8.5	117.2 $\pm$ 9.2
Total sperm motility (%)	80.8 $\pm$ 2.8	78.2 $\pm$ 1.7	77.8 $\pm$ 1.0	78.7 $\pm$ 2.6	75.4 $\pm$ 1.8	83.5 $\pm$ 1.8
Progressive sperm motility (%)	35.8 $\pm$ 1.7	39.7 $\pm$ 1.1	39.0 $\pm$ 1.5	38.2 $\pm$ 5.0	36.0 $\pm$ 1.2	36.5 $\pm$ 2.3

Data expressed as mean  $\pm$  SEM;  $n = 5$  each group

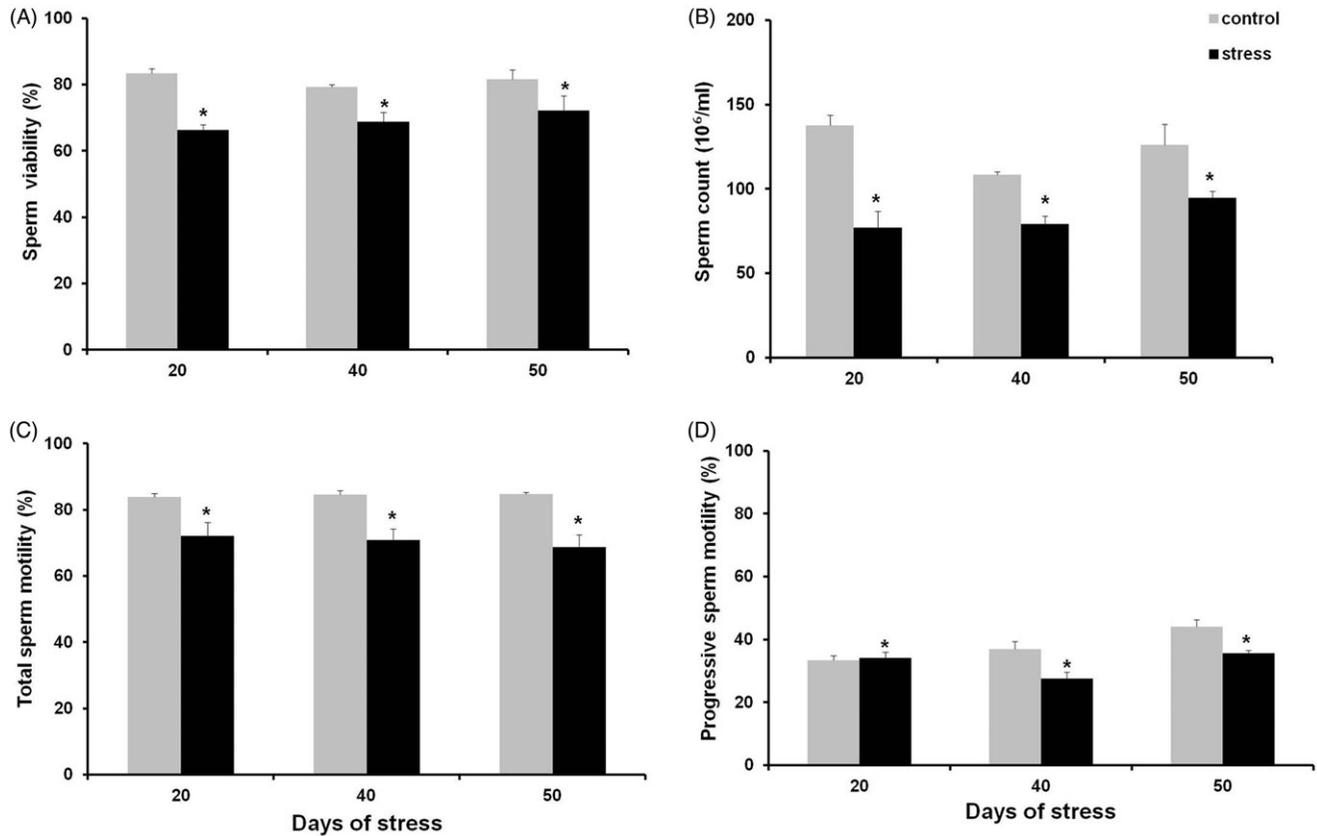


Figure 8. Sperm viability (A), concentration (B), total sperm motility (C), and progressive sperm motility (D). All these parameters appeared lower than when compared to control groups. Data shown as mean  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA and Newman-Keull's analysis;  $*p < 0.01$  vs. control groups.

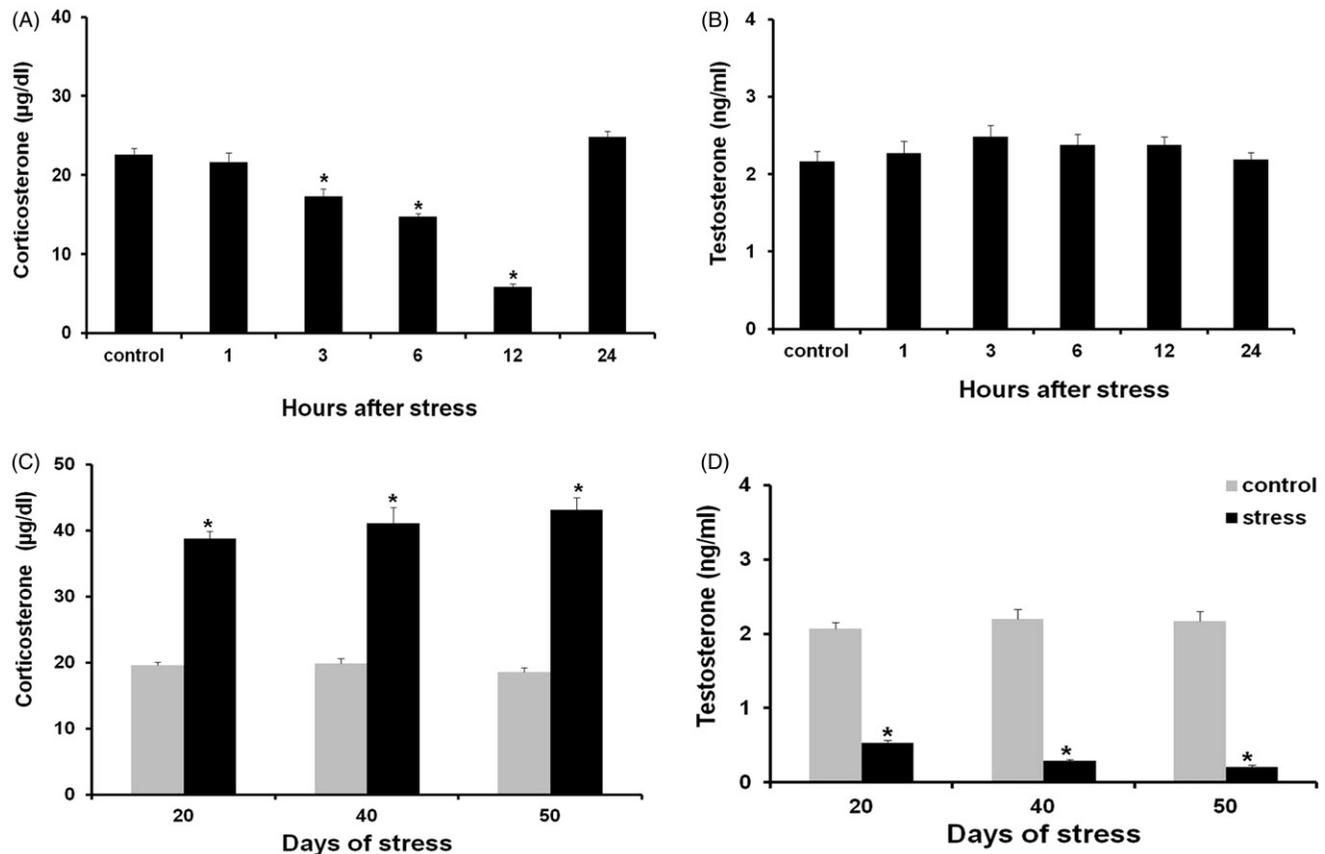


Figure 9. Corticosterone (A) and testosterone levels (B) in males exposed to acute stress. No changes were detected in any of these hormones. (C) Corticosterone levels in males exposed to chronic stress showed a significant increase when compared with the control group. (D) Testosterone levels were significantly lower when compared with the control group. Data shown as mean  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA and Newman-Keull's analysis;  $*p < 0.01$  vs. control groups.

genomic mechanism, the transcription of certain transcription factors, such as c-jun/c-fos and NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) whose target genes are related to cell survival [Greenstein et al. 2002; Sionov et al. 2006]. Moreover, corticosterone could potentially lead germ cells to apoptosis through the intrinsic apoptotic signaling pathway, as observed during dexamethasone treatment [Yazawa et al. 2000], where Bax expression increases at specific androgen-dependent stages (VII–VIII) of the seminiferous epithelium cycle [Mahmoud et al. 2009]. Testicular corticosterone-induced apoptosis may also be affected by the level of oxidative stress, since increases in hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and lipid peroxidation were observed along with attenuated superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity [Dhanabalan et al. 2010].  $H_2O_2$  is known to induce germ cell apoptosis in the testes, through the Fas/FasL complex and other pro-apoptotic proteins, such as Bax, Bid, and Bad [Maheshwari et al. 2009]. Therefore, it is possible that the decrease in testosterone paralleling the increase in corticosterone from chronic stressed males can induce testicular germ cell apoptosis through ROS overproduction and generation of oxidative stress, thus directly activating both apoptotic signaling pathways.

Chronic stress also caused a reduction of epididymal spermatozoa and sperm count as well as total and progressive motility. Similar results have been reported in sperm quality and sperm fertilization ability [Saki et al. 2010]. In the present work, epididymal quality and count changes were assayed as a function of stressor exposure. Epididymal sperm mutation is characterized by nuclear condensation, the acquisition of motility, and capacitation capabilities. This is an androgen-dependent process, mainly orchestrated by the conjugated action of testosterone and dihydrotestosterone. Androgen deprivation causes loss of sperm motility, fertilization ability, and eventually leads to cell death [Robaire et al. 2006]. A decrease in the level of testosterone affects conversion of round spermatids during spermiogenesis at stages 7 to 8 causing premature detachment that prevents elongation [O'Donnell et al. 1996; Sofikitis et al. 1999], thereby decreasing daily sperm production which may reflect our previous observation of decreased testosterone. Conversely, stress-induced corticosterone release might affect the epididymal microenvironment through the epithelial cytoplasmic and nuclear glucocorticoid receptor [Schultz et al. 1993; Silva et al. 2010]. The loss of total progressive motility could be owed to epididymal corticosterone-induced ROS overproduction and lipid peroxidation [Dhanabalan et al. 2010]. ROS-induced sperm lipid peroxidation may alter sperm plasma membrane fluidity [Agarwal et al. 2014], causing a defect in the middle piece [Rao et al. 1989], decreasing motility [Agarwal et al. 2003; Alvarez and Storey 1982] due to defects in the axoneme [De Lamirande and Gagnon 1992a] and ATP depletion [De Lamirande and Gagnon 1992b]. In turn this would also reconcile the loss of sperm viability.

In conclusion, germ cell death after acute or chronic stress by cold water immersion leads to an increase in the number of apoptotic germ cell tubules. This involves both of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. Immediately after acute stress this is characterized by an elevated apoptotic germ cell rate. This increase is also reflected as

a function of sperm count, motility, and viability that may be owed to the opposite response of corticosterone and testosterone levels.

## Materials and Methods

### Animals

Animal handling and experimentation was performed in accordance to Mexican Official Rules (NOM-062-ZOO-1999). Wistar adult male rats, (90 d old, 250–300 g/body weight), housed under the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa facilities were used. Five animals per cage were placed (50X30X20 cm) under standard conditions. The room was maintained on a 12:12 reverse light/dark cycle (lights off: 0900) and controlled temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Food and water were available *ad libitum* throughout the experimental times. Animals were kept in these conditions for one week before being randomly assigned to one of the following groups: control group: 1, 20, 40, and 50 d ( $n = 5$  per group); acute stress group (a single exposure): 1, 3, 6, 12, and 24 h ( $n = 5$  per experimental time) after stressor exposure; chronic stress group: 20, 40, and 50 consecutive days ( $n = 5$  per experimental time).

### Cold water immersion-induced stress

Stressor exposure took place during the dark phase (0900) of the light/dark cycle. Stressor exposure was performed in a separated room. Rats were placed individually in a cold water covered tank (15.5 cm deep, at  $15^\circ\text{C}$ ) where they could either swim or remain in an upright position, keeping their heads above water level for 15 min. After stress induction, animals were dried with a cloth and immediately returned to their cages [Retana-Márquez et al. 1996]. This procedure was done once/d for one (acute stress) or 20, 40, and 50 consecutive d (chronic stress). Experimental times were chosen for chronic stress effect evaluation along with spermatogenesis that is known to last 48–52 d in rats.

Control animals were kept in their home cages without any disturbance. Rats under acute stress were anesthetized with sodium pentobarbital (25 mg/kg body weight; Pfizer, SA de CV, Toluca, Mexico, ip) at 1, 3, 6, 12, and 24 h after stressor exposure. Rats under chronic stress were anesthetized 1 h after the last stress induction session. Testes were immediately removed and weighed. Apoptosis was performed using the left testis. The right testis was stored at  $-70^\circ\text{C}$  for protein extraction and Western blot analysis. Cauda epididymis was removed for determination of sperm motility, viability, and count. Blood samples from control and stressed rats were collected by cardiac puncture (3–4 ml) in test tubes, immediately after the cauda epididymis and testis were obtained ( $\sim 3$  min) followed by centrifugation (2500 rpm/10 min). Serum samples were stored at  $-20^\circ\text{C}$  for hormone content determination.

### Testicular tissue sampling

Left testis was fixed by using 4% paraformaldehyde testicular artery perfusion (Sigma-Aldrich, USA) and paraffin embedding (Paraplast-plus). Transverse sections ( $5 \mu\text{m}$ ) were

obtained by using a Leica microtome mounted on poly-L-lysine hydrobromide (Sigma Aldrich) treated slides.

### Deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL) assay

Testis tissue sections (5 µm) were deparaffinized in xylol and sequentially rehydrated in ethanol dilutions: 100, 96, 80, and 70%, washed, and maintained in PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.03 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4). The *in-situ* cell detection kit (POD kit, Cat. No. 11684817910 Roche, Germany) was used for apoptosis detection by TUNEL assay according to the manufacturer's instruction. Briefly, tissue sections were dewaxed and treated with 20 µg/ml Proteinase K (Proteinase K recombinant PCR Grade, Cat. No. 03 115 887 001 Roche, Germany) for 30 min at 37°C in a dark humidity chamber.

Permeabilization was achieved by using 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate for 5 min on ice (4°C); sections were incubated with the TUNEL reaction mixture (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 25 µl) and fluorescein-dUTP for 60 min at 37°C in a dark humidity chamber. At least 50 tubules were randomly analyzed per slide in different fields. Cells were first identified by using fluorescent microscopy (Axiostar Plus, HBO 50/Ac, Carl Zeiss) and then analyzed using confocal microscopy (LSM 780 multiphoton confocal microscope, Carl Zeiss) at a 450–500 nm wavelength excitation and a 515–565 nm (green light) detection range. Apoptotic cells (intense green nuclear fluorescence) or normal (no fluorescence) were identified. Fifty randomly selected tubules were counted for each individual and the tubules apoptotic germ cell percentage was estimated as the other apoptotic cell type contained in these tubules.

### Western blot analysis

Frozen testes tissue (0.2 g) was minced in 100 µl ice-cold PBS (pH 7.4) (1% Igepal, 20 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, protease inhibitors: Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Molecular Biochemical, Indianapolis, IN, USA). Tissue was homogenized using a dunce homogenizer. After incubation at 4°C for 15 min, samples were centrifuged at 12,000 X g for 10 min at 4°C. Supernatants (total protein extract) were aliquoted and stored at –70°C for further use. Protein concentration was determined using the Thermo Scientific NanoDrop 2000c spectrophotometer (spectral range of 280 nm).

For Western blot analysis, 300 µg of protein was loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel at 120 V in a Mini-Protean II Cell (Bio-Rad, CA, USA) along with a low-range marker standard (NuPAGE Novex, Invitrogen, CA, USA). Proteins were transferred to a 0.45 µm nitrocellulose membranes (PVDF Transfer Membrane; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) embed in transfer buffer (25 mM Tris base, 190 mM glycine, 20% methanol) at 120 V for 30 min by using the Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) protein transfer system. Membranes were blocked with nonfat dried milk 5% in TTBS (137 mM NaCl, 20 mM Tris- HCl and 0.1% Tween 20, pH 7.6) for 30 min at room temperature. After three TTBS washes (5 min/each), membranes were incubated with primary antibodies (diluted 1:500) against Bax (Cat No. 3331-100, BioVision), or Bcl-2 (Cat. No. 3033-100, BioVision, CA, USA), or anti-cleaved

caspase-3 (Cat No. 9665, Cell Signaling Technology) or anti-caspase-8 (Cat No. Sc-5263, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) overnight at 4°C. After three TTBS washes (10 min/each), membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated goat antirabbit or horse anti-mouse (BA-1000 or BA-9200, Vector Laboratories, CA, USA) secondary antibodies at a 1:10,000 dilution for 2 h. Membranes were washed again with TTBS three times (10 min/each). Results were visualized by chemiluminescent detection using luminol (5-amino-2,3 dihydro-1,4 phalazinedione; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Results were analyzed by using Kodak Molecular Imaging Software for densitometric data. Stripping buffer was used on the membranes for later incubation with β-actin monoclonal antibody (1:500) (Sigma) as protein loading control. Signal protein specific ratio was compared with actin, the internal standard. Rat testes protein extracts were treated with estradiol benzoate (E<sub>2</sub>, 10 µg/0.2 ml oil for 50 d, sc) as apoptosis-induced positive control.

### Sperm analysis

Cauda epididymis was stored with 1 ml of saline phosphate buffer (PBS: 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.03 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) at 37°C. Each cauda epididymis was cut using fine tip dissection scissors to release the sperm stored in the cauda. Spermatozoa were evenly distributed in the PBS, for the following test.

### Sperm viability

Sperm viability was determined using a colorant (5% nigrosin, 1% eosin, and sodium citrate), dissolved in distilled water [Lucio et al. 2009]. Epididymal sperm suspension (10 µl) was mixed with the colorant solution (10 µl) and analyzed on a slide with a cover slip. Slides were observed under an optical microscope (Olympus Light Microscope CX 41) 40× objective lens. Undyed sperm were counted as viable whereas dyed sperm were counted as dead. Different fields were analyzed randomly until two hundred sperm were counted. Sperm viability was reported as viable spermatozoa percentage out of the total counting.

### Sperm count

Epididymal sperm count was performed by using a Neubauer haemocytometer. Epididymal sperm suspension (25 µl) was taken to a 500 µl final volume with distilled water. Sperm suspension (10 µl) was placed on the Neubauer haemocytometer and counted on eight different spots. Count discrimination criteria were settled using the spermatozoa head position inside of the analyzed chamber squares. Formula count was resolved as follows:

$$\text{sperm count} \times \# \text{ chamber squares (8)} \\ \times \text{dilution factor (21)} \times 10,000/2$$

Final sperm count was expressed in millions per milliliter.

### Sperm motility

Spermatozoa suspension was placed into flat deep cannula (100 µm) for CASA analysis by using HTM-IVOS motility analyzer (Hamilton Thorne IVOS CASA instrument, MA,

USA), software version 10.6. Trails (1 s/each) were captured at 60 Hz under X4 dark-field illumination (37°C, video frequency = 60, magnification = 1.95). Five experimental individuals were used for each of the reported experimental times. Total and progressive sperm motility percentage was assayed.

### Steroid purification

Blood serum was stored in test tubes at –20°C for further evaluation. Corticosterone and testosterone levels were evaluated by using high resolution liquid chromatographic (HPLC). Steroids were isolated from blood serum using the Woodward and Emery modified method [Woodward and Emery 1987]. Isolation was performed using diethyl ether-dichloromethane (5 ml, 60:40 v/v), vortexed, and immediately centrifuged (2 500 rpm/5 min). Supernatants were vortexed with 1 ml of HPLC-water. After a second centrifugation, the organic phase (3 ml) was separated and evaporated at room temperature. The resulting precipitate was suspended in a methanol-water solution (100 ml, 60:35 v/v).

Columns were equilibrated using a acetonitrile-water solution (65:35 v/v) flow rate of 0.4 ml/min. Separations were performed at 40°C in a Waters symmetry C18 column (particle size 5 µl; column size 2.0 X 150 mm; Waters Corp., Milford, MA, USA). Waters 600-MS system controller was used to elute the mobile phase and steroid levels were determined by a UV absorbance detector (486 Waters) at 250 nm.

HPLC system calibration was performed using different nortestosterone, testosterone (0–34 ng/ml), and corticosterone (0–50 µg/dl). Sample corticosterone and testosterone levels slopes were calculated. Testosterone regression trend was:  $y = -0.774 + 0.2181x$  ( $r^2 = 0.99896$ ), and  $y = -0.6464 + 0.01655x$  ( $r^2 = 0.99986$ ) for corticosterone. Corticosterone and testosterone assay detection limits were 1.5–50 µg/dl and 0.2–8 ng/ml, respectively.

### Statistical analysis

Data was reported as mean ± S.E.M and spermatid parameters as percentages. Tubules positive for apoptotic germ cells, the apoptotic germ cells rate/per tubule, and hormone concentrations for acute stressed experimental individuals were subjected to a one-way ANOVA analysis. Hormone concentrations and sperm parameters for chronic stressed experimental individuals were subjected to a two-way ANOVA analysis, with condition and days as factors. When significant, ANOVA analysis was subjected to Newman-Keuls test for significance determination. Western blot data was subjected to Kruskal-Wallis one way ANOVA analysis. The level of significance was fixed at  $p < 0.05$ .

### Acknowledgments

The authors want to express their gratitude to Dr. Miguel Betancourt for his support in the use of the fluorescence microscope.

### Declaration of interest

This study was partially supported by CONACyT/PIFOP-CONACYT-SEP 309-0 (C/PFPN-2002-35-32). PROMEP, grant 1035/09/1247. The authors report no conflict of interest.

### Author contributions

Study design: Conceived, designed, and coordinated the study, evaluated steroid hormones, analysis and interpretation of data, and participated in the critical review of the manuscript: MSIRM; Carried out TUNEL, western blot, sperm analysis, statistical data analysis, and drafted the manuscript: ALJR; Participated in the critical review of the manuscript: MGL, RMVV, AAM, LEGQ. All authors read and approved the final version of the manuscript.

### References

- Agarwal, A., Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A. (2003) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* **79**:829–843.
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C. and du Plessis, S.S. (2014) Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health* **32**: 1–17.
- Aitken, R.J. and Baker, R.A. (2013) Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol* **57**:265–272.
- Allan, D.J., Harmon, B.V. and Kerr, J.F.R. (1987) Cell death in spermatogenesis. In: *Perspectives on mammalian cell death*. Potten CS, ed. Oxford University Press, UK, pp. 229–258.
- Alvarez, J.G. and Storey, B.T. (1982) Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol Reprod* **27**:1102–1108.
- Banks, S., King, S.A., Irvine, D.S. and Saunders, P.T.K. (2005) Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* **129**:505–514.
- Blanco-Rodríguez, J. (1998) A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. *Int J Androl* **21**:236–248.
- Blatt, N.B. and Glick, G.C. (2001) Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bio Org Med Chem* **9**: 1371–1384.
- Braun, R.E. (1998) Early sperm is sacred or is it not? *Nat Genet* **18**: 202–204.
- Chen, Y., Wang, Q., Wang, F.-F., Gao, H.-B. and Zhang, P. (2012) Stress induces glucocorticoid-mediated apoptosis of rat Leydig cells in vivo. *Stress* **15**:74–84.
- De Lamirande, E. and Gagnon, C. (1992a) Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* **13**:368–378.
- De Lamirande, E. and Gagnon, C. (1992b) Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* **13**: 379–386.
- Dhanabalan, S., Jubendradass, R., Latha, P. and Mathur, P.P. (2010) Effect of restraint stress on 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Human Exp Tox* **30**:567–578.
- Dong, Q., Salva, A., Sottas, C.M., Niu, E., Holmes, M. and Hardy, M.M. (2004) Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. *J Androl* **25**:972–981.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufman, S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**:383–424.
- Francavilla, S., D'Abrazio, P., Cordeschi, J., Pelliccione, F., Necozone, S., Ulisse, S., et al. (2002) Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* **8**:213–220.
- Greenstein, S., Ghias, K., Krett, N.L. and Rosen, S.T. (2002) Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res* **8**:1681–1694.
- Hales, D.B. and Payne, A.H. (1989) Glucocorticoid-mediated repression of P450<sub>sc</sub> mRNA and de novo synthesis in cultured Leydig cells. *Endocrinol* **124**:2099–2104.
- Hardy, M.P., Hui-Bao, G., Qiang, D., Renshan, G., Qian, W., Wei, R.C., et al. (2005) Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res* **322**:147–153.

- Jin, P., Wang, X., Chang, F., Bai, Y., Li, Y., Zhou, R., et al. (2013) Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *J Biomed Res* **27**:135–144.
- Kaufmann, T., Strasser, A. and Jost, P.J. (2012) Fas death receptor signaling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ* **19**:42–50.
- Kim, J.-M., Ghosh, S.R., Weill, A.C.P. and Zirkin, B.R. (2001) Caspase-3 and Caspase-Activated Deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinol* **142**:3809–3816.
- Knudson, C.M., Tung, K.S.K., Toutellotte, W.G., Brown, G.A.J. and Korsmeyer, S.J. (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **270**:96–99.
- Koji, T. (2001) Male germ cell death in mouse testes: possible involvement of Fas and Fas ligand. *Med Electron Microsc* **34**: 213–222.
- Lee, J., Richburg, J.H., Younkin, S.C. and Boekelheide, K. (1997) The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinol* **138**:2081–2088.
- Lee, J., Richburg, J.H., Shipp, E.B., Meistrich, M.L. and Boekelheide, K. (1999) The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinol* **140**:852–858.
- Lucio, R.A., Tlachi, J.L., López, A.A., Zempoalteca, R. and Velázquez-Moctezuma, J. (2009) Análisis de los parámetros del eyaculado en la rata Wistar de laboratorio: descripción de la técnica. *Vet Méx* **40**: 405–415.
- Lue, Y.H., Amiya, P., Sinha-Hikim, R.S., Swerdloff, P.I., Khay, S.T., Tan, B., et al. (1999) Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinol* **140**:1709–1717.
- Maheshwari, A., Misro, M.M., Aggarwal, A., Sharma, R.K. and Nandan, D. (2009) Pathways involved in testicular germ cell apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro. *FEBS J* **276**:870–881.
- Mahmoud, H., Mahmoud, O., Layasadat, K. and Naeim, A. (2009) Dexamethasone effects on Bax expression in the mouse testicular germ cells. *Fol Histochem Cytobiol* **47**:237–241.
- Nagata, S. and Golstein, P. (1995) The Fas death factor. *Science* **267**: 1449–1456.
- Nakanishi, Y. and Shiratsuchi, A. (2004) Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol Pharm Bull* **27**:13–16.
- Nirupama, M., Devaki, M., Nirupama, R. and Yajurvedi, H.N. (2012) Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *J Physiol Biochem* **69**:59–68.
- Núñez, G., Benedict, M.A., Hu, Y. and Inohara, N. (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**:3237–3245.
- O'Donnell, L., McLachlan, R.I., Wreford, N.G., de Kretser, D.M. and Robertson, D.M. (1996) Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod* **55**:895–901.
- Otala, M., Suomalainen, L., Pentikäinen, M.O., Kovanen, P., Tenhunen, M., Erkkilä, K., et al. (2005) Protection from radiation-induced male germ cell loss by sphingosine-1-phosphate. *Biol Reprod* **70**:759–767.
- Orr, T.E., Taylor, M.F., Bhattacharyya, A.K., Collins, D.C. and Mann, D.R. (1994) Acute immobilization stress disrupts testicular steroidogenesis in adult male rats by inhibiting the activities of 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-lyase without affecting the binding of LH/hCG receptors. *J Androl* **15**:302–308.
- Ozawa, N., Goda, N., Makino, N., Yamaguchi, T., Yoshimura, Y. and Suematsu, M. (2002) Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *J Clin Invest* **109**:457–467.
- Pareek, T.K., Joshi, A.R., Sanyal, A. and Dighe, R.R. (2007) Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis* **12**:1085–1100.
- Payne, A.H. and Sha, L.L. (1991) Multiple mechanism for regulation of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase, 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450, and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultures of mouse Leydig cells. *Endocrinol* **129**:1429–1435.
- Pentikäinen, V., Erkkilä, K. and Dunkel, L. (1999) Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol* **276**:310–316.
- Porcelli, F., Megiollaro, D., Carnevali, A. and Ferrandi, B. (2006) Fas ligand in bull ejaculated spermatozoa: A quantitative immunohistochemical study. *Acta Histochem* **13**:287–292.
- Print, C.G. and Loveland, K.L. (2000) Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* **22**:423–430.
- Rao, B., Sourfir, J.C., Martin, M. and David, G. (1989) Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res* **24**:127–134.
- Retana-Márquez, S., Domínguez-Salazar, E. and Velázquez-Moctezuma, J. (1996) Effect of acute and chronic stress on masculine sexual behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology* **21**:39–50.
- Robaire, B., Hinton, B.T. and Orgebin-Crist, M.C. (2006) The epididymis In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Neill JD, Plant MT, Donald WP, Challis JGC, De Kretser DM, Richards JS, et al., eds. St. Louis (MO): Academic Press, pp. 1081–1092.
- Rockett, J.C., Mapp, F.L., Garges, J.B., Luft, J.C. and Dix, D.J. (2001) Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol Reprod* **65**:229–239.
- Said, T.M., Paasch, U., Glander, H.J. and Agarwal, A. (2004) Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod* **10**:39–51.
- Saki, G., Fakher, R. and Alizadeh, K. (2010) Effect of forced swimming stress on count, motility and fertilization capacity of the sperm in adult rats. *Hum Reprod Sci* **2**:72–75.
- Schultz, R., Isola, J., Parvinen, M., Honkaniemi, J., Wikström, A.C., Gustafsson, J.A., et al. (1993) Localization of the glucocorticoid receptor in testis and accessory sexual organs of male rat. *Mol Cell Endocrinol* **95**:115–120.
- Shaha, C. (2008) Germ cell apoptosis: relevance to infertility and contraception. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* **8**:66–78.
- Shaha, C., Tripathi, R. and Mishra, D.P. (2010) Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Phil Trans R Soc B* **365**:1501–1515.
- Silva, E.J., Queiróz, D.B.C., Honda, L. and Avellar, M.C.W. (2010) Glucocorticoid receptor in the rat epididymis: expression, cellular distribution and regulation by steroid hormones. *Mol Cell Endocrinol* **325**:64–77.
- Sinha Hikim, A.P., Rajavashisth, T.B., Sinha Hikim, I., Lue, Y., Bonavera, J.J., Leung, A., et al. (1997) Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod* **57**:1193–1201.
- Sionov, R.V., Cohen, O., Kfir, S., Zilberman, Y. and Yefenof, E. (2006) Role of mitochondrial glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med* **203**:189–201.
- Sofikitis, N., Ono, K., Yamamoto, Y., Papadopoulos, H. and Miyagawa, I. (1999) Influence of the male reproductive tract on the reproductive potential of round spermatids abnormally released from the seminiferous epithelium. *Horm Reprod* **14**:1998–2006.
- Stiblar-Martinic, D. (2009) Morphometrical evaluation of germ cell apoptosis in infertile men. *Folia Biol (Praha)* **55**:233–237.
- Wang, D.-H., Hu, J.-R., Wang, L.-Y., Hu, Y.-J., Tan, F.-Q., Zhou, H., et al. (2012) The Apoptotic Function Analysis of p53, Apaf1, Caspase3 and Caspase7 during the Spermatogenesis of the Chinese Fire-Bellied Newt *Cynops orientalis*. *PLoS One* **7**:e39920.
- Woodward, C. and Emery, P.W. (1987) Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography. *J Chrom* **419**:280–284.
- Yan, W., Suominen, J., Samson, M., Jegou, B. and Toppari, J. (2000) Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cell in vitro. *Mol and Cell Endocrinol* **165**:115–129.
- Yamamoto, C.-M., Sinha, H.A.P., Huynh, P.N., Shapiro, B., Lue, Y., Salameh, W.A., et al. (2000) Redistribution of Bax is an early step in an apoptotic leading to germ cell death in rats, triggered by mild testicular hyperthermia. *Biol Reprod* **63**:1683–1690.
- Yazawa, H., Sasagawa, I., Ishigooka, M. and Nakada, T. (1999) Effect of immobilization stress on testicular germ cell apoptosis in rats. *Human Reprod* **14**:1917–1920.
- Yazawa, H., Sasagawa, I. and Nakada, T. (2000) Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. *Human Reprod* **15**:1917–1920.
- Zhang, F.P., Pakarainen, T., Poutanen, M., Toppari, J. and Huhtaniemi, I. (2004) The low gonadotropin-independent constitutive production of testicular testosterone is sufficient to maintain spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:13692–13697.