



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

*Facultad de Ciencias Químicas-ICUAP
Posgrado en Ciencias Químicas
Área de Bioquímica y Biología Molecular*

*“Estudio endócrino – testicular en edad
reproductiva temprana y tardía en rata Wistar con
Síndrome Metabólico”*

Tesis presentada para obtener el grado de Maestro en
Ciencias Químicas en el área de Bioquímica y Biología
Molecular.

Presenta:

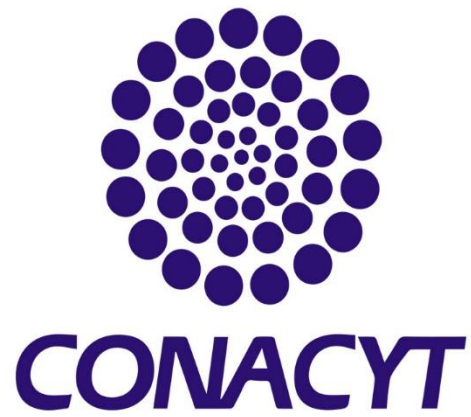
Q.F.B Hugo Hernández Fragoso

Director:

D.C Samuel Treviño Mora

Noviembre 2020





Este proyecto fue realizado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca nacional otorgada a Hugo Hernández Fragoso (921256).

«La cosa más hermosa que podemos experimentar es el misterio. Es la fuente de toda arte y toda ciencia».

Albert Einstein

Agradecimientos

A DIOS

Por estar conmigo siempre y en todo momento; por cuidarme, protegerme y darme la oportunidad de estar rodeado de personas tan extraordinarias que me han permitido crecer día con día. Por abrirme caminos y nunca dejarme a la deriva. Darme luz en aquellos momentos en donde no era tan clara.

A mi familia

Por ser y estar incondicionalmente, por apoyarme siempre y acogerme con mucho cariño cada que los visito, por siempre echarme porras y nunca dejar de creer en mí. Por ser la base de mi formación y mis principios, por la aportación de grandes cosas a mi vida, al apoyo para enfrentar esta gran aventura que es la vida.

Al D.C Samuel

Por todo el apoyo que me ha dado a lo largo de mi formación académica, por su amistad, confianza y sobre todo por creer en mí. Por ayudarme y exigirme cada vez más para que llegue a mis límites y me de cuenta de lo que puedo llegar a ser y realizar. Sobre todo, gracias por ser mi compañero y mentor en la realización de esta meta, que son tan emocionante, importante y apasionante para mí. Gracias “jefe”

Al maestro José Ángel

Por compartir conmigo la emoción y la alegría de hacer nuestro trabajo, por todos sus consejos desde el aspecto académico como personal, por permitirme ser su amigo y compartir todas esas pláticas y risas en el laboratorio hasta tarde. Cada una de sus enseñanzas y consejos los atesoro mucho puesto son muy importantes y sabios para mí. Gracias por enseñarme que lo que haces siempre debes hacerlo con alegría, emoción y que el conocimiento no está peleado con la humildad. Gracias “señor profesor”.

A mis compañeras de maestría

A **Andy, Fany, Ady e Ivonne** por ser más que mis compañeras, por ser mis grandes amigas, por todo su apoyo, su confianza y amistad, por todas esas tardes que nos las pasábamos estudiando, por todas esas charlas en el café, por escucharme y apoyarme incondicionalmente. Por estar a mi lado en esta gran aventura.

A mis sinodales

Al Doc. Eduardo, la Dra. Nora, el Doc. Victorino y el Doc. Guzmán por todo el tiempo dedicado a este proyecto, por sus observaciones, comentarios y aportaciones que permitieron mejorar el trabajo.

Al Dr. Francisco y el personal del Bioterio Claude Bernard

Por el apoyo y la mejor disposición de ayudar con los cuidados necesarios para los sujetos experimentales empleados en este proyecto.

A la Dra. Nora, Dra. Lulú y Dra. Irma

Por todas sus enseñanzas, por su exigencia y por enseñarnos a hacer con pasión nuestro trabajo, por las buenas charlas y los convivios que realizamos. Gracias por su amistad.

A Fanylu

Por todo el apoyo y la buena compañía que me brindo cuando realizamos las determinaciones hormonales, por su paciencia y su amistad.

A Getse, Fer, Hugo, Dani, David y Ari

Por todo su apoyo y por su mejor disposición de apoyarme en los sacrificios y extracción de tejidos, por llegar super temprano a pesar de los fríos, por sus platicas y el ambiente tan ameno que tenemos cuando trabajamos, muchas gracias.

A Viole, Diana y Víctor

Por apoyo brindado sobre las técnicas nuevas, por sus explicaciones y la disposición de apoyarme cuando era necesario. Gracias por su amistad.

A Steph, Nelly, Linda, Chris y Getse

Por su amistad, por permitirme trabajar con ustedes, por todas esas platicas interminables que teníamos en el cubículo, por permitirme ser su amigo y hacer que nuestra pequeña área de trabajo no importara para hacer muchos experimentos, comer y platicar.

A la Dra. Flor

Por todo su apoyo incondicional, por ser una gran amiga y un gran soporte, por todos sus consejos, regaños, platicas y todo. Agradezco a la vida y a Dios por haberla puesto en mi camino.

A las chachas

A **Saraí, Mayte y Perla** por su amistad incondicional, por esas salidas tan divertidas, por las pláticas interminables y sobre todo por los grandes consejos, por escuchar y no juzgar y apoyarme en todo momento, las quiero mucho.

Resumen

La naturaleza sistémica del síndrome metabólico (SMet) afecta diversos aspectos de la fisiología humana, de los cuales, la infertilidad masculina es una condición que puede verse influenciada por el estado metabólico del individuo. La evidencia reciente sugiere que existe una asociación directa entre los diferentes componentes de esta patología con la producción y función espermática. El objetivo de este trabajo fue conocer el efecto del SMet generado por el consumo de una dieta hipercalórica sobre los niveles hormonales del eje hipotálamo-pituitaria-gónada (HPG) y la espermatogénesis testicular en ratas Wistar en edades reproductivas temprana y tardía. Se utilizaron 40 ratas macho y fueron separadas en los grupos: normocalóricos (LabDiet 5001) e hipercalóricos (MX/E/2013/047377) durante 2 y 4 meses para obtener los grupos en edad reproductiva temprana y adulta respectivamente. Se realizó la evaluación metabólica con la curva de tolerancia oral a glucosa, respuesta a insulina, perfil de lípidos; así como la de las hormonas FSH, LH, TT, TL, E2 a nivel sérico y testicular. Además, se evaluó la expresión de los receptores hormonales: rFSH, rA, rE α y β ; complejo enzimático P450 reductasa y aromatasa, además del análisis histológico estructural-celular de los túbulos seminíferos. Los resultados muestran que el desarrollo de SMet alteró el comportamiento del eje HPG, teniendo como evidencia el incremento de FSH y estrógenos, así como la disminución de testosterona en ambos grupos experimentales. En humanos, esta condición clínica se relaciona con un cuadro de hipogonadismo primario-secundario combinado. En testículo se compensó el hipogonadismo, manteniendo el proceso espermatogénico, al modificar la expresión de receptores y complejos citocromales, en ambas edades reproductivas. Las modificaciones en la dinámica androgénica/estrogénica testicular favorecen los procesos de mitosis y meiosis I, incrementando el número de espermatogonias y espermatocitos, en la edad reproductiva temprana. Mientras que, las mismas condiciones en la edad adulta, dañan la integridad y continuidad de los túbulos seminíferos, resultando en la pérdida en la interacción célula-célula. Lo que culmina en una mayor muerte celular de espermátides. Finalmente, las alteraciones metabólicas y hormonales afectan negativamente a tejidos accesorios dependientes de andrógeno del aparato reproductor de la rata macho Wistar.

Abstract

The systemic nature of metabolic syndrome (SMet) affects multiple aspects of human physiology, male infertility is influenced by the metabolic status of each individual. Current evidence indicates that exist an association between SMet and sperm production/function. The aim was to know the SMet effect on hormonal levels of the hypothalamus-pituitary-gonad axis (HPG) and in testis, as well as its influence on spermatogenesis in pubertal and adult Wistar rats. Forty male rats were separated into the groups: normocaloric (LabDiet 5001) and hypercaloric (MX / E / 2013/047377). They were fed for 2 and 4 months with each diet to obtain the groups in early and adult reproductive age. The metabolic evaluation was performed with an oral glucose tolerance curve, insulin response, lipid profile, as well as the hormonal quantification of FSH, LH, TT, TL, and E2, in serum and in testis. In addition, we evaluated the expression of the hormonal receptors such as rFSH, rA, rE α , and rE β ; also, it was realized an histological analysis of seminiferous tubules, as well as P450 reductase and aromatase enzyme complexes. The results showed that SMet altered the behavior of the hypothalamic-pituitary-testicular axis, increasing FSH and estrogens, decreasing testosterone concentration, in both experimental groups, suggesting primary-secondary hypogonadism. Hypogonadism was compensated in the rats of both reproductive ages by modifications on the expression of receptors and cytochrome complexes. In testis, androgenic and estrogenic changes favored mitosis and meiosis I, increasing the number of spermatogonia and spermatocytes in the early reproductive age. However, in adulthood damage, these conditions cause damage to the integrity and continuity of the seminiferous tubules, which result in loss of cell-cell interaction and death of spermatids. Finally, metabolic, and hormonal disturbances negatively affect androgen-dependent accessory tissues of the male Wistar rat reproductive system.

Índice

Lista de abreviaturas	13
Índice de figuras.....	16
Índice de tablas	17
1. Marco Teórico	18
Síndrome Metabólico.....	18
Incidencia y prevalencia del SMet.....	19
Patogénia del Síndrome Metabólico	20
a) Resistencia a la insulina.....	22
b) Activación neurohormonal.	23
Desequilibrio de las hormonas sexuales en el SMet.....	23
a) Complicaciones en la reproducción masculina.....	24
Aparato reproductor de la rata macho.....	27
a) Testículos	27
b) Epidídimo	28
c) Conducto deferente	28
d) Pene.....	29
e) Glándulas accesorias.....	29
Testículo.....	29
Células del epitelio seminífero	32
Espermatogénesis.....	34
Regulación Endocrina.....	36
Estrógenos en la regulación espermatogénica	38
Rata macho como modelo de estudio endocrino	40
Fisiología reproductiva de la rata macho	40
a) Maduración postnatal.....	40
b) Pubertad y desarrollo	41
2. Planteamiento del Problema	44
3. Justificación	45
4. Objetivos	46
Objetivo General.....	46

Objetivos Específicos	46
5. Hipótesis	47
Hipótesis Nula.....	47
Hipótesis Alternativa	47
6. Diagrama de trabajo	48
7. Metodología	49
7.1 Animales	49
7.2 Conformación de grupos.....	49
7.3 Análisis zoométrico	50
7.4 Obtención de muestras	50
7.4.1 Muestras sanguíneas.....	50
7.4.2 Sacrificio	51
7.5 Ensayos	51
7.5.1 Ensayos séricos	51
7.6 Modelos matemáticos de resistencia a insulina	52
7.6.1 Resistencia a insulina periférica.....	52
7.7 Ensayos tisulares.....	52
7.8 Análisis morfométrico testicular.....	53
7.8.1 Índice gonadosomático.....	53
7.9 Análisis histológico.....	53
7.9.1 Hematoxilina-Eosina.....	53
7.9.2 Naranja de acridina y DAPI	54
7.9.3 Inmunofluorescencia	55
7.10 Análisis estadístico	55
8. Resultados	56
Efecto del consumo de una dieta hipercalórica-hiperglúcida sobre los parámetros zoométricos	56
Valoración metabólica en los grupos experimentales.....	56
Efecto de síndrome metabólico sobre las hormonas séricas involucradas en el eje Adenohipófisis -Testículo.....	58
Efecto del síndrome metabólico sobre la síntesis hormonal en testículo	59
Efecto del síndrome metabólico sobre la expresión de receptores hormonales a nivel testicular	60

Efecto del síndrome metabólico sobre la expresión de los citocromos con función reductasa y aromatasasa	65
Modificaciones citoestructurales en túbulos seminíferos causados por el síndrome metabólico.....	68
Impacto del síndrome metabólico sobre los principales tejidos andrógeno-dependientes	77
9. Discusión	79
Desarrollo de síndrome metabólico por consumo de una dieta hipercalórica-hiperglúcida	79
Efecto del SMet sobre las hormonas involucradas en el eje Adenohipófisis – Testículo.	82
a) Impacto del SMet sobre el comportamiento endocrino sérico en sujetos experimentales de edad reproductiva temprana	82
b) Impacto del SMet sobre el comportamiento endocrino sérico en sujetos experimentales de edad reproductiva tardía.	87
c) Impacto del SMet sobre el comportamiento endocrino gonadal en sujetos experimentales.....	91
Efecto del SMet sobre la expresión de receptores hormonales a nivel testicular	93
Impacto del SMet sobre la estructura y celularidad de los túbulos seminíferos.....	101
Impacto del SMet sobre las gónadas y órganos andrógeno dependientes.	104
10. Conclusión	107
11. Bibliografía.....	108
12. Anexos.....	119
Anexo 1. Determinación de la concentración de glucosa sérica.....	119
Anexo 2. Determinación de la concentración de insulina sérica	120
Anexo 3. Determinación de la concentración de colesterol total sérico	121
Anexo 4. Determinación de la concentración de triglicéridos séricos.....	122
Anexo 5. Determinación de la concentración de Fructosamina	123
Anexo 6. Determinación de la concentración de colesterol HDL reactivo precipitante.	124
Anexo 7. Determinación de la concentración de colesterol LDL reactivo precipitante	125
Anexo 8. Determinación de la concentración de ácidos grasos libres	126
Anexo 9. Determinación de la concentración de Hormona Luteinizante	127
Anexo 10. Determinación de la concentración de Hormona Folículo Estimulante.....	128
Anexo 11. Determinación de la concentración de Estradiol.....	129
Anexo 12. Determinación de la concentración de Testosterona total.....	130
Anexo 13. Determinación de la concentración de Testosterona libre	131
Anexo 14. Determinación de la concentración de Androstenediona	132

Anexo 15. Deshidratación y embebido en parafina	133
Anexo 16. Tinción de Hematoxilina-Eosina.....	134
Anexo 17. Naranja de Acridina	135
Anexo 18. Inmunohistoquímica.....	136

Lista de abreviaturas

3β-OH-SDH	Hidroxiesteroide deshidrogenasa
17OHPreg	17 α -hidroxipregnenolona
11KT	11-ceto-testosterona
11KDHT	11-ceto-dihidrotosterona
11OHA4	11 β -hidroxiandrostenediona
A4	4-Androstenediona
AACE	Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos
ABP	Proteína ligadora de andrógenos
ACC	Acetil-coa carboxilasa
ACL	ATP-citrato liasa
ACS	Acetil-coa sintetasa
ADN	Ácido dexosirribonucleico
AGL	Ácidos grasos circulantes o libres
AgRP	Proteína relacionada con Agouti
AMH	Hormona anti-Mülleriana
AMPc	Adenosin monofostato cíclico
Ang II	Angiotensina II
BHT	Barrera hematotesticular
ChREBP	Proteínas de unión a elementos reguladores de carbohidratos
CPT	Células peritubulares
CREB	Responsive element binding protein
DE	Disfunción eréctil
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotosterona
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DN	Promedio nuclear
DSP	Producción diaria de esperma
E2	Estradiol
EAU	Asociación Europea de Urología
EEM	Error estándar de la media
EGIR	Grupo Europeo para el estudio de la resistencia a la insulina
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente vinculado a la enzima de fase sólida
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
FAS	Ácido graso sintasa
FID	Federación Internacional de Diabetes

FSH	Hormona foliculoestimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
GSI	Índice gonadosomático
HOMA-IR	Homeostatic model assessment
HPG	Eje hipotálamo-pituitario-gonadal
HRE	Hormone response element
ID2	Inhibidor de unión y diferenciación de ADN
IDE	Índice socioeconómico
IGF-1	Factor similar a la insulina
IHC	Inmunohistoquímica
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Masa Corporal
In	Espermatogonias intermedias
INSR	Receptor de insulina
LDL	Lipoproteína de muy baja densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDL-r	Receptor de LDL
LH	Hormona luteinizante
LH	Hormona luteinizante
LOX-1	Receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas 1
L-PK	Piruvato quinasa de tipo L
NA	Naranja de Acridina
NCEP ATP III	Panel III de Tratamiento de Adultos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NPY	Neuropéptido Y
OH-SDH	Hidroxiesteroide deshidrogenasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OMS	Obesos metabólicamente saludables
P450arom	Citocromo aromatasa P450
P450c17	Enzima CYP17A1
P450red	Citocromo reductasa P450
P450scc	Enzima CYP11A1
PCR	Proteína c reactiva
PGH	Producción de glucosa hepática
POMC	Propiomelanocortina

PYY	Péptido YY
RA	Receptor de testosterona-andrógeno
RE	Receptor estrogénico
rEα	Receptor de estrógenos tipo alfa
rEβ	Receptor de estrógenos tipo beta
rFSH	Receptor de la hormona foliculoestimulante
rGnRH	Receptor de GnRH
RI	Resistencia a la insulina
SCD1	Estearoil-coa desaturasa-1
SHBG	Globulina de unión a la hormona sexual hepática
SMet	Síndrome metabólico
SOPC	Síndrome de Ovario Poliquístico
SRA	Sistema renina-angiotensina
SREBP	Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides
StAR	Proteína reguladora aguda esteroidogénica
TGF	Factor de crecimiento transformante
TKM	TRIS-cloruro de potasio-magnesio
TL	Testosterona libre
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TT	Testosterona total
USF	Inhibidor del factor estimulante rio arriba
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos fisiopatológicos en el síndrome metabólico..	21
Figura 2. Regulación hormonal del eje hipotálamo-hipófisis- gónada en el hombre por hormonas afectadas en el síndrome metabólico.	25
Figura 3. Aparato reproductor masculino de la rata.....	28
Figura 4. Organización testicular.	30
Figura 5. Fases del desarrollo de los espermatozoides a partir de las espermatogonias..	31
Figura 6. Esquema de los 14 estadios del ciclo del epitelio seminífero de los testículos de la rata macho adulta.....	35
Figura 7. Regulación endocrina del eje hipotálamo-Hipófisis-Testículo.....	37
Figura 8. Ruta de síntesis esteroidea.	39
Figura 9. Etapas de crecimiento fisiológico de ratas macho..	41
Figura 10. Maduración postnatal del eje HPG masculino.....	43
Figura 11. Expresión del receptor de la hormona folículo Estimulante (rFSH) en túbulos seminíferos en edades reproductivas experimentales.....	61
Figura 12. Expresión del receptor de andrógenos (rA) en túbulos seminíferos en edades reproductivas experimentales..	63
Figura 13. Expresión del receptor de estrógenos (rE) tipo alfa(rE α) y beta (rE β) en túbulos seminíferos en edades reproductivas experimentales.....	64
Figura 14. Relación entre la expresión del receptor de estrógenos (rE) tipo alfa/beta (rE α / rE β) en túbulos seminíferos.....	65
Figura 15. Expresión del citocromo P450-Aromatasa (P450-Aro) en túbulos seminíferos en edades reproductivas experimentales.	66
Figura 16. Expresión del citocromo P450-Reductasa (P450-Red) en túbulos seminíferos en edades reproductivas experimentales.	68
Figura 17. Histología de los túbulos seminíferos de ratas macho Wistar en edad reproductiva temprana..	71
Figura 18. Histología de los túbulos seminíferos de ratas macho Wistar en edad reproductiva tardía.	72
Figura 19. Impacto del síndrome metabólico sobre el área celular y número de células en túbulos seminíferos de ratas macho Wistar en edades reproductivas experimentales..	73

Figura 20. Impacto del síndrome metabólico sobre el número de células espermáticas en edades reproductivas experimentales.	74
Figura 21. Efecto del síndrome metabólico sobre las características nucleares de células espermáticas en edades reproductivas experimentales.....	76
Figura 22. Fluorescencia con Naranja de Acridina de túbulos seminíferos en edades reproductivas experimentales.	77
Figura 23. Efecto del consumo de una dieta hipercalórica hiperglúcida en ratas macho Wistar	82
Figura 24. Efecto del consumo de una dieta hipercalórica-hiperglúcida en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo en edad reproductiva temprana y adulta.	90
Figura 25. Impacto del SMet en la dinámica de expresión de receptores hormonales implicados en el eje HPG y en la estructura de los túbulos seminíferos.	105

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios propuestos para el diagnóstico clínico del síndrome metabólico	19
Tabla 2. Análisis zoométrico y metabólico de los grupos experimentales.....	57
Tabla 3. Análisis hormonal sérico de los distintos grupos experimentales	59
Tabla 4. Análisis de colesterol y hormonas en testículo de los distintos grupos experimentales	60
Tabla 5. Características testiculares y de tejidos andrógeno dependientes de los diferentes grupos experimentales.	78

1. Marco Teórico

Síndrome Metabólico

El síndrome metabólico (SMet) es el resultado de un desequilibrio general de los procesos metabólicos, fisiológicos, bioquímicos y clínicos interconectados que incluyen hipertensión, obesidad central, resistencia a la insulina y dislipidemia aterogénica, y está fuertemente asociado con un mayor riesgo de desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares aterosclerótica y no aterosclerótica [Grundy SM, 2004].

El concepto de SMet es conocido desde hace muchos años, pero no existe una definición universal aceptada. Actualmente, los criterios utilizados son establecidos por: Organización Mundial de la Salud (OMS), el Grupo Europeo para el estudio de la resistencia a la insulina (EGIR), el Panel III de Tratamiento de Adultos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP ATP III), la Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos (AACE) y la Federación Internacional de Diabetes (FID) [Alberti KG, 1998; Balkau B, 1999; Cleeman JI, 2001; Einhorn D, 2003]:

Tabla 1. Criterios propuestos para el diagnóstico clínico del síndrome metabólico

Medida clínica	OMS (1998)	EGIR (1999)	ATP III (2001)	AACE (2003)	FDI (2005)
Resistencia a la insulina	IGT, IFG, DM2 o sensibilidad reducida de la insulina. más 2 de los siguientes	Insulina en plasma > percentil 75 más cualquiera de los 2 siguientes	Ninguna, pero cualquiera de las 3 características siguientes	IGT o IFG más cualquiera de los siguientes basados en el juicio clínico	Ninguna
Peso corporal	Relación cintura- cadera: Hombres: >0.90 Mujeres: > 0,85 IMC > 30 kg / m ²	Circunferencia de cintura: Hombre: ≥94 cm Mujeres: ≥80 cm	Circunferencia de cintura: Hombre: ≥ 102 cm en Mujer: ≥ 88 cm	IMC ≥ 25 kg / m ²	Aumento de la circunferencia de cintura y más 2 de los siguientes
Lípidos	Tg ≥150 mg/dL Colesterol-HDL: Hombre: <35 mg/dL Mujer: <39 mg/dL	Tg ≥150 mg/dL Colesterol-HDL: <39 mg/dL en hombres o mujeres	Tg ≥150 mg/dL Colesterol-HDL: Hombre: < 40 mg/dL Mujer: < 50 mg/dL	Tg ≥150 mg/dL Colesterol-HDL: Hombre: < 40 mg/dL Mujer: < 50 mg/dL	Tg ≥150 mg/dL Colesterol-HDL: Hombre: < 40 mg/dL Mujer: < 50 mg/dL
Presión sanguínea	≥140 / 90 mm Hg	≥140 / 90 mm Hg	≥130 / 85 mm Hg	≥130 / 85 mm Hg	≥130 mm Hg sistólica o ≥85 mm Hg diastólica
Glucosa	IGT, IFG o DM2	IGT o IFG (pero no diabetes)	> 110 mg / dL (incluye diabetes)	IGT o IFG (pero no diabetes)	≥100 mg/dL (incluye diabetes)
Otro	Micro albuminuria: tasa de excreción urinaria de > 20 mg /min o Proporción de albúmina: creatinina de > 30 mg / g.			Otras características de la resistencia a la insulina	

IMC: índice de masa corporal; IFG: glucosa en ayunas alterada; IGT: tolerancia a la glucosa alterada; Tg: triglicéridos, DM2: Diabetes Mellitus tipo 2. (Adaptado del informe de la Asociación Estadounidense del Corazón / Instituto Nacional del Corazón, los pulmones y la sangre).

Incidencia y prevalencia del SMet

La incidencia del SMet a menudo es paralela a la incidencia de obesidad y a la de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Según una encuesta mundial sobre obesidad en 195 países, realizada en 2015, 604 millones de adultos y 108 millones de niños son obesos. Desde 1980, la prevalencia de obesidad se duplicó en 73 países y aumentó en la mayoría de otros países. De mayor preocupación fue el de un aumento mayor en la obesidad infantil. El mayor aumento en la prevalencia de obesidad en hombres jóvenes (25–29 años) ocurrió en países con bajo índice socioeconómico (IDE). En las últimas tres décadas, la prevalencia pasó de 1.1% en 1980 a 3.85 en 2015. Entre 1990 y 2015, la tasa de mortalidad global relacionada con un IMC alto aumentó en 28.3% [Obesity collaborators GBD, 2017].

Según el atlas de diabetes de la Federación Internacional de Diabetes (FID) [Ogurtsova K, 2017], hoy en día la prevalencia mundial de diabetes es del 9.3% (463 millones) de los adultos entre 20 y 79 años. Además, 1.1 millones de niños y adolescentes menores de 20 años viven con diabetes tipo 1. Se espera que para el 2030 serán 578 millones de adultos con diabetes, y 700 millones para el 2045. La prevalencia más alta de diabetes se produjo en la región de Oriente medio y norte de África (12,2%). Mientras que en América del Norte y Caribe es del 11.1 % (48 millones). Sin embargo, se espera que para el 2045 se alcance hasta el 13.0% (63 millones) [Federación Internacional de Diabetes, 2019].

No existen datos globales similares sobre el SMet, que es más difícil de medir, pero dado que el SMet es aproximadamente tres veces más común que la diabetes, se puede estimar que la prevalencia global es aproximadamente una cuarta parte de la población mundial. En otras palabras, más de mil millones de personas en el mundo están afectadas por esta patología [Saklayen MG, 2018].

Al analizar la prevalencia del SMet, es necesario tener en cuenta muchos factores. En las generaciones más jóvenes, la prevalencia está influenciada principalmente por los criterios diagnósticos adoptados, seguidos de la edad y el origen étnico. La prevalencia está inversamente relacionada con el nivel educativo, el estilo de vida (dieta alta en grasas y carbohidratos y falta de ejercicio) y el estado socioeconómico. La rápida urbanización se ha considerado un factor principal para la creciente incidencia de SMet [Ahima RS, 2016].

Patogenia del Síndrome Metabólico

Los mecanismos patogénicos del SMet son complejos y aún no se han dilucidado por completo. En la actualidad, existe debate en considerar si los componentes individuales del SMet representan patologías distintas o manifestaciones de un mecanismo patogénico común. La amplia variación en la distribución geográfica y el desarrollo de países subdesarrollados enfatizan la importancia de los factores ambientales y del estilo de vida, como el consumo de exceso de calorías y la falta de actividad física como los principales contribuyentes [Matsuzawa Y, 2011].

Se ha demostrado que la adiposidad visceral es un desencadenante principal para la mayoría de las vías involucradas en el SMet, lo que subraya la importancia de una alta ingesta calórica como un factor causal importante [Matsuzawa Y, 2011]. De todos los mecanismos propuestos, la resistencia a la insulina, la activación neurohormonal y la inflamación crónica parecen ser los principales actores en el inicio, la progresión y la transición del SMet a enfermedades cardiovasculares (Figura 1) [Rochlani Y, 2017].

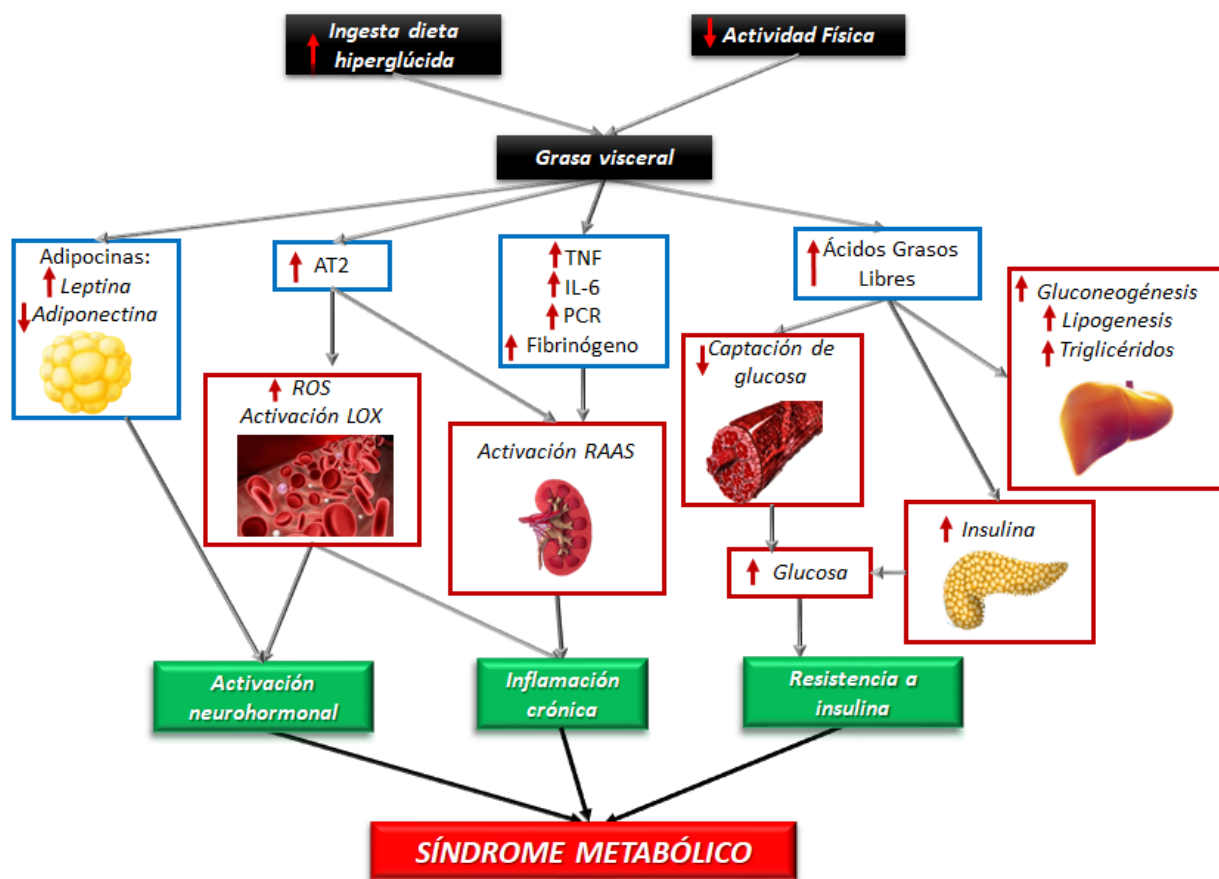


Figura 1. Mecanismos fisiopatológicos en el síndrome metabólico. AT2, receptor de angiotensina II tipo 2; PCR, proteína C reactiva; IL-6, interleucina 6; LOX, lipoproteína de baja densidad oxidada similar a lectina; RAAS, sistema renina-angiotensina-aldosterona; ROS, especies reactivas de oxígeno; TNF, factor de necrosis tumoral. Tomada y modificada de Yogita Rochlani, 2017.

a) Resistencia a la insulina.

De manera fisiológica, la insulina aumenta la absorción de glucosa en el músculo y el tejido adiposo, sin embargo, en el hígado inhibe la lipólisis y la gluconeogénesis. La resistencia a la insulina (RI) puede establecerse de manera multitisular en la gran mayoría de los pacientes con SMet. La RI se caracteriza por una serie de modificaciones en la vía normal de transducción de señales del receptor de insulina (INSR) [Petersen MC, 2018]. El desarrollo de hiperinsulinemia como resultado de la compensación de las células β en estadios tempranos de la patología, e hiperglucemia sostenida en estados posteriores de DM2. En el tejido adiposo, deteriora la inhibición de la lipólisis mediada por la hormona, lo que lleva a un aumento en los ácidos grasos libres (AGL) circulantes que inhiben aún más el efecto antilipolítico de la insulina [Boden G, 2002]. Los AGL inhiben la activación de la proteína quinasa MAPK en el músculo, lo que reduce la absorción de glucosa. Aumentan la activación de la proteína quinasa en el hígado que promueve la gluconeogénesis y la lipogénesis. El efecto neto es la generación de un estado hiperinsulinémico para mantener la euglucemia. Finalmente, la compensación falla y la secreción de insulina disminuye [Rochlani Y, 2017]. Los AGL también son lipotóxicos para las células beta del páncreas, por lo que causan una disminución de la secreción de insulina [Tooke JE, 2000]. La RI contribuye al desarrollo de hipertensión debido a la pérdida del efecto vasodilatador de la insulina y la vasoconstricción causada por los AGL [Tripathy D, 2003]. Los mecanismos adicionales incluyen una mayor activación simpática y reabsorción de sodio a nivel renal; un aumento en la viscosidad sérica, la inducción de un estado protrombótico y la liberación de citocinas proinflamatorias del tejido adiposo que contribuyen a un mayor riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares [Juhan-Vague, 2003].

Además, los depósitos de grasa visceral contribuyen a la RI más que la grasa subcutánea, ya que la lipólisis visceral conlleva a un mayor suministro de AGL al hígado a través de la circulación esplénica. Esto a su vez conduce a una mayor síntesis de triglicéridos y a la producción de apolipoproteína B en el hígado, que caracteriza a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) ricas en triglicéridos [Lewis GF, 1996]. El aumento del colesterol LDL y la reducción del colesterol HDL son efectos indirectos de la RI causada por el metabolismo alterado de los lípidos [Rochlani Y, 2017].

b) Activación neurohormonal.

Dentro de las adipocinas liberadas por el tejido adiposo visceral y que se relacionan con el desarrollo del SMet se encuentra a la leptina, la cual controla la homeostasis energética mediada por el hipotálamo, e integra la señalización de insulina en diversos tejidos. Otra de las adipocinas de importancia es la adiponectina, que tiene propiedades antiinflamatorias - antiaterogénicas al disminuir la reactividad vascular y la proliferación del músculo liso [Lindsay RS, 2002]. La adiponectina se ha considerado un factor protector contra el desarrollo de diabetes, hipertensión e infarto agudo de miocardio [Ouchi N, 2003].

La activación del sistema renina-angiotensina (SRA) también sirve como una importante vía neurohumoral que se afecta durante el desarrollo de SMet. La obesidad y la RI están asociadas con una mayor producción de Ang II [Vanecková I, 2014]. Ang II, a través de la interacción con el receptor de angiotensina tipo 1 conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) [Mehta, PK, 2007]. Las ERO's conllevan a una multitud de efectos que incluyen la oxidación de colesterol LDL, lesión endotelial, agregación plaquetaria, expresión del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB), y la expresión del receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas 1 (LOX-1) en el endotelio y las células vasculares del músculo liso [Gobal, F, 2011]. SRA, ERO y LOX-1 tienen un circuito de retroalimentación positiva interrelacionado que inicia un círculo vicioso de inflamación, daño endotelial y proliferación de fibroblastos que contribuye al desarrollo de hipertensión, dislipidemia, diabetes, hipertrofia cardíaca y enfermedades cardiovasculares [Dai, Y, 2013].

Desequilibrio de las hormonas sexuales en el SMet

Se han encontrado similitudes cardiometabólicas entre mujeres con exceso de andrógenos y hombres con deficiencia de andrógenos [Power ML, 2008]. La proporción equilibrada entre estrógenos y andrógenos juega un papel importante en el mantenimiento del metabolismo energético, la composición corporal y la función sexual [Nielsen S, 2004]. También la modulación bidireccional de la homeostasis de glucosa y lípidos por las hormonas sexuales y su activación a través de receptores en objetivos centrales y periféricos en ambos sexos están influenciados por estrógenos y andrógenos [Varlamov O, 2014; Mauvais-Jarvis F, 2015; Navarro G, 2015]. En las mujeres, los niveles más altos de andrógenos conducen

a un mayor peso corporal. En general, los niveles de testosterona relativamente más altos en mujeres y los niveles más bajos en los hombres, se relacionan con la incidencia de diabetes [Ding EL, 2006].

a) Complicaciones en la reproducción masculina

La naturaleza sistémica del SMet afecta muchos aspectos de la fisiología humana. La infertilidad masculina es una condición que puede verse influenciada por el estado metabólico del individuo. La evidencia reciente sugiere que existe una asociación directa entre los diferentes componentes esta patología y la producción/función espermática. El factor masculino contribuye entre el 20 y 50% de las causas de infertilidad entre las parejas. El aumento en la prevalencia del SMet, en los últimos años ha coincidido con una disminución en la calidad del semen entre los varones adultos [Martins AD, 2019].

Aunque cada comorbilidad que forma parte de la definición de SMet tiene efectos sobre la fertilidad masculina por separado, en el SMet estos elementos pueden tener efectos aditivos sobre la fertilidad. Los estudios que exploran los efectos de SMet en la fertilidad masculina son recientes. En 2013, Lotti y colaboradores [Lotti F, 2013] estudiaron la asociación entre el SMet y las características clínicas de los hombres de parejas infértiles. En este estudio, un modelo ajustado por edad mostró que el SMet se asoció con una disminución en la testosterona total, sin alteraciones en los niveles de gonadotropinas. Así mismo, informó una correlación negativa entre el número de componentes de dicha patología y la motilidad espermática progresiva, con morfología normal. El riesgo de disfunción eréctil (DE) aumentó con el número de factores del SMet, incluso después de ajustar la edad y los niveles de testosterona. Demostrando una asociación entre el SMet y el desarrollo de hipogonadismo, teratozoospermia y disfunción eréctil en hombres de parejas infértiles [Lotti F, 2014].

Leisegang y colaboradores compararon pacientes masculinos, con y sin SMet, e informaron una menor concentración de espermatozoides, baja motilidad y viabilidad de los espermatozoides, así como alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial, niveles de testosterona y progesterona libres, y una mayor fragmentación del ADN espermático en hombres con SMet [Leisegang K, 2014]. En 2016, el grupo de investigación de Ventimiglia examinó a hombres que presentaban infertilidad primaria con o sin SMet de acuerdo con los criterios NCEP-

ATPIII. Estos pacientes presentaron una mayor probabilidad de ser hipogonadales, tenían niveles más bajos de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), inhibina B y hormona antimulleriana. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los parámetros del semen entre los dos grupos [Ventimiglia E, 2016].

Estos estudios sugieren que el SMet puede tener un efecto perjudicial en funciones reproductivas importantes (Figura 2), como el estado endocrino o los parámetros del semen, y exigen el desarrollo de nuevas investigaciones de diseño superior para determinar con precisión esta asociación.

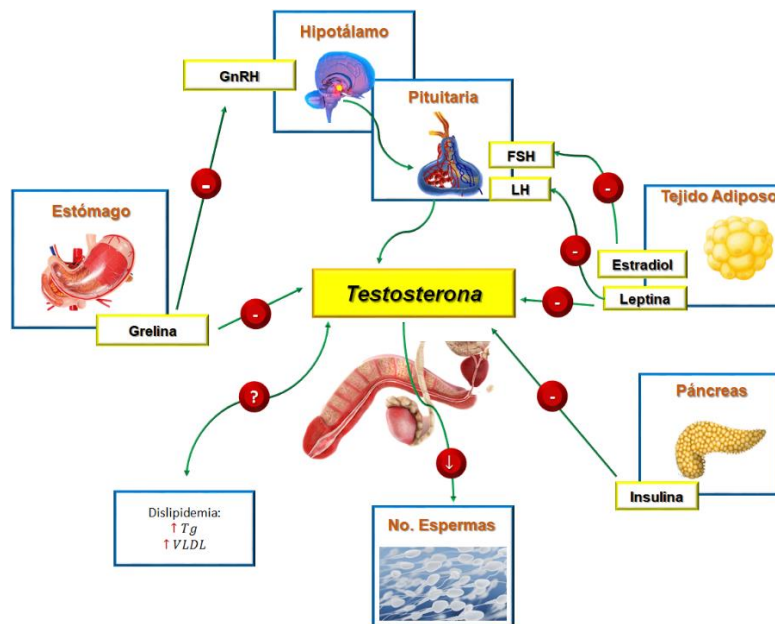


Figura 2. Regulación hormonal del eje hipotálamo-hipófisis- gónada en el hombre por hormonas afectadas en el síndrome metabólico. GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, FSH: hormona estimulante del folículo, LH: hormona luteinizante, TG: triglicéridos, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad. Tomada y modificada de Martins AD, 2019.

Los efectos del SMet sobre la fertilidad masculina y las funciones espermáticas pueden ocurrir como consecuencia de varios mecanismos:

- 1) Un desequilibrio entre la proporción de testosterona y estradiol y, en consecuencia, otras hormonas sexuales.
- 2) Inflamación excesiva y estrés oxidativo como resultado de los altos niveles de adipocinas y toxinas en el tejido adiposo de los hombres obesos.
- 3) Aumento de la temperatura gonadal debido a una acumulación de tejido adiposo en la región escrotal que deteriora la espermatogénesis.
- 4) La desregulación de la leptina puede alterar el eje hipotálamo-pituitario-gonadal (HPG) [Martins AD, 2019].

En varones con SMet, un aumento en la actividad de la enzima aromatasa en los adipocitos resulta en la conversión periférica de testosterona en estradiol [Pozza C, 2018]. Una vez que los niveles de estradiol aumentan, se observa una retroalimentación negativa sobre la secreción de LH, lo que lleva a la supresión del eje HPG y, en consecuencia, a una reducción en la producción de testosterona por las células de Leydig [Repaci A, 2014]. El estradiol también juega un papel crítico en el desarrollo de células germinales, y las variaciones en los niveles de estrógeno pueden afectar la espermatogénesis.

Los adipocitos son los principales productores de leptina, y esta hormona *per se* afecta la liberación de LH y FSH desde la pituitaria, alterando no solo la amplitud de las concentraciones de estas hormonas, sino también la pulsatilidad, lo que altera el equilibrio del eje HPG, sobre todo en casos de un exceso de tejido adiposo [George JT, 2010]. La deposición de tejido adiposo alrededor de los vasos escrotales puede reducir la espermatogénesis en varones con SMet, disminuyendo el enfriamiento de la sangre y, en consecuencia, aumentando la temperatura testicular. La relación entre la lipomatosis escrotal y la infertilidad masculina se ha descrito en pacientes con SMet. Estudios más recientes exploraron la conexión entre el estrés oxidativo y la fertilidad. El estrés oxidativo es una causa reconocida de disfunción espermática, ya que ocasiona peroxidación lipídica de la membrana espermática, fragmentación del ADN y agrava la apoptosis. El exceso de tejido adiposo se asocia con un aumento en la producción local y sistémica de adipocitocinas proinflamatorias, que inducen la producción de ERO's promoviendo una respuesta inflamatoria sistémica de bajo grado con efectos adversos en todo el cuerpo, incluido el tracto reproductivo [Sengenès C, 2007].

Además de los efectos negativos sobre el recuento de espermatozoides, la motilidad y la integridad del ADN, también se observaron volúmenes de eyaculación más bajos en hombres diabéticos y con SMet [Bhattacharya SM, 2014]. Los estudios mencionados proporcionan evidencia sólida sobre los efectos negativos de la diabetes en la fertilidad masculina. La fisiopatología de estos efectos se ha estudiado en una serie de modelos humanos y animales, por lo que se cree que ocurren de manera secundaria a alteraciones en el entorno testicular, la homeostasis de testosterona, la función eyaculadora y la libido [Jangir RN, 2014].

Aparato reproductor de la rata macho

Las principales funciones del sistema reproductor masculino son:

- 1) La producción y almacenamiento temporal de los espermatozoides.
- 2) Sintetizar y secretar un conjunto de sustancias que en conjunto conforman el semen.
- 3) Depositar el semen durante el coito en el tracto genital femenino (vagina).
- 4) Sintetizar y secretar, al torrente circulatorio, andrógenos, siendo la testosterona la principal hormona.

Está constituido por dos testículos, dos epidídimos, dos conductos deferentes, glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándula coagulante y bulbo uretral) y por el órgano copulador (Figura 3) [Suckow, M., 2005]:

a) Testículos

El tamaño de los testículos en relación con el peso corporal de la rata varía entre los individuos. Sin embargo, dentro de los mamíferos, el tamaño aumenta cuando los hábitos de apareamiento son más polígamos que monógamos. En las ratas, los testículos son más grandes debido a sus hábitos de apareamiento polígamos.

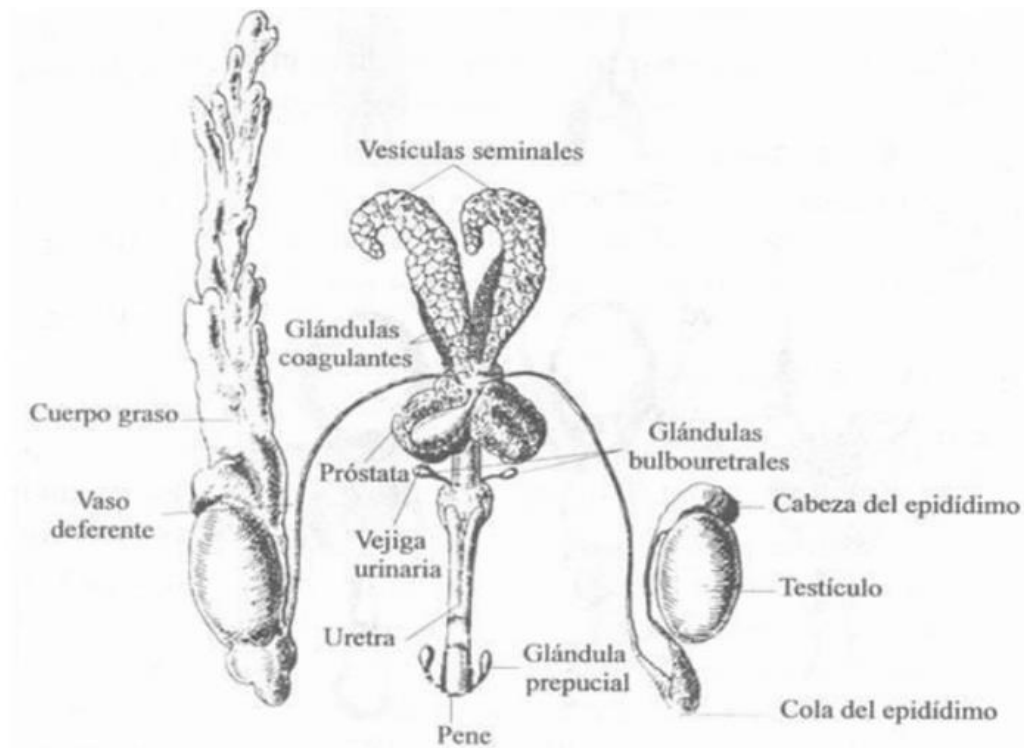


Figura 3. *Aparato reproductor masculino de la rata.* Modificado de Setchell y cols., 1994.

b) Epidídimo

Los testículos están parcialmente cubiertos por el epidídimo que consta de 3 regiones: cabeza (ubicado en la parte superior), el cuerpo (que baja, por un lado) y la cola (la parte inferior de los testículos). La cabeza del epidídimo está envuelta en grasa y conduce al conducto deferente. El epidídimo almacena los espermatozoides que se han generado dentro de los testículos.

c) Conducto deferente

Los conductos deferentes son estructuras tubulares largas en el canal inguinal que van desde el epidídimo a la uretra. Llevan el esperma al pene.

d) Pene

El pene transporta la orina y el semen a través de la uretra y fuera del cuerpo. Es una estructura cartilaginosa única que proporciona la rigidez para la cópula. El pene está cubierto por el prepucio. La superficie externa del prepucio es la piel y la superficie interna es la membrana mucosa.

e) Glándulas accesorias

La rata macho tiene 5 pares de glándulas sexuales accesorias: glándulas vesiculares y coagulantes; glándulas de Cowper; glándulas prepuciales y glándulas prostáticas. Las secreciones de estas glándulas sirven para nutrir y activar los espermatozoides, para limpiar el tracto uretral antes de la eyaculación, sirven como un medio para transportar los espermatozoides al tracto femenino y para crear un tapón copulatorio para ayudar a asegurar la fertilización [Suckow, M., 2005].

Testículo

En mamíferos, los testículos están compuestos por una gruesa capa de tejido conjuntivo, la túnica albugínea; de esta estructura salen septos que se extienden y dividen al testículo en compartimentos piramidales, los lobulillos, cada lobulillo está constituido por varios túbulos seminíferos.

Estructuralmente en este órgano se distinguen tres compartimentos: el tubular, ocupado esencialmente por el epitelio seminífero; el peritubular, donde se presentan las células mioepiteliales; y el intersticial, que representa aproximadamente el 15% del volumen total del órgano, donde se encuentran los vasos sanguíneos, linfáticos, células de tejido conjuntivo y de Leydig (Figura 4) [Gartner L, 2007].

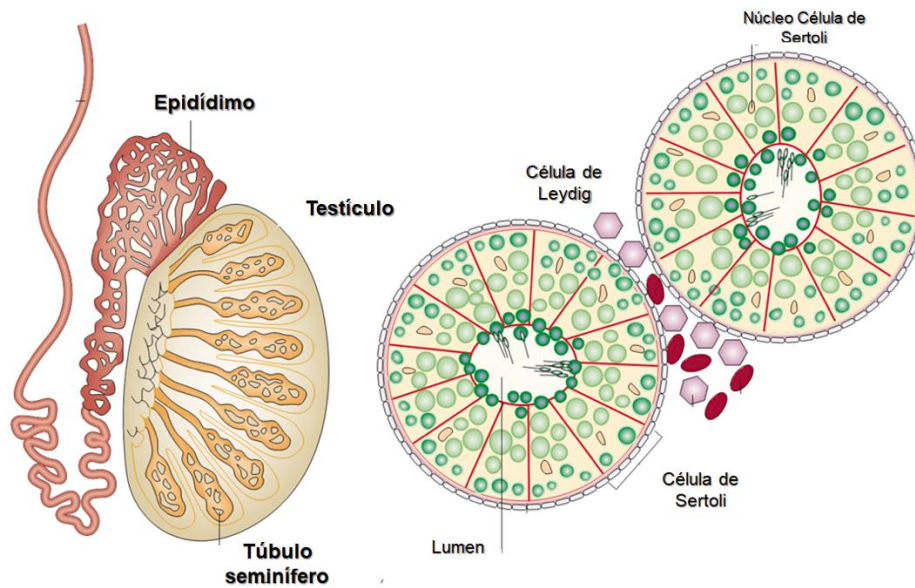


Figura 4. Organización testicular. Tomado y modificado de Zhang, Y. 2013.

En el espacio intersticial, es decir, entre los túbulos seminíferos se localizan las células de Leydig, las cuales presentan forma poliédrica, poseen un citoplasma acidófilo con un núcleo esférico con predominio de eucromatina y un nucléolo notable. La microscopía electrónica muestra un citoplasma lleno de túbulos de retículo endoplásmico liso y abundantes mitocondrias con crestas tubulares, característica morfológica de las células que sintetizan y secretan esteroides. En el citoplasma se observan pequeñas gotitas de lípidos y unos cristales romboidales de naturaleza proteínica (cristales de Reinke). Estas células, están encargadas de sintetizar y secretar andrógenos (testosterona). Además, se caracterizan porque se agrupan alrededor de capilares sanguíneos formando acumulaciones celulares.

Por otro lado, los túbulos seminíferos están rodeados por una capa de células derivadas de células mesenquimatosas. Las cuales, se disponen unidas entre sí para integrar una especie de membrana celular continua. Son células alargadas fusiformes, similares a las fibras musculares lisas. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se les ha demostrado que poseen componentes proteínicos de actina y miosina, por lo que presentan capacidad contráctil, por esta razón se le conocen como células mioides (miofibrocitos). Encima de ellas se sitúa una membrana basal que sostiene a las células del epitelio seminífero; constituido por estratos de células germinales

y de células localizadas entre ellas, que reciben el nombre de células de sostén, sustentaculares o de Sertoli.

El epitelio seminífero es una secuencia de células germinales que por divisiones sucesivas mitóticas y meióticas, originan a los espermatozoides (células haploides y flageladas). El proceso de transformación de las células del epitelio seminífero para formar espermatozoides, se denomina espermatogénesis (Figura 5) [César, 2015].

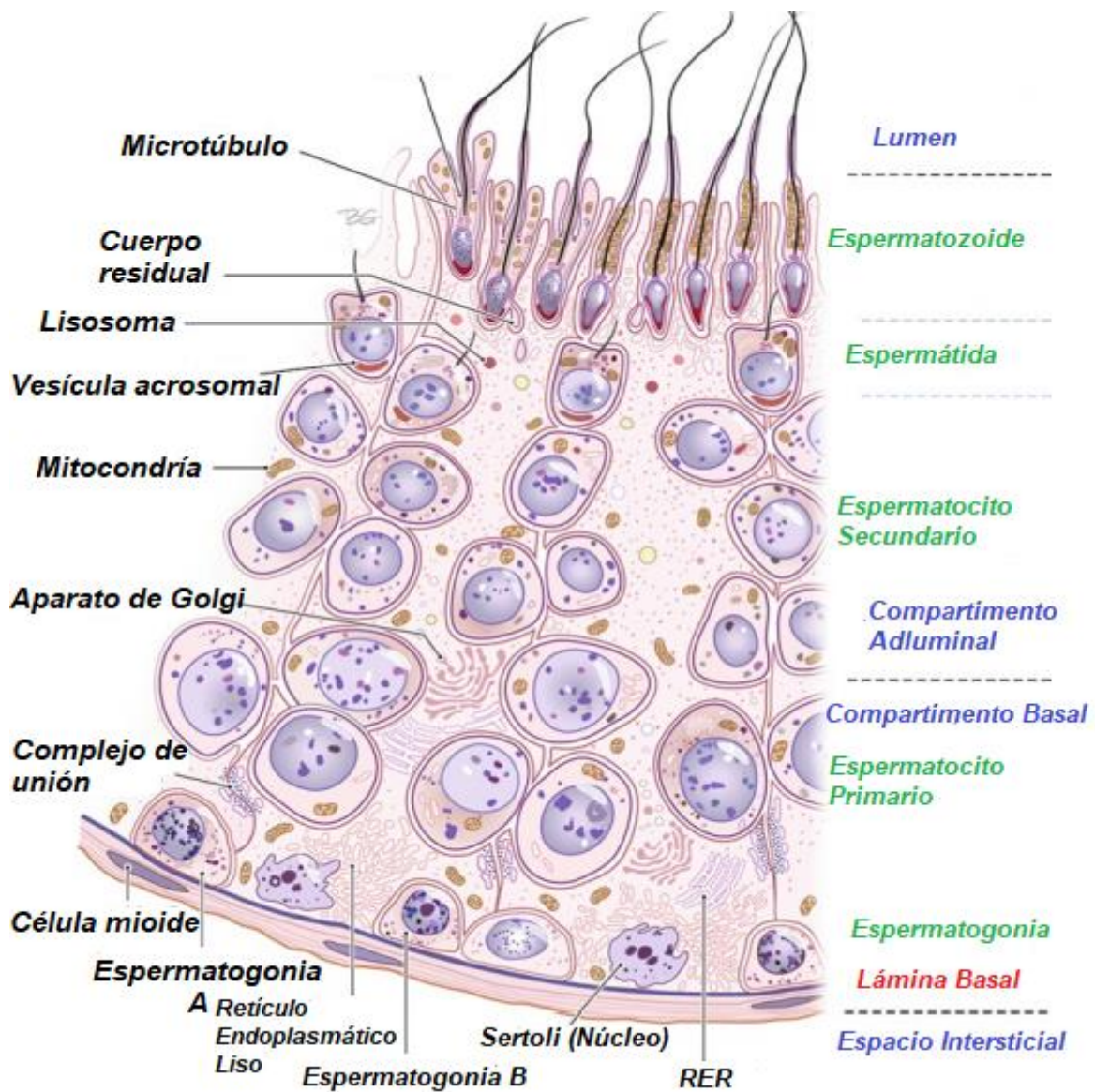


Figura 5. Fases del desarrollo de los espermatozoides a partir de las espermatogonias. Tomado y modificado de Sharma, Rakesh y Agarwal, 2013.

Células del epitelio seminífero

1) *Células de Sertoli*: Son células de formas cilíndricas piramidales, localizadas entre porciones del epitelio seminífero. Presentan bordes laterales escotados debido a que las células del epitelio seminífero, especialmente las espermatidas, se alojan en concavidades de su citoplasma medio y apical con la finalidad que, en un proceso de transformación morfológica, denominado espermiogénesis o espermateliosis se transformen en espermatozoides. Las células de Sertoli se caracterizan porque se extienden desde la membrana basal hasta la luz del tubulillo seminífero. Presentan un núcleo elipsoidal con una o dos escotaduras que le proporcionan un contorno irregular, el nucleoplasma es uniforme y sobresale en él la presencia de un nucléolo esférico y prominente rodeado de dos masas redondeadas de heterocromatina. El citoplasma es ligeramente acidófilo, posee abundante retículo endoplásmico liso y gotículas de lípidos. Está demostrado que estas pueden sintetizar estrógenos (al poseer una enzima aromataasa), a partir de la presencia de precursores de andrógenos en su citoplasma. Producen varios factores que tienen acción directa sobre la espermatogénesis; en ellas se sintetiza la proteína ligadora de andrógenos (ABP) que capta y fija la testosterona proveniente de las células intersticiales o de Leydig y la proteína inhibina, que a través de la circulación sanguínea frena la secreción de FSH [Kopera IA, 2010].

Las células de Sertoli están conformadas por dos recintos diferentes:

- a) Un compartimento basal que comprende el espacio situado entre la pared del tubulillo y la superficie interna de las prolongaciones de las células de Sertoli; este espacio alberga cantidades apreciables de hormonas esteroideas (andrógenos y estrógenos) así como aminoácidos y iones. En este compartimento se alojan las espermatogonias.
- b) Un compartimento adluminal situado entre la superficie externa de las prolongaciones unidas y la luz del tubulillo. Gracias a las uniones laterales de las células de Sertoli; este compartimento mantiene un microambiente totalmente distinto al del compartimento basal, por lo que no llegan sustancias dañinas o tóxicas que podrían alterar en gran medida a los otros estadios celulares del epitelio seminífero. Asimismo, esta barrera impide que proteínas provenientes de las otras células del epitelio seminífero y,

especialmente de los espermatozoides (producidas durante la espermiogénesis) puedan atravesar la pared del tubulillo seminífero y lleguen al torrente circulatorio intertubulillar y generar una respuesta autoinmune contra los espermatozoides y producir esterilidad [Kopera IA, 2010]. Las células de Sertoli desarrollan una gran capacidad fagocítica. Durante la transformación de las espermatidas en espermatozoides, los restos citoplasmáticos de las espermatidas (cuerpo residual o “gota citoplasmática”) son endocitados para ser digeridos posteriormente [Sikka SC, 2008].

2) *Espermatogonias*: Son células diploides, ($2n$ cromosomas) localizadas en la porción más profunda del epitelio seminífero. Se reconocen dos tipos de espermatogonias:

a) **Espermatogonias de tipo A**: son células con forma de cúpula que se apoyan en la membrana basal: Tienen un núcleo ovoide, con escasa cantidad de heterocromatina y dos nucléolos. Se consideran células madre del epitelio seminífero. Mediante división celular algunas de ellas permanecen como espermatogonias A, en tanto que las otras se transforman en las espermatogonias tipo B [Sharma, Rakesh y Agarwal, 2013].

b) **Espermatogonias de tipo B**: son células con núcleos esféricos y grumos de heterocromatina excéntrica y un solo nucléolo de posición central. Por influencia de la hormona hipofisaria, folículo estimulante, las espermatogonias de tipo B se multiplican activamente, por varias generaciones hasta que, mediante la síntesis de abundante material citoplasmático, crecen para transformarse en espermatoцитos primarios [Sharma, Rakesh y Agarwal, 2013].

3) *Espermatoцитos primarios*: Son células que se desplazan hacia la luz del tubulillo. Son diploides, ($2n$ cromosomas) grandes y redondeadas con un núcleo voluminoso en donde la cromatina se dispone de manera diferente dependiendo de la etapa de la profase meiótica en que se encuentre el espermatoцитo primario. En la fase de leptoteno, los núcleos se observan integrados por cromatina en forma de filamentos delgados. En las fases de cigoteno y paquiteno es posible distinguir los cromosomas homólogos juntos y engrosados. Después de esta fase, continúa la fase de diploteno en donde los pares homólogos se separan originándose dos células hijas con el número haploide de

cromosomas y cada cromosoma con dos cromátidas (divalente). En esta etapa las células germinales se denominan espermatocitos secundarios [Sharma, Rakesh y Agarwal, 2013].

- 4) *Espermatocitos secundarios*: Son células más pequeñas (1n cromosomas), redondeadas de núcleo con eucromatina escasa y mayor cantidad de heterocromatina. Éstas permanecen poco tiempo en interfase, rápidamente entran en la segunda fase de la división meiótica, por lo tanto, no es fácil observarlas en las preparaciones histológicas; se dividen para originar a las espermátidas [Ramm, 2014].
- 5) *Espermátidas*: Son células más pequeñas que las anteriores, haploides (1n cromosomas), monovalentes (una sola cromátida). Presentan núcleo picnótico, de cromatina densa. El citoplasma es acidófilo. Se localizan en la porción más superficial del epitelio seminífero (Figura 5). La mayoría de las espermátidas se observan en contacto estrecho con las células sustentaculares o de Sertoli. Al relacionarse con ellas, las espermátidas experimentan cambios morfológicos muy evidentes para transformarse en los espermatozoides [Ramm, 2014]. Todo este proceso de divisiones celulares y de transformación morfológica que experimentan las células del epitelio seminífero, desde la etapa de espermatogonias hasta los espermatozoides se denomina espermatogénesis [César, 2015].

Espermatogénesis

La espermatogénesis es la transformación de células primigenias del epitelio seminífero, las espermatogonias (células diploides) que, por mitosis, originan a los espermatocitos primarios (células diploides) y éstos, por meiosis se convierten en espermatocitos secundarios (células haploides) para que, en la segunda fase de la meiosis, originen a las espermátidas (células haploides), las cuales por transformación morfológica (espermiogénesis), originarán a los espermatozoides (células haploides y flageladas) [César, 2015].

El ciclo del epitelio seminífero consiste en una serie de cambios en cada sección determinada de los túbulos que producen las asociaciones celulares. El tiempo para que tenga lugar toda la

sucesión de cambios, representa la duración del ciclo del epitelio seminífero [Hermo L, 2010]. Mediante diversos estudios histológicos se ha establecido específicamente que la duración del ciclo del epitelio seminífero en la rata, oscila entre los 12.5 - 13 días [González, 2006].

Una espermatogonia necesita aproximadamente cinco ciclos, o sea, 65 días, para completar su diferenciación y ser liberada en forma de espermatozoide. Al realizar varias secciones transversales en los testículos de la rata, se observan 14 imágenes características de los túbulos seminíferos de la rata (Figura 6) [Hermo L, 2010]. La espermatogénesis se encuentra finamente regulada por el eje HPG. Por lo que cualquier cambio en este, repercute en la espermatogénesis.

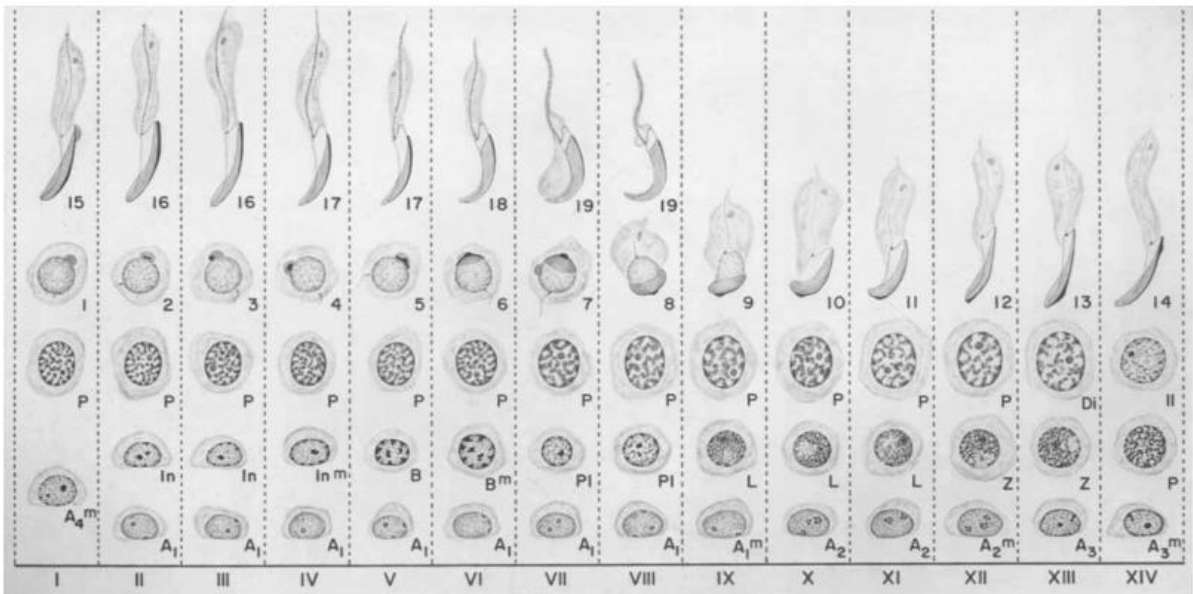


Figura 6. Esquema de los 14 estadios del ciclo del epitelio seminífero de los testículos de la rata macho adulta. Cada columna numerada con un número romano muestra los tipos de células presentes en una de las asociaciones celulares que se encuentran en las secciones transversales de los túbulos seminíferos. Después de la agrupación celular XIV, reaparece la asociación celular I, de modo que la secuenciación comienza de nuevo. Las etapas del ciclo se identificaron mediante 14 de los 19 pasos de la espermiogénesis (números 1-19). Estos pasos se definieron por los cambios observados en el núcleo y en la estructura acrosómica (acrosoma y cabeza aplicada a la superficie del núcleo) en cortes teñidos con la técnica de PAS-hematoxilina. Letras: *A₁*, *A₂*, *A₃* y *A₄* representan las cuatro generaciones de espermatogonias de tipo A; *In*, espermatogonias intermedias; *B*, espermatogonias de tipo B; el superíndice *m* junto a una espermatogonia indica la aparición de mitosis; *PI*, espermatoцитo en preleptoteno; *L*, espermatoцитo en leptoteno; *Z*, espermatoцитo en cigoteno; *P*, espermatoцитo en paquiteno; *Di*, espermatoцитos primarios en diacinesis; *II*, espermatoцитo secundario. Tomado y modificado de Dym and Clermont, 1970.

Regulación Endocrina

La endocrinología de la espermatogénesis está regulada por la actividad neuroendocrina del eje hipotalámico-pituitario-testicular (Figura 7). En el roedor, esto se manifiesta inmediatamente después del nacimiento, lo que resulta en:

- 1) Diferenciación espermatogonadal,
- 2) Finalización de la primera ola de espermatogénesis y
- 3) Pubertad en la edad adulta al tercer mes de vida [Sharpe RM, 1994].

La señal central del hipotálamo hacia la hipófisis es la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que se secreta de manera pulsátil y de forma compleja. Actúa a través del receptor transmembrana de GnRH, generando 2 principales señales endocrinas a los testículos, que se originan durante la interacción hormona-receptor a nivel adenohipofisiario, permitiendo la liberación de las hormonas de glicoproteína heterodiméricas: FSH y LH. Las gonadotropinas se secretan de forma pulsátil en respuesta a la GnRH. Relativamente, y en general, la liberación pulsátil de LH es robusta y similar a la de GnRH, mientras que, la liberación pulsátil de FSH es lenta [Abel MH, 2013].

A nivel testicular, las dos gonadotropinas, FSH y LH, median sus acciones a través de receptores transmembrana específicos, rFSH y rLH, respectivamente. Predominantemente, rFSH se expresa en las células de Sertoli dentro de los túbulos seminíferos, mientras que rLH se expresa en las células intersticiales de Leydig. Tanto la FSH (directamente) como la LH (indirectamente a través del receptor de testosterona-andrógeno (rA) ejercen sus acciones sobre la espermatogénesis principalmente a través de la regulación de los factores celulares de Sertoli [Abel MH, 2013].

En respuesta a las gonadotropinas, se producen 2 señales endocrinas principales desde los testículos. Estas son la hormona esteroidea testosterona, producida por las células de Leydig en respuesta a la señalización de LH y secretada también de forma pulsátil, y la inhibina de la hormona no esteroidea, producida por las células de Sertoli en respuesta a la señalización de FSH y secretada de forma no pulsátil. Juntas, estas hormonas gonadales son las principales

señales de retroalimentación que mantienen el funcionamiento fisiológico del eje hipotalámico-pituitario [Ramaswamy S, 2015].

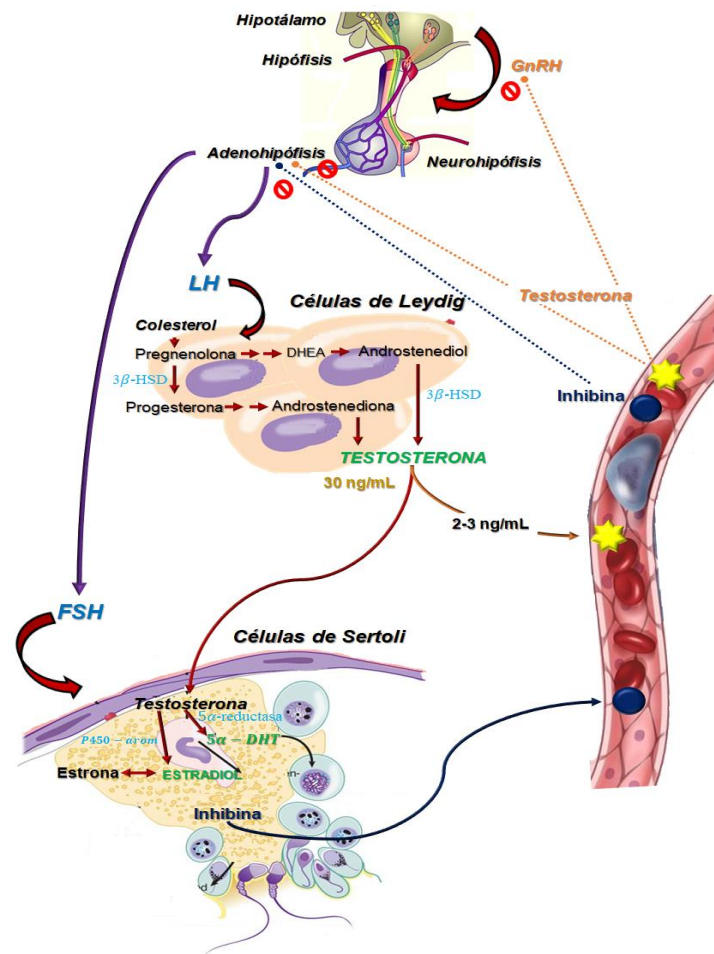


Figura 7. Regulación endocrina del eje hipotálamo-Hipófisis-Testículo.

La complejidad anterior de las interacciones a lo largo del eje hipotalámico-pituitario-testicular sirve como un recordatorio de que los procesos de iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis normal son propensos a alteraciones, debido a efectos tóxicos, no solo

directamente a nivel de los testículos sino a una multitud de otros puntos indirectos a lo largo del eje hipotalámico-pituitario-testicular.

Estrógenos en la regulación espermatogénica

El papel de los estrógenos en la función reproductiva masculina ha sido objeto de discusión en los últimos años. Ahora se acepta que estas hormonas sexuales también desempeñan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la función reproductiva y por consiguiente en la fertilidad masculina [Carreau S, 2008].

En lo que respecta a la biosíntesis hormonal, se considera al ciclopentanoperhidrofenantreno (colesterol) como el precursor de la biosíntesis de todas las hormonas esteroides. En la biosíntesis participan la aromatasa y una serie de enzimas, tal como las hidroxisteroide deshidrogenasas (3β -OH-SDH y 17-OH-SDH). La 3β -OH-SDH convierte la deshidroepiandrosterona en androstenediona, mientras que la 17-OH-SDH convierte la androstenediona a Testosterona. La aromatasa cataliza el paso final en la biosíntesis de los estrógenos, a partir de los andrógenos. De tal forma que la testosterona se transforma en estradiol, la androstendiona en estrona y la 16α -hidroxiandrostenediona en estriol. El estradiol secretado se oxida de forma reversible hasta generar estrona mediante la 17-OH-SDH y esos dos estrógenos pueden convertirse en estriol, mediante la 16α -Hidroxilasa (Figura 8) [Shaha Ch, 2008].

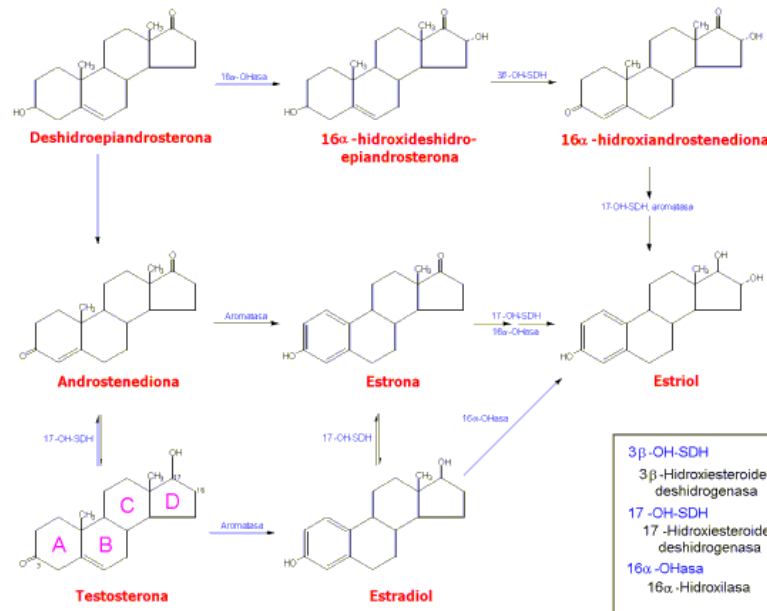


Figura 8. Ruta de síntesis esteroidea.

La biosíntesis de los estrógenos en los testículos es catalizada por una enzima microsomal de la superfamilia citocromo P450, llamada citocromo aromatasa P450 (P450arom), que en la rata es codificada por una copia del gene, *cyp19* [Omura T, 1995]. La aromatasa es una enzima terminal, responsable de transformar irreversiblemente andrógenos en estrógenos [Shaha Ch, 2008].

El papel de los estrógenos sobre el tejido testicular se ha comprendido mediante mutaciones específicas sobre los receptores estrogénicos (rE), en donde se han observado alteraciones en el proceso espermatogénico y sobre la capacidad de fertilización espermática [O'Donnell L, 2001]. Con base en esos estudios se han vinculado algunas funciones de los estrógenos sobre dicho tejido:

- Prevenir el desarrollo de células de Leydig, modular las vías de señalización apoptótica en células de Sertoli de rata al estimular la espermatogénesis e inhibiendo la apoptosis en las células espermatogénicas post-meióticas [De Gendt K, 2004].

- Tienen una participación en la maduración de los gametos masculinos, en particular la espermiogénesis, y los pasos finales de la maduración de los espermatozoides, incluida la capacitación y / o la reacción del acrosoma [Carreau S, 2011].

Rata macho como modelo de estudio endocrino

Los roedores, especialmente ratas y ratones, han sido modelos animales muy útiles para estudiar el proceso de desarrollo. Además de su corta vida útil, alta fecundidad y relativa facilidad de mantenimiento en un laboratorio, la mayoría de los mecanismos hormonales, celulares y moleculares de la maduración reproductiva identificados hasta ahora en roedores, son similares a los encontrados en mamíferos superiores [Kah O, 2007].

Sin embargo, a diferencia de los humanos, la pubertad en el roedor tiene un período prepuberal muy corto (alrededor de 6 semanas frente a 10 años). Debido a su vida útil limitada y a que no muestran la llamada "pausa juvenil" en la secreción de gonadotropinas y la actividad gonadal que es característica de los primates, los resultados deben interpretarse cuidadosamente [Ramaswamy S, 2013].

Fisiología reproductiva de la rata macho

La producción de espermatozoides móviles en los machos ocurre entre los 40 y 55 días de edad tanto en ratas como en ratones [Glass AR, 1986]. El descenso de los testículos ocurre después de los 15 días de edad en ambas especies, [Frey HL, 1983] y la maduración sexual se puede seguir al monitorear el crecimiento de los testículos [Smith ER, 1977] y la separación prepucial. Sin embargo, aunque la separación del prepucio del glande pene como resultado de la cornificación del epitelio balanoprepucial ocurre entre 2 y 8 días antes de la aparición de espermatozoides móviles en el epidídimo en ratas (alrededor de los 45 días de edad), [Korenbrott CC, 1977] ocurre alrededor del destete en ratones (alrededor de los 21 días de edad), y, por lo tanto, solo marca una fase temprana de maduración sexual en esta especie [McGee SR, 2013].

a) Maduración postnatal

Durante el desarrollo postnatal, las neuronas GnRH se someten a una secuencia de eventos de maduración complejos que afectan su capacidad biosintética, su patrón neurosecretor

y morfología, que en última instancia conducen a la maduración sexual y el inicio de la pubertad. Esta serie de eventos pueden estar vinculados, al menos en parte, a la integración de las neuronas GnRH postmigratorias en la red neuronal responsable de la transmisión de información corporal a estas neuronas centrales, se ha dividido en varias fases tanto en hombres como en mujeres según la morfología y parámetros fisiológicos [Ojeda SR,1980].

El desarrollo sexual postnatal se puede dividir en cuatro etapas: un período neonatal que comprende la primera semana de vida extrauterina (donde el día del nacimiento se designa el día 0 o P postnatal), un período infantil que se extiende desde P8 a P21 (edad al destete), un período juvenil que termina alrededor de P35 (en ratas) y un período peripuberal que termina a los 55 a 60 días de edad con la aparición de espermatozoides maduros en la *vas deferens* (Figura 9). [Ojeda SR, 1980].

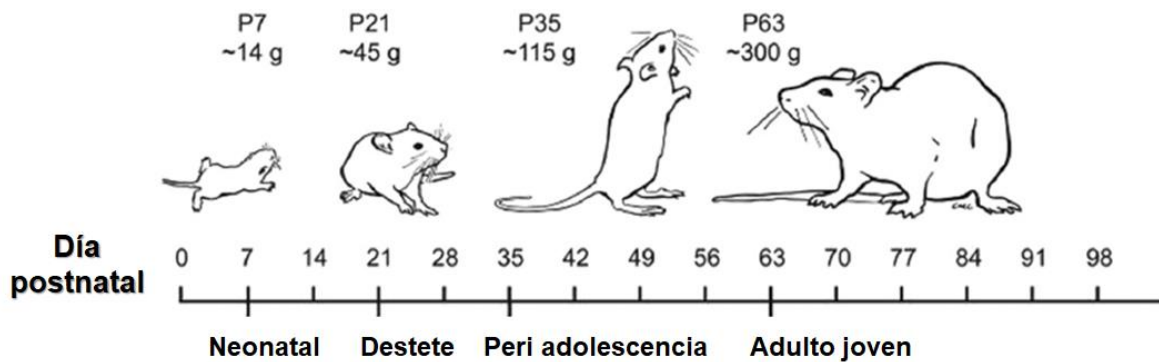


Figura 9. Etapas de crecimiento fisiológico de ratas macho. Tomado y modificado de Sengupta P, 2013.

b) Pubertad y desarrollo

El inicio de la pubertad y la regulación de la fertilidad se rigen por una compleja red neuronal, principalmente en el hipotálamo se encuentran las neuronas productoras de GnRH, las cuales se consideran los reguladores maestros de la secreción de gonadotropinas, el crecimiento y la función postnatal gonadal. El desarrollo adecuado de las neuronas de GnRH, la expresión de GnRH y la señalización de GnRH es esencial para la maduración sexual y el funcionamiento normal del eje HPG en mamíferos [Roux N, 1997].

Aunque los datos sobre los cambios putativos en los niveles de LH durante el período infantil en ratas son escasos e inconsistentes, está claro que los niveles de FSH circulantes aumentan

dramáticamente después de la segunda semana de vida y alcanzan un máximo entre 30 - 40 días de edad. Posteriormente, disminuyen cuando las concentraciones séricas de testosterona alcanzan niveles similares a los observados en adultos tanto en ratas como en ratones. Respecto al patrón de liberación de GnRH, los estudios *in vitro* en ratas han demostrado que la frecuencia de los pulsos de GnRH aumenta gradualmente durante el período juvenil (0,1 pulso / h) para alcanzar valores peripúberes (0,3 pulsos de GnRH / h) [Vida B, 2010; Breen KM, 2004].

Durante la pubertad se observa la presencia de espermatozoides móviles en el epidídimo y capacidad de reproducción sexual. Los espermatozoides en la epidermis de la cauda y el conducto deferente se observan por primera vez alrededor de los 40 y 55 días de edad en ratones y ratas, respectivamente [Watanobe H, 2003]. Sin embargo, los primeros espermatozoides que aparecen son pocos en número y exhiben poca motilidad y morfología aberrante, pero estas características se normalizan con la edad. Todos estos eventos ocurren concomitantemente con un aumento pronunciado en los niveles de testosterona, cuyo patrón de secreción ha demostrado estar altamente correlacionado con los pulsos de secreción de LH (Figura 10) [Li C, 1998].

Cabe mencionar que, en ratones y ratas, se requieren de 40 a 54 días para completar el inicio de la espermatogénesis, un período de tiempo que corresponde exactamente a la edad en la pubertad en estas especies [Lee SJ, 2013]. Mientras que, en los seres humanos, se requieren aproximadamente 64 días para que la espermatogonía no diferenciada se diferencie a espermatozoide, y este proceso no se inicia hasta que se alcanza la pubertad después de los 10 años.

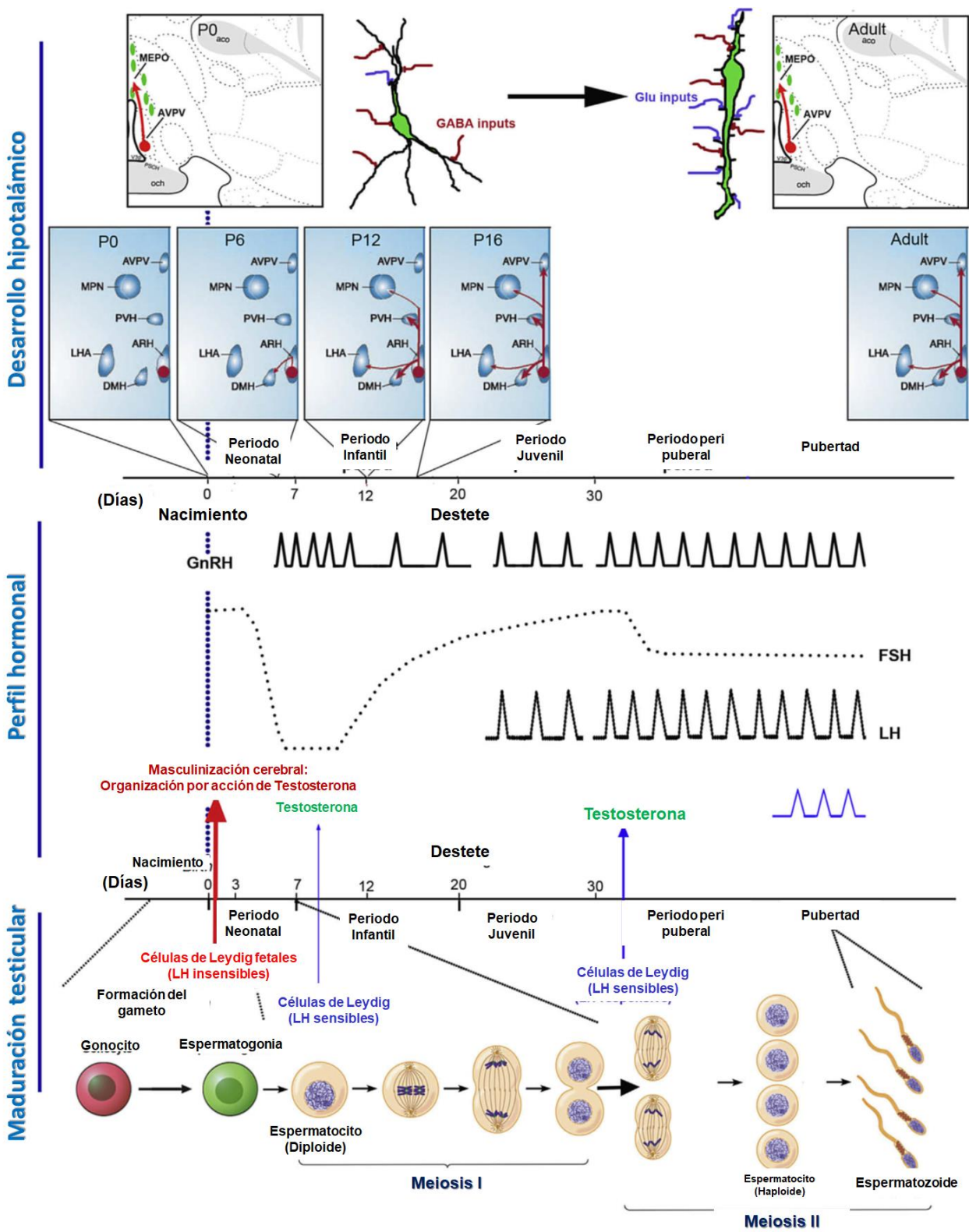


Figura 10. Maduración postnatal del eje HPG masculino. Tomado y modificado de Tony M, 2015.

2. Planteamiento del Problema

De acuerdo con los resultados mostrados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016 (ENSANUT), el 33.5% de la población adolescente (entre 12 y 19 años) del sexo masculino en México, presenta cuadros combinados de sobrepeso y obesidad; el 18.5 % con sobrepeso y el 15.0 % obesidad. Mientras que, en la población adulta (mayor a 20 años), el 69.4% de los hombres presenta un índice de masa corporal (IMC) mayor que 25 Kg/m². Ambas poblaciones presentan un incremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en comparación con los resultados obtenidos en ENSANUT 2012, los cuales condicionan al desarrollo de SMet y enfermedades crónicas degenerativas. Por lo que se consideran un problema de salud pública de forma pandémica.

La evidencia reciente sugiere que existe una asociación directa entre los diferentes componentes del SMet y la producción-función espermática. El factor masculino contribuye entre el 20 y 50% de las causas de infertilidad entre las parejas.

Aunque cada enfermedad que forma parte de la definición de SMet tiene efectos sobre la fertilidad masculina por separado, cuando se combinan, estos elementos metabólicos pueden tener efectos aditivos sobre la fertilidad. Debido a la falta de conocimiento en este campo, así como, los aumentos en la prevalencia de trastornos metabólicos, es necesario el desarrollo de nuevas investigaciones que permitan determinar con precisión esta asociación.

Por lo que se plantea la siguiente pregunta científica:

¿El síndrome metabólico altera la regulación endocrino-testicular en ratas Wistar de edad reproductiva temprana y tardía?

3. Justificación

Las alteraciones bioquímicas, metabólicas, neurohormonales, fisiológicas y clínicas de comportamiento sistémico que presenta el SMet afectan diversos aspectos de la fisiología humana. La infertilidad masculina es una condición que puede verse influenciada por el estado metabólico del individuo. Los estudios que exploran los efectos del SMet en la fertilidad masculina son recientes. Por lo que se desconoce cuál es el mecanismo fisiopatológico y el de adaptación que se presentan en el aparato reproductor antes de presentarse las manifestaciones clínicas que comprometen la fertilidad masculina, así como los procesos de proliferación, diferenciación y maduración espermática.

Se propone que el consumo de dietas hipercalóricas durante tiempos prolongados modifica la conducta hormonal involucrada en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo, modificando así la funcionalidad y dinámica de los tejidos involucrados en la reproducción masculina. Por lo que el presente trabajo pretende generar evidencia de como un consumo alto en carbohidratos ejerce un efecto como disruptor endocrino en sujetos de edad reproductiva temprana y tardía, tanto en niveles hormonales del eje gonadal, como en los procesos espermatogénicos.

4. Objetivos

Objetivo General

Conocer el efecto del síndrome metabólico sobre los niveles hormonales del eje HPG y la espermatogénesis testicular en ratas Wistar en edades reproductivas temprana y tardía.

Objetivos Específicos

En un modelo murino en edad reproductiva temprana y tardía:

- 1) Valorar el efecto del SMet sobre el eje hormonal hipófisis-testículo.
- 2) Evaluar la expresión de receptores hormonales relacionados con el eje hormonal hipófisis-testículo en las células testiculares.
- 3) Evaluar el impacto del SMet sobre la biosíntesis esteroidea testicular.
- 4) Examinar el impacto del SMet sobre la estructura de los túbulos seminíferos.

5. Hipótesis

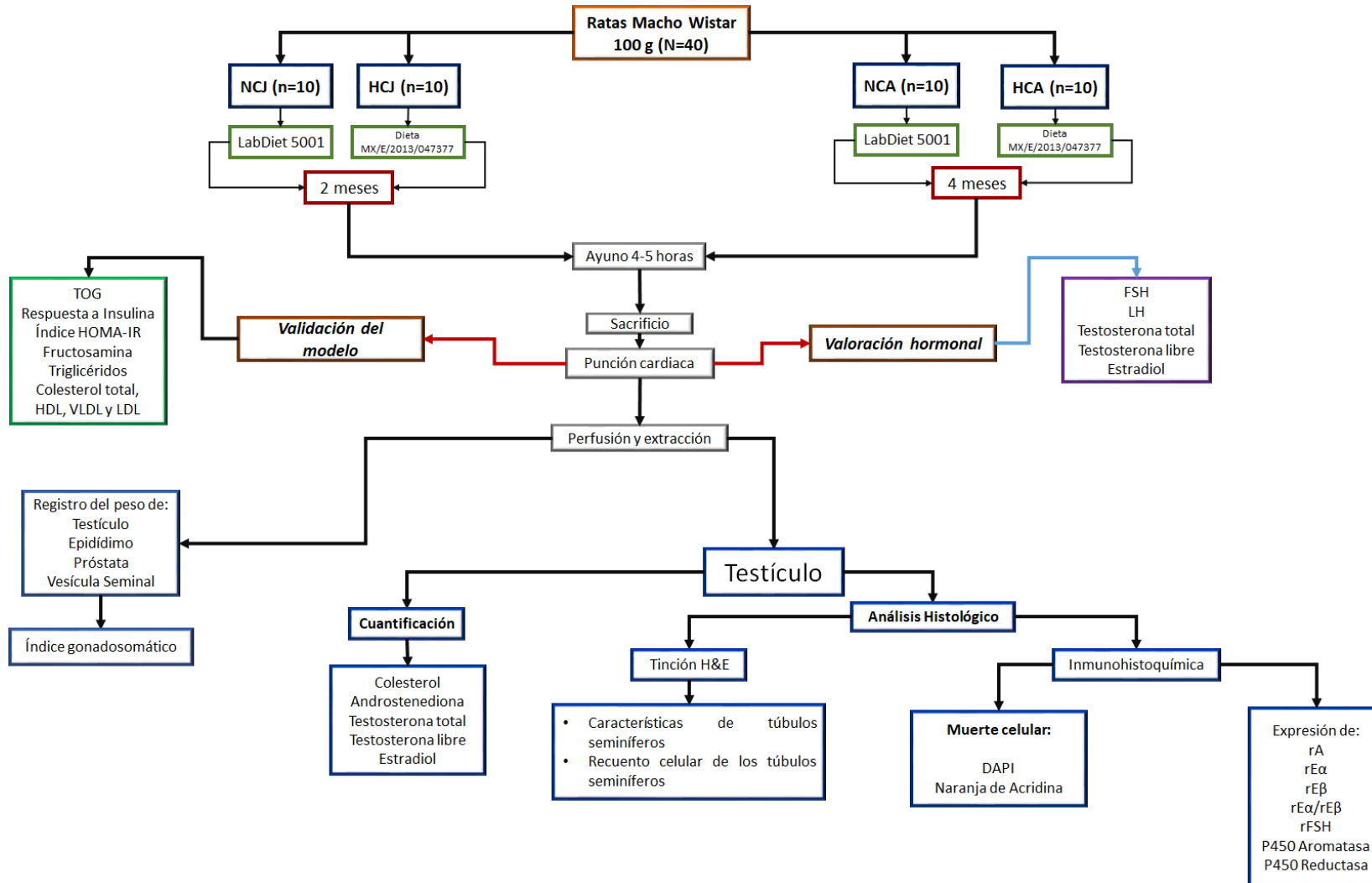
Hipótesis Nula

El síndrome metabólico no altera el estado endócrino-testicular en ratas Wistar de edad reproductiva temprana y tardía.

Hipótesis Alternativa

El síndrome metabólico altera el estado endócrino-testicular en ratas Wistar de edad reproductiva temprana y tardía.

6. Diagrama de trabajo



7. Metodología

7.1 Animales

Se utilizaron 40 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 70 a 80 g y con edad próxima entre tres y cuatro semanas de edad provenientes del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de acondicionamiento con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, temperatura de 19-26 °C, separadas de ratas hembra y en un espacio común con un número no mayor a 4 animales con disponibilidad de alimento y agua "*Ad libitum*". Fueron pesados cada tercer día hasta llegar al peso de 100 gramos, equivalente a 15 días de acondicionamiento. Posteriormente se realizó la conformación de los grupos.

Todos los procedimientos realizados siguieron las normas de acuerdo con la “Guía para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio” de México y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales.

7.2 Conformación de grupos

Los sujetos de investigación se dividieron aleatoriamente en 4 grupos, que se presentan a continuación:

- a) Normocalórico joven (n= 10)
- b) Hipercalórico joven (n= 10)
- c) Normocalórico adulto (n=10)
- d) Hipercalórico adulto (n= 10)

Tanto el grupo Normocalórico joven como el adulto fueron mantenidos bajo una dieta base pellet balanceada (LabDiet 5001). Mientras que los grupos Hipercalórico joven y adulto, fueron alimentados con una dieta base pellet balanceada (LabDiet 5001) hasta tener un peso corporal de 100 g, posteriormente, fueron alimentados con una dieta Hipercalórica Hiperglúcida (MX/E/2013/047377) para iniciar con la inducción del SMet. Estas condiciones se mantuvieron durante dos y cuatro meses para generar los grupos Joven y Adulto, respectivamente.

7.3 Análisis zoométrico

El análisis zoométrico consistió en la medición del peso, talla y perímetro abdominal de los animales de cada uno de los grupos, así como la determinación del índice de masa corporal (IMC) y el porcentaje de grasa corporal mediante el índice de Lee.

Las medidas de cada uno de los sujetos de experimentación fueron monitoreadas semanalmente. Para determinar el peso corporal se empleó una balanza digital tarada con una caja de policarbonato y serrín. Mientras que la talla se obtuvo al medir desde la base de la cola hasta la punta de la nariz con ayuda de un flexómetro. El perímetro abdominal fue medido con ayuda de una cinta métrica flexible. En lo que respecta al IMC, se calculó utilizando la fórmula:

$$IMC = \frac{\text{Peso (Kg)}}{\text{Talla}^2 \text{ (m)}}$$

Por último, el porcentaje de grasa fue determinado empleando el índice Lee [Rogers P, and Webb G.P, 1980]:

$$\% \text{ Grasa corporal} = \frac{\text{Peso}^{0.33} \text{ (g)}}{\text{Talla (mm)}} \times 100$$

7.4 Obtención de muestras

7.4.1 Muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas para la cuantificación de glucosa e insulina fueron obtenidas mediante punción cardíaca 3 días antes de concluir el tiempo de cohorte de cada uno de los grupos. Para ello, los animales estuvieron en condiciones de ayuno en un lapso de entre cuatro y cinco horas, posteriormente, recibieron una carga oral de glucosa equivalente a 1.75 g de glucosa/kg de peso. Después, fueron anestesiados con la administración intraperitoneal de Ketamina + Xilazina en una dosis de 0.2 mL/100 g bajo anestesia, se realizó la punción cardíaca, extrayendo 200 µL de sangre a los 0, 30, 60 y 90 minutos posterior a la carga oral de glucosa. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 10 minutos, el suero fue separado del paquete celular y almacenado a -70 °C hasta su análisis. Los animales se dejaron recuperar por dos días y después se realizó el sacrificio de acuerdo con los tiempos de cohorte establecidos para cada uno de los grupos.

7.4.2 Sacrificio

Previamente al sacrificio los animales de cada uno de los grupos y de acuerdo con el tiempo de cohorte, se mantuvieron en ayuno por un lapso de cuatro a cinco horas para realizar los sacrificios entre las 7:00 – 9:00 am. El sacrificio de los animales se realizó mediante una cámara de CO₂. Minutos después de la exposición al gas fueron retirados de la cámara y se aseguró la muerte del animal.

Posteriormente a la eutanasia se realizó la punción cardiaca, obteniendo 5 mL de sangre, los cuales fueron recolectados en tubos BD Vacutainer para suero con gel separador. Posteriormente fueron centrifugados a 3,500 rpm durante 10 minutos. El suero fue separado y almacenado a -70 °C hasta su análisis. Inmediatamente de finalizada la punción cardiaca, se realizó la perfusión tisular a través del corazón con solución salina isotónica. Enseguida de la perfusión tisular se realizó la extracción de las gónadas de cada uno de los animales. Los tejidos fueron pesados en una balanza analítica en una caja de Petri de plástico. El testículo derecho se almacenó en un ultra congelador a -70 °C hasta su análisis, mientras que el testículo izquierdo se almacenó a 4 °C en una solución de formalina bufferada al 4% para los posteriores pasos de deshidratación e inclusión para los análisis histológicos.

7.5 Ensayos

7.5.1 Ensayos séricos

La cuantificación de glucosa, colesterol total, triglicéridos y fructosamina se realizó espectrofotométricamente de forma automatizada en el equipo A-15 de BioSystems con reactivos de la marca Spinreact. Mientras que la determinación de las fracciones de las lipoproteínas de alta y baja densidad (HDL y LDL) se analizaron con el equipo BTS-350, con reactivos de la marca Spinreact y BioSystems, respectivamente. La concentración del colesterol en la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) fue obtenida por la siguiente ecuación [Warnick, 1990]:

$$VLDL = \text{Colesterol Total} - [HDL + LDL]$$

La concentración de ácidos grasos libres se determinó siguiendo el método descrito por Brunk y Swanson en 1981, utilizando un espectrofotómetro UV/Vis Jenway 6405 a una longitud de onda de 620 nm.

Con respecto a la valoración hormonal: Hormona Luteinizante (LH) [IIDE-2003], Hormona Folículo Estimulante (FSH) [IIDE-2004], Estradiol (E2) [IIDE-2101] y Testosterona Total (T) [IIDE-2103], se realizó la cuantificación con el uso de kits comerciales de la marca Diagnóstica Internacional; mientras que la cuantificación de Testosterona Libre (TL) [AA E-1800] se realizó con el kit comercial de Inmunoensayos hechos en Alemania (LDN). Las distintas hormonas se analizaron mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de manera automatizada con un equipo StatFax 4700.

7.6 Modelos matemáticos de resistencia a insulina

7.6.1 Resistencia a insulina periférica

El acrónimo HOMA-IR representa las siglas en inglés del modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina ("homeostatic model assessment"). El modelo matemático usado es específico para roedores y ha sido previamente validado [Cacho, 2008]. Se obtiene:

$$HOMA\ IR = \frac{Glucosa\ basal \left[\frac{mg}{dL} \right] \times Insulina \left[\frac{\mu U}{mL} \right]}{2430}$$

7.7 Ensayos tisulares

La valoración tisular de: Estradiol (E2) [IIDE-2101] y Testosterona Total (T) [IIDE-2103], se realizó con el uso de kits comerciales de la marca Diagnostica Internacional; mientras que la cuantificación de Testosterona Libre (TL) [AA E-1800] se realizó con el kit comercial de LDN y la Androstenediona [1038-17] se cuantifico con el kit comercial de International Immuno diagnostics. Las distintas hormonas se analizaron con un equipo automatizado StatFax 4700. En el caso de la determinación de colesterol se realizó de manera automatizada con el equipo A-15 de BioSystems con reactivos de la marca Spinreact.

Para realizar las determinaciones mencionadas se preparó un homogenizado a partir de 100 mg de tejido de la parte central del testículo. Una vez obtenidos los 100 mg de tejido se realizó el homogenizado en 500 μ L de PBS 1X. Posteriormente fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C en una microcentrifuga. Se recolectó el sobrenadante y fue almacenado a -70 °C hasta su análisis.

7.8 Análisis morfométrico testicular

7.8.1 Índice gonadosomático

El índice gonadosomático (GSI) se determinó considerando el peso corporal total en relación con el peso de los testículos:

$$GSI = \frac{\text{Peso del testículo (g)}}{\text{Peso corporal total (g)}}$$

7.9 Análisis histológico

Los testículos almacenados a 4 °C en la solución de formalina bufferada al 4% se cortaron de forma sagital, posteriormente fueron sometidos al procedimiento de deshidratación estándar, y posterior inclusión en parafina (**Anexo 15**). Los bloques obtenidos fueron cortados en un micrótopo Leica RM2125, obteniéndose cortes con un grosor de 5 µm, que se colocaron en portaobjetos previamente embebidos con poli-L-lisina al 0.1%. Los cortes fueron resguardados hasta su uso.

Las laminillas obtenidas de cada uno de los grupos experimentales fueron utilizadas para realizar la tinción de hematoxilina y eosina, naranja de acridina e inmunofluorescencia.

7.9.1 Hematoxilina-Eosina

Las laminillas con los tejidos de cada grupo experimental fueron desparafinadas, teñidas y rehidratadas por procedimiento estándar (**Ver anexo 15**). Las laminillas se sumergieron en una solución de hematoxilina de Harris durante 15 minutos, la oxidación (viraje) se llevó a cabo con una solución de carbonato de litio al 0.1% y el contraste se realizó con eosina amarillenta durante 10 segundos. Las fotomicrografías de las estructuras testiculares fueron tomadas en un microscopio Optisum de campo claro con el objetivo de 20X. Se tomaron y analizaron 100 estructuras tubulares por cada grupo experimental.

7.9.1.1 Componentes del tejido testicular

El área de los componentes del tejido testicular se determinó midiendo el área ocupada por los túbulos seminíferos utilizando el software ImageJ Pro Plus asociado a un microscopio de campo claro a 200 aumentos.

La estimación de los diferentes tipos de células que componen el epitelio seminífero en las etapas I-VIII del ciclo, clasificadas de acuerdo con el método de la morfología tubular, se realizó en función del recuento de núcleos de las células germinativas. Se contaron los núcleos de los siguientes tipos celulares: espermatogonía tipo A; espermatocitos I en la fase preleptoteno / leptoteno; espermatocitos II en la fase paquiteno y células de Sertoli.

7.9.1.2 Recuento celular

Con la excepción de las células de Sertoli, los recuentos obtenidos tuvieron sus valores corregidos teniendo en cuenta el diámetro nuclear promedio (DN) y el grosor de los fragmentos histológicos de acuerdo con la fórmula propuesta por Amann en 1962:

$$No. \text{ corregido} = \frac{\text{Recuento obtenido} \times \text{Grosor del corte}}{\text{Grosor del corte}} + \sqrt{\left(\frac{DN}{2}\right)^2 - \left(\frac{DN}{4}\right)^2}$$

La determinación del número de células de Sertoli por testículo se realizó en función del número corregido del nucléolo de células de Sertoli por sección transversal del túbulo seminífero en la etapa I y en la longitud total de los túbulos seminíferos por testículo, y siguiendo la fórmula: propuesta por [Hochereau-de Reviere y Lincoln, 1978]:

$$No. \text{ Células} = \text{Longitud total de los tubulos } (\mu\text{m}) \times \frac{\text{No. corregido}}{\text{ancho de sección } (\mu\text{m})}$$

7.9.2 Naranja de acridina y DAPI

Los tejidos correspondientes para la prueba de naranja de acridina (NA) y DAPI fueron deshidratados con el protocolo descrito anteriormente. En el caso de la prueba de NA, después de la deshidratación se agregó a cada tejido 50 μL de solución de NA en un buffer de TRIS-cloruro de potasio-magnesio (TKM) durante 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS 1X y se realizó el montaje con Vectashield. Con respecto al marcaje con DAPI se llevó a cabo el mismo proceso de deshidratación, luego se agregaron 15 μL de Vectashield-DAPI, se realizó el montaje y sellado, todo esto en condiciones de oscuridad. Se analizaron 30 estructuras tubulares por grupo experimental utilizando los filtros verde y rojo de microscopio de fluorescencia y con un aumento de 20X. Posteriormente se realizó el análisis densitométrico de las

fotomicrografías obtenidas del filtro rojo. Y en el caso de DAPI, se analizaron 30 estructuras tubulares con el filtro azul del microscopio de fluorescencia con un aumento de 100X.

7.9.3 Inmunofluorescencia

Se utilizó la técnica de inmunofluorescencia con la finalidad de evidenciar la expresión de: citocromo P450 aromatasas (Anti-ARO) [Abcam AB18995]; citocromo P450 reductasa (anti-POR) [Sigma Aldrich HPA010136]; receptor de la hormona Folículo Estimulante (anti-rFSH) [Sigma Aldrich F3929]; receptor de estrógenos tipo alfa (anti-rE α) [sc-8005]; receptor de estrógenos tipo beta (anti-rE β) [sc-390243] y receptor de andrógenos (anti-rA) [Sigma Aldrich A9853]. Empleando inmunifluorescencia de doble marca, utilizando anticuerpos secundarios conjugados con Rodamina y FITC.

Las fotografías se tomaron con un microscopio OLYMPUS BX41 con filtro de excitación vertical con el objetivo 10X y empleando el software Image-Pro-Premier 9.2, manteniendo las mismas condiciones de exposición en los distintos grupos experimentales. Se analizaron 45 estructuras tubulares de cada grupo experimental utilizando el programa ImageJ, mediante la transformación a escala de grises y el posterior análisis de píxeles en cada uno de los túbulos seminíferos de interés. Para ello se construyeron curvas de calibración de píxeles para cada una de las marcas de interés. Los resultados se expresaron como unidades de densidad óptica por área tubular.

7.10 Análisis estadístico

Los resultados de las variables cuantitativas fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico fue realizado con ayuda del programa Origin versión 5.0, con el cual se realizó una comparación entre grupos problema y grupos control en las edades reproductivas analizadas utilizando la prueba de inferencia t-Student. Considerando un nivel de significancia del 95 % ($P < 0.05$) y una docima bilateral. Para el caso de los análisis histológicos se realizó la comparación entre grupos usando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Considerando un nivel de significancia del 95 % ($P < 0.05$) y una docima bilateral.

8. Resultados

Efecto del consumo de una dieta hipercalórica-hiperglúcida sobre los parámetros zoométricos

A cada uno de los animales de los grupos experimentales se les realizó el análisis zoométrico, el cual consistió en determinar el peso corporal, la talla y perímetro abdominal, para posteriormente calcular el IMC y el valor del índice Lee. De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 2; en el grupo Hipercalórico Joven (HCJ) se observó un decremento del 27.1% y 16.8% en los valores del peso corporal e IMC, respectivamente, con respecto a su control normocalórico (NCJ). Con respecto a los grupos en edad reproductiva tardía, también se encontró una disminución significativa en ambos parámetros 11.3% y 22.4%, respecto al grupo NCA. El índice Lee, no mostró diferencias en ninguno de los grupos experimentales.

Valoración metabólica en los grupos experimentales

Después del consumo de la dieta hipercalórica-hiperglúcida durante los tiempos establecidos para cada uno de los grupos experimentales, se analizó la tolerancia a la glucosa y su respuesta insulínica, así como el desarrollo de resistencia a insulina (índice HOMA) y la glicación proteica (fructosamina), resultados presentados en la tabla 2.

En la sección de prueba oral de tolerancia a la glucosa y curva de insulina en la tabla 2 se muestra el comportamiento de glucosa, así como la respuesta de la insulina a un estímulo de carga de glucosa oral durante los tiempos 0, 30, 60 y 90 minutos. En el grupo HCJ, se observó un incremento en la concentración basal de glucosa del 21.9%, equivalente a una concentración de 120.6 mg/dL, a 30 minutos post carga no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, a los minutos 60 y 90 post carga hubo un incremento de 16.6% y 42.2%, respectivamente, en comparación al grupo NCJ. En lo que respecta al comportamiento de la insulina, hubo un incremento significativo del 38%, 107.6%, 25.2% y del 37% a los 0, 30, 60 y 90 minutos post carga, respectivamente. De la misma manera, se observaron incrementos significativos del 87.4% en fructosamina y del 68.5% en el índice HOMA-IR, respecto al grupo NCJ.

Tabla 2. Análisis zoométrico y metabólico de los grupos experimentales

Grupo Experimental	Normocalórico Joven	Hipercaleórico Joven	Normocalórico Adulto	Hipercaleórico Adulto
Panel Zoométrico				
<i>Peso (g)</i>	337.7 ± 8.64	246.10 ± 8.93 ▼	357.90 ± 10.76	317.4 ± 12.74 ▼
<i>Índice de Masa Corporal (Kg/m²)</i>	7.82 ± 0.75	6.51 ± 0.77 ▼	9.29 ± 0.70	7.21 ± 0.59 ▼
<i>Índice de LEE</i>	32.85 ± 1.21	31.64 ± 1.92	35.46 ± 0.97	32.91 ± 0.95
Prueba oral de tolerancia a la glucosa (1.75 g / kg)				
<i>Glucosa Basal (mg/dL)</i>	99.0 ± 3.6	120.6 ± 2.1 ▲	72.9 ± 5.5	93.0 ± 2.3 ▲
<i>Glucosa 30 min (mg/dL)</i>	137.0 ± 7.2	131.6 ± 1.5	108.3 ± 1.5	114.0 ± 2.0 ▲
<i>Glucosa 60 min (mg/dL)</i>	122.6 ± 3.2	143.0 ± 3.5 ▲	92.7 ± 1.5	122.00 ± 2.0 ▲
<i>Glucosa 90 min (mg/dL)</i>	116.3 ± 5.5	165.3 ± 10.7 ▲	81.7 ± 2.1	194 ± 1.0 ▲
Curva de Insulina				
<i>Insulina Basal (μUI/dL)</i>	11.9 ± 2.3	16.5 ± 1.3 ▲	9.0 ± 1.1	18.0 ± 3.2 ▲
<i>Insulina 30 min (μUI/dL)</i>	13.63 ± 2.0	28.3 ± 2.2 ▲	21.2 ± 2.8	56.0 ± 3.1 ▲
<i>Insulina 60 min (μUI/dL)</i>	13.6 ± 1.7	17.07 ± 1.3 ▲	13.9 ± 1.4	32.3 ± 1.8 ▲
<i>Insulina 90 min (μUI/dL)</i>	9.6 ± 1.7	13.3 ± 1.1 ▲	11.5 ± 1.0	25.8 ± 2.2 ▲
Panel lipídico				
<i>Colesterol Total (mg/dL)</i>	126.6 ± 1.9	133 ± 1.2 ▲	126.8 ± 16.5	160.7 ± 15.0 ▲
<i>Col-HDL (mg/dL)</i>	66.1 ± 2.6	33.3 ± 1.4 ▼	40.1 ± 6.8	32.8 ± 2.7 ▼
<i>Col- LDL (mg/dL)</i>	41.8 ± 4.2	72.0 ± 5.2 ▲	78.3 ± 11.3	111.0 ± 12.4 ▲
<i>Col- VLDL (mg/dL)</i>	18.8 ± 1.9	28.2 ± 1.3 ▲	8.4 ± 1.5	16.7 ± 1.3 ▲
<i>Triglicéridos (mg/dL)</i>	93.6 ± 9.9	140.3 ± 6.3 ▲	42.3 ± 7.3	83.7 ± 6.4 ▲
<i>Ácidos Grasos Libres (mg/dL)</i>	3.6 ± 0.1	6.2 ± 0.1 ▲	3.1 ± 0.1	5.3 ± 1.0 ▲
<i>HOMA-IR</i>	0.486 ± 0.04	0.819 ± 0.03 ▲	1.17 ± 0.05	2.4 ± 0.3 ▲
<i>Fructosamina (μmol/L)</i>	145.68 ± 1.266	273 ± 1.238 ▲	174.4 ± 9.2	422.8 ± 17.0 ▲

Los resultados mostrados son el promedio de 10 sujetos experimentales ± el Error Estándar de la Media (EEM). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de inferencia *t-Student*. (▼/▲) Indica diferencia significativa a $p < 0.05$.

En los grupos experimentales en edad reproductiva tardía, se presentó un incremento significativo de la concentración de glucosa sérica y en la curva de tolerancia en el grupo hipercaleórico con respecto del normocalórico, correspondiendo a 27.6%, 5.3%, 31.6% y del 137.5%, en los tiempos 0, 30, 60 y 90 minutos, respectivamente. Un patrón similar se observó en los niveles de insulina sérica en estado basal y posterior a la carga oral de glucosa; en

donde hubo un incremento del 100% (0'), 164.2% (30'), 132.4% (60') y del 124.4% (90'). Los niveles de fructosamina mostraron un incremento del 142.4%, así como del índice HOMA-IR del 105.1%, siendo ambos estadísticamente significativos con respecto a su control (Tabla 2).

Además, se realizó la evaluación de un panel lipídico de los diferentes grupos experimentales, como se muestra en la tabla 2. Este consistió en la cuantificación de: colesterol total, colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL), de muy baja densidad (VLDL) y de ácidos grasos libres (AGL).

Después de dos meses, el grupo HCJ mostró incrementos significativos de la concentración de triglicéridos (49.9%), AGL (70.5%) y colesterol total (5.3%), así como en las fracciones de colesterol LDL (72.3%) y VLDL (50.0%). Mientras que la concentración de la fracción de colesterol HDL disminuyó en 49.6%, los cambios fueron estadísticamente significativos con respecto al grupo NCJ. Mientras que, en el grupo HCA, se observó un patrón similar en los niveles de los diferentes metabolitos evaluados en el grupo HCJ. Los animales presentaron incrementos en la concentración de triglicéridos (97.9%), AGL (73%), colesterol total (26.7%), colesterol (LDL 41.8%) y colesterol VLDL (97.9%). Mientras que en los niveles del colesterol HDL disminuyeron en 18.2%, cambios que fueron estadísticamente significativos respecto de su control.

Efecto de síndrome metabólico sobre las hormonas séricas involucradas en el eje Adenohipófisis -Testículo

Una vez demostrada la desregulación metabólica generada por el consumo de una dieta hipercalórica-hiperglúcida, se analizó la dinámica hormonal a nivel del eje hipófisis-gónada. Para ello, se cuantificó: hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), ambas hormonas secretadas por células gonodotróficas de la adenohipófisis; y las hormonas sintetizadas por testículo: testosterona total (TT), testosterona libre (TL) y estradiol (E2) en el suero de los animales de cada uno de los grupos experimentales.

Tabla 3. Análisis hormonal sérico de los distintos grupos experimentales

Grupo Experimental	<i>Normocalórico Joven</i>	<i>Hipercalórico Joven</i>	<i>Normocalórico Adulto</i>	<i>Hipercalórico Adulto</i>
Hormonas séricas				
<i>Hormona Luteinizante (mIU/mL)</i>	0.84 ± 0.016	0.85 ± 0.016	1.62 ± 0.018	1.39 ± 0.011 ▼
<i>Hormona Foliculoestimulante (mIU/mL)</i>	1.16 ± 0.016	1.21 ± 0.010 ▲	1.08 ± 0.020	1.55 ± 0.016 ▲
<i>Testosterona Total (pg/mL)</i>	3643 ± 98.48	3334 ± 71.49 ▼	3894 ± 118.0	3475 ± 140.7 ▼
<i>Testosterona Libre (ng/mL)</i>	12.49 ± 0.30	9.21 ± 0.22 ▼	12.86 ± 0.23	12.94 ± 0.16
<i>Estradiol (pg/mL)</i>	2.54 ± 0.11	6.14 ± 0.04 ▲	24.40 ± 0.24	41.64 ± 0.24 ▲
<i>Ratio Testosterona / Estradiol</i>	1462 ± 98.42	543.5 ± 36.96 ▼	134.1 ± 6.22	106.2 ± 6.72 ▼

Los resultados mostrados son el promedio de 10 sujetos experimentales ± el Error Estándar de la Media (EEM). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de inferencia *t-Student*. (▼/▲) Indica diferencia significativa a $p < 0.05$.

En la tabla 3 se muestra que en el grupo HCJ, los niveles de FSH y E2 incrementaron 4.31% y 141.7%, mientras que, la TT, TL y la relación TT/E2, disminuyen significativamente en 8.5%, 26.3% y 62.8%, con respecto al grupo NCJ. En el grupo HCA, FSH y E2 incrementan significativamente en 43.5% y 70.7%; mientras que, la LH, TT y la relación TT/E2, disminuyeron significativamente en un 14%, 12.1% y 20.8%, respectivamente en comparación a su control.

Efecto del síndrome metabólico sobre la síntesis hormonal en testículo

Además de realizar la cuantificación de hormonas séricas, se cuantificó a nivel testicular la concentración de TT, TL, androstenediona, E2 y colesterol. En la tabla 4, se muestra que, en el grupo HCJ, existe un incremento significativo en la concentración de E2 (140.6%) y del porcentaje de testosterona biotransformada en estradiol (151.1%), sin que los otros parámetros evaluados presentaran diferencias con relación con el grupo de control. Asimismo, en el grupo HCA, se mantuvieron incrementados los mismos parámetros, E2

(113.5%), el porcentaje de testosterona biotransformada en estradiol (104.5%), sumándose la concentración de colesterol testicular (56.8%) en comparación con su grupo control. Respecto a las hormonas androgénicas evaluadas (androstenediona, testosterona total y testosterona libre) no se observaron diferencias en los grupos HCJ e HCA.

Tabla 4. Análisis de colesterol y hormonas en testículo de los distintos grupos experimentales

Grupo Experimental	Normocalórico Joven	Hipercalórico Joven	Normocalórico Adulto	Hipercalórico Adulto
Hormonas tisulares				
<i>Androstenediona (ng/g de tejido)</i>	38.84 ± 1.65	39.41 ± 1.04	35.86 ± 1.44	37.92 ± 1.07
<i>Testosterona Total (pg/ g de tejido)</i>	206.2 ± 8.98	193 ± 8.24	189.2 ± 9.11	198.1 ± 7.95
<i>Testosterona Libre (ng/g de tejido)</i>	1.67 ± 0.06	1.57 ± 0.04	1.53 ± 0.06	1.57 ± 0.05
<i>Estradiol (pg/g de tejido)</i>	0.1881 ± 0.0074	0.4525 ± 0.0442 ▲	0.5930 ± 0.0366	1.266 ± 0.0715 ▲
<i>% de Testosterona biotransformada en estradiol</i>	0.0920 ± 0.0020	0.2310 ± 0.0153 ▲	0.3120 ± 0.0098	0.6380 ± 0.0236 ▲
<i>Colesterol (mg/g tejido)</i>	1.42 ± 0.21	1.60 ± 0.22	1.92 ± 0.18	3.01 ± 0.43 ▲

Los resultados mostrados son el promedio de 10 sujetos experimentales ± el Error Estándar de la Media (EEM). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de inferencia *t-Student*. (▼/▲) Indica diferencia significativa a $p < 0.05$.

Efecto del síndrome metabólico sobre la expresión de receptores hormonales a nivel testicular

Se realizaron distintos ensayos de inmunofluorescencia con la finalidad de poner en evidencia el comportamiento y dinámica de expresión del receptor de la hormona foliculoestimulante (rFSH), andrógenos (rA) y estrógenos tipo α y β (rE α y rE β).

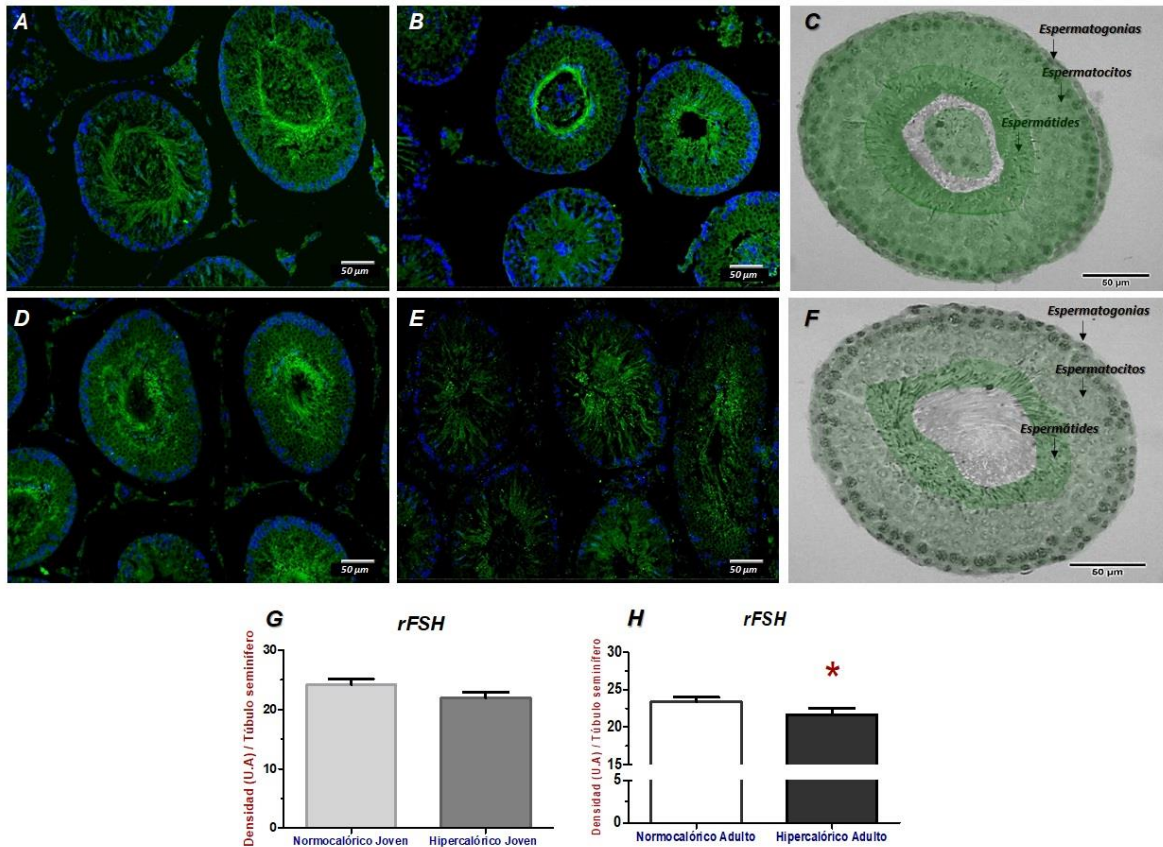


Figura 11. Expresión del receptor de la hormona folículo Estimulante (rFSH) en túbulos seminíferos en edades reproductivas experimentales. Se muestran fotomicrografías representativas tomadas a 10X de los grupos experimentales: Normocalórico joven (A); Hipercaleórico joven (B); Normocalórico adulto (D); Hipercaleórico adulto (E). Esquema de la distribución de expresión del receptor en células del túbulo seminífero del grupo: Hipercaleórico joven (C); Hipercaleórico adulto (F). En los gráficos G y H se muestra el análisis densitométrico. Los resultados mostrados son el promedio del análisis de 45 túbulos por grupo \pm EEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. (*) Indica diferencias significativas a $p < 0.05$.

La expresión del rFSH se localiza principalmente en la membrana de las células de Sertoli, la cual se extiende desde la base de los túbulos seminíferos hacia la parte del lumen tubular, notándose una mayor expresión en la zona donde se ubican los espermátides, esto debido a la alta cantidad de residuos citoplasmáticos resultado de los procesos de maduración espermática y, por tanto, la concentración de los receptores en esta zona; como se muestra en las figuras 11A y D. De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis densitométrico el grupo HCJ no presentó cambios significativos. Mientras que en el grupo HCA se observó un

decremento del 7.5%, siendo éste estadísticamente significativo (Figuras 11G y H). En ambos grupos hipercalóricos se observa una disminución localizada en las zonas donde se encuentran las espermatogonias y los espermatocitos (Figuras 11 B y 5), tal y como se presenta en los esquemas realizados de acuerdo con la distribución de expresión del receptor en células del túbulo seminífero (Figuras 11C y F).

Por otro lado, el receptor de andrógenos se expresa en células de Sertoli y en espermátides dentro de los túbulos seminíferos. Siendo los espermatocitos secundarios y las espermátides los tipos celulares con mayor expresión del receptor (Figuras 12A y D). En los grupos hipercalóricos se observó un incremento en la expresión del receptor androgénico, no sólo en los tipos de células ya mencionados, sino que se observa también un impacto en las espermatogonias y espermatocitos primarios (Figuras 12C y F). El grupo HCJ denota una mayor expresión en las zonas antes mencionadas, como se muestra en las figuras 12B y C. Este cambio se confirmó con un análisis densitométrico, en donde se encontraron cambios estadísticamente significativos en ambos grupos hipercalóricos (Figuras 12G y H), al observarse un incremento del 42.7% (HCJ) y del 13.2% (HCA) en comparación de los respectivos grupos normocalóricos.

Respecto al receptor estrogénico, se han descrito dos subtipos de rE: el α (rE α) y β (rE β). El rE α se expresa en las células de Leydig y en células germinales, pero no en las células de Sertoli. De acuerdo con el análisis densitométrico, la expresión del rE α en el grupo HCJ disminuyó en un 74.4% (Figura 13M) con respecto al normocalórico, siendo las células espermáticas correspondientes a espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios los más afectados, como se aprecia en la fotomicrografía 13C y 13I. En el grupo HCA, el decremento de la expresión fue del 55.4% (Figura 13O), también estadísticamente significativo con respecto a su grupo control. En esta edad reproductiva, la región que comprende espermátides y espermatozoides manifiesta la menor expresión de rE α (Figuras 13G y K). Asimismo, en el espacio extratubular, donde se ubican las células de Leydig, en ambos grupos hipercalóricos, se presenta una notable disminución en la expresión del rE α .

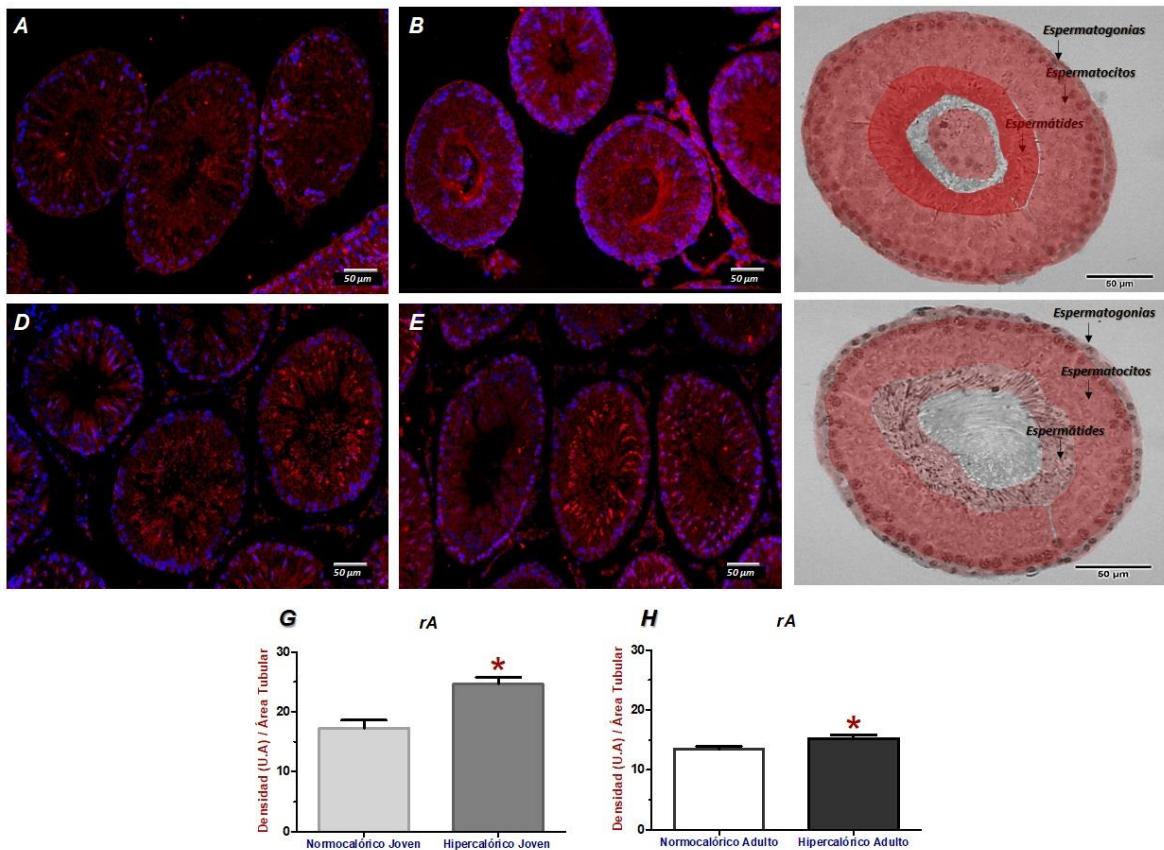


Figura 12. Expresión del receptor de andrógenos (*rA*) en túbulos seminíferos en edades reproductivas experimentales. Se muestran fotomicrografías representativas tomadas a 10X de los grupos experimentales: Normocalórico joven (**A**); Hipercalórico joven (**B**); Normocalórico adulto (**D**); Hipercalórico adulto (**E**). Esquema de la distribución de expresión del receptor en células del túbulo seminífero del grupo: Hipercalórico joven (**C**); Hipercalórico adulto (**F**). En los gráficos **G** y **H** se muestra el análisis densitométrico. Los resultados mostrados son el promedio del análisis de 45 túbulos por grupo \pm EEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. (*) Indica diferencias significativas a $p < 0.05$.

El $r\beta$ se expresa en células de Leydig, Sertoli y en menor cantidad en las células germinales. Este presentó una disminución estadísticamente significativa del 8.1% (Figura 13N), en grupo HCJ, principalmente en la zona donde se localizan las espermatídes y espermatozoides (Figuras 13D y J). Mientras que, en el grupo hipercalórico adulto no se presentaron cambios estadísticos (Figura 13P), sin embargo, se denota un cambio en la dinámica de expresión en las distintas células, es decir, se observa una mayor expresión en la región donde se localizan los espermatocitos primarios y secundarios, mientras que, disminuye la expresión en las células correspondientes a espermatídes y espermatozoides (Figuras 13H y L).

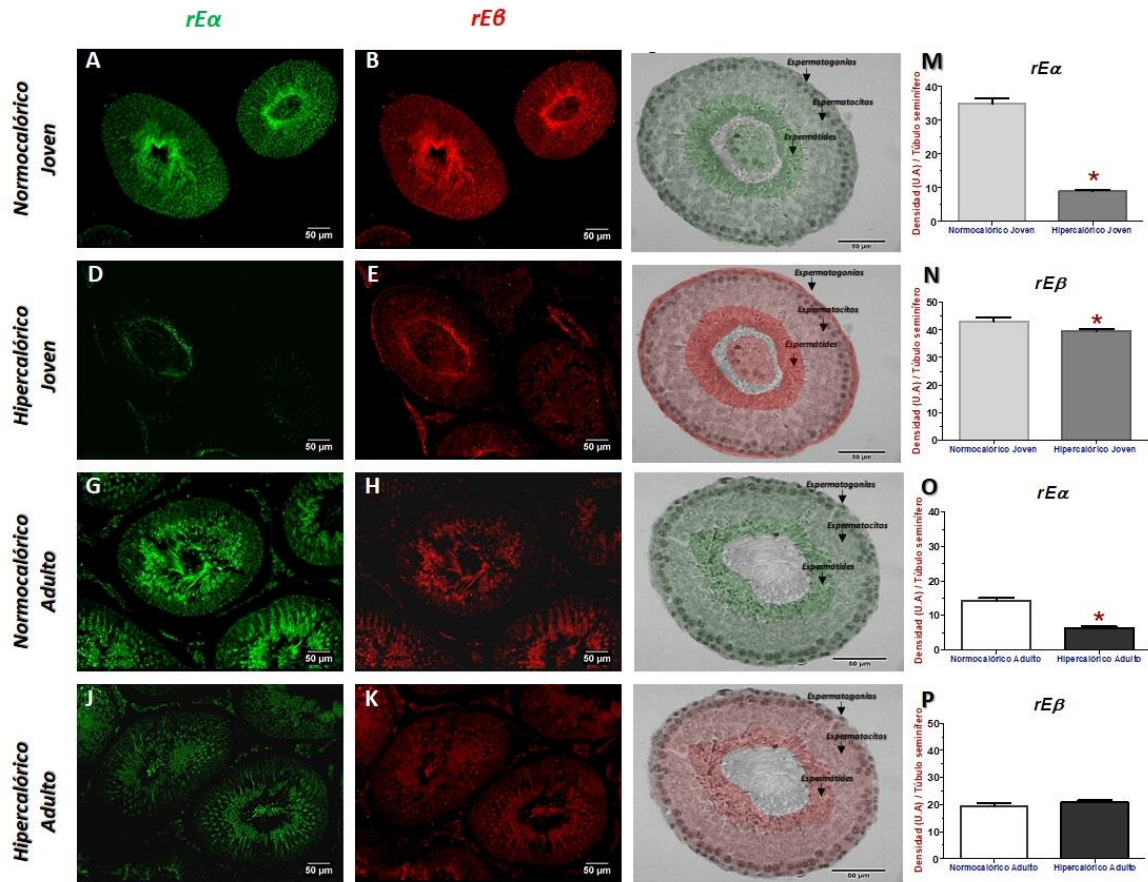


Figura 13. Expresión del receptor de estrógenos (rE) tipo alfa ($rE\alpha$) y beta ($rE\beta$) en túbulos seminíferos en edades reproductivas experimentales. Se muestran fotomicrografías representativas tomadas a 10X de los grupos experimentales: Normocalórico joven (A-B); Hipercalórico joven (C-D); Normocalórico adulto (E-F); Hipercalórico adulto (G-H). Esquema de la distribución de expresión del receptor en células del túbulo seminífero del grupo: Hipercalórico joven (I-J); Hipercalórico adulto (K-L). En los gráficos G y H se muestra el análisis densitométrico. En los gráficos M-P se muestra el análisis densitométrico. Los resultados mostrados son el promedio del análisis de 45 túbulos por grupo \pm EEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. (*) Indica diferencias significativas a $p < 0.05$.

En lo que respecta a la relación y distribución de la expresión del $rE\alpha$ con $rE\beta$ (Figuras. 14C y F), en ambos grupos experimentales se observó una disminución significativa del 72.9% (HCJ) y del 63.2% (HCA). En el grupo HCJ se presentó un decremento considerable en la expresión de ambos receptores estrogénicos en la región de las espermatogonias y espermatocitos, mientras que en la zona de las espermátides se aprecia la expresión de ambos receptores (Figura 14 B). Por otro lado, en el grupo HCA, se pierde la relación de la expresión

de los receptores estrogénicos al verse incrementado el $rE\beta$ respecto al $rE\alpha$ en las espermatogonias y espermatocitos principalmente, mientras que en las espermátides y espermatozoides el cambio no es tan marcado respecto al grupo normocalórico (Figura 14E).

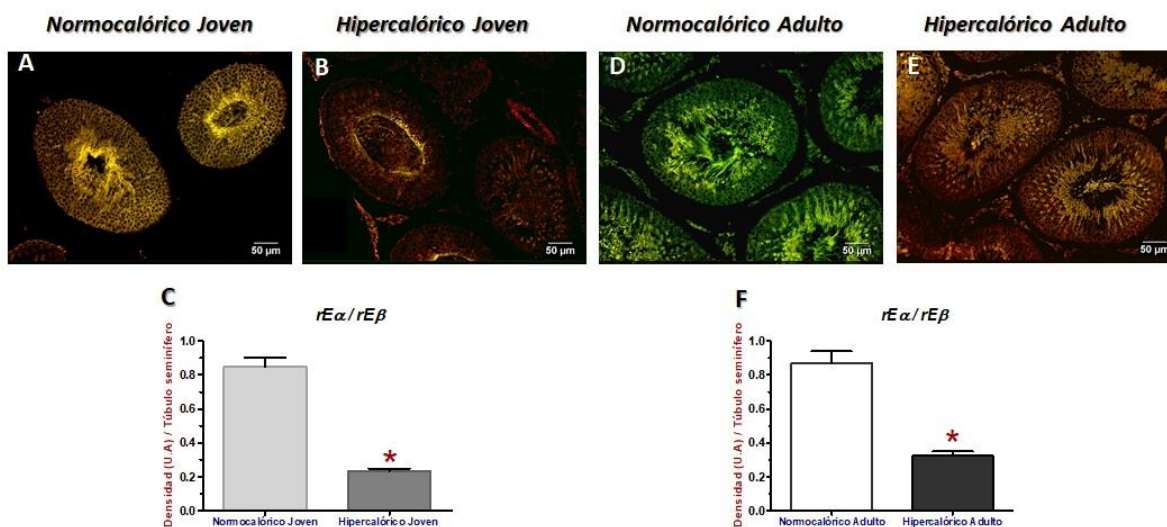


Figura 14. Relación entre la expresión del receptor de estrógenos (rE) tipo alfa/beta ($rE\alpha / rE\beta$) en túbulos seminíferos. Se muestran fotomicrografías representativas tomadas a 10X de los grupos experimentales: Normocalórico joven (A); Hipercalórico joven (B); Normocalórico adulto (D); Hipercalórico adulto (E). En los gráficos C y F se muestra el análisis densitométrico del grupo en edad reproductiva temprana y tardía respectivamente. Los resultados mostrados son el promedio del análisis de 45 túbulos por grupo \pm EEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. (*) Indica diferencias significativas a $p < 0.05$.

Efecto del síndrome metabólico sobre la expresión de los citocromos con función reductasa y aromatasa

La biotransformación de la testosterona necesita del complejo enzimático P450-Reductasa (P450-Red) cuya acción es la generación de dihidrotestosterona (DHT), es decir, la forma activa de la hormona. Una segunda vía es la aromatización de la testosterona a estrógenos, esta acción se lleva a cabo por la citocromo P450-aromatasa (P450-Aro). La P450-Aro se expresa principalmente en células de Leydig, sin embargo, también se puede encontrar en las células de Sertoli y células germinales en todas las etapas de maduración. Su expresión aumenta a medida que las células germinales maduran en espermátides.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el análisis densitométrico se observó un incremento significativo en ambos grupos hipercalóricos respecto a sus controles normocalóricos, del 49.8% (HCJ; Figura 15G) y del 33.6% (HCA; Figura 15H). De acuerdo con las microfotografías representativas de los grupos HCJ y HCA (Figuras. 15B y E), se observa una mayor fluorescencia en espermatogonias y espermatocitos, a diferencia de los controles normocalóricos en los que la expresión del complejo se presenta principalmente en las espermátides y espermatozoides, y el grado de expresión disminuye hacia las espermatogonias (Figura 15A). Un efecto interesante que se observa en los grupos de edad reproductiva tardía con SMet, es la disminución de la expresión de la P450-Aro en las células de Leydig.

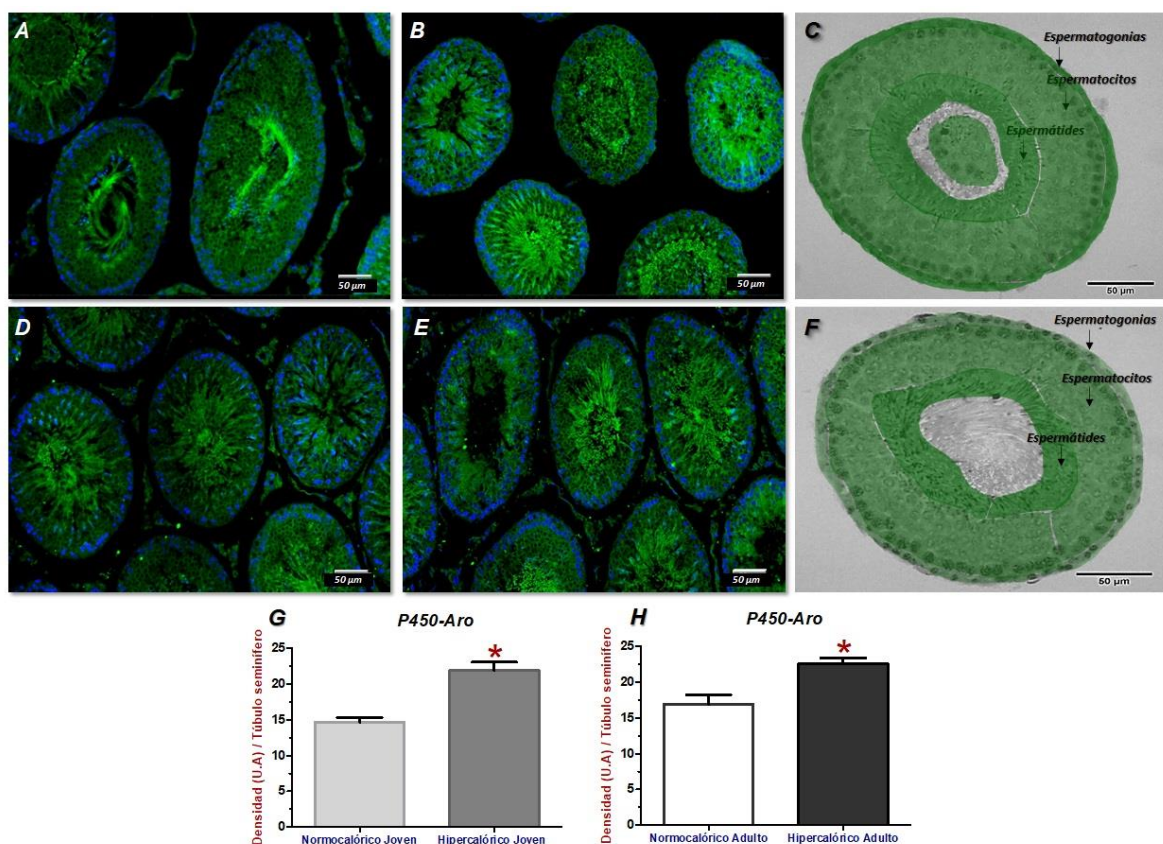


Figura 15. Expresión del citocromo P450-Aromatasa (P450-Aro) en túbulos seminíferos en edades reproductivas experimentales. Se muestran fotomicrografías representativas tomadas a 10X de los grupos experimentales: Normocalórico joven (A); Hipercalórico joven (B); Normocalórico adulto (D); Hipercalórico adulto (E). Esquema de la distribución de expresión del receptor en células del túbulo seminífero del grupo: Hipercalórico joven (C); Hipercalórico adulto (F). En los gráficos G y

Se muestra el análisis densitométrico. Los resultados mostrados son el promedio del análisis de 45 túbulos por grupo \pm EEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. (*) Indica diferencias significativas a $p < 0.05$.

Por otro lado, el complejo enzimático P450-Red cuya acción es la generación de estrógenos, se expresa en células de Sertoli y en células germinales, siendo las espermatídes las de mayor expresión. Su expresión es diferenciada en las edades reproductivas analizadas (Figuras. 16A y D), como se puede observar por la mayor expresión del complejo enzimático P450-Red en la rata adulta, en donde el complejo es homogéneamente distribuido en los grupos celulares antes mencionados. Sin embargo, el consumo de una dieta hipercalórica incrementó significativamente la expresión de la enzima en 105.3%, en ratas de edad reproductiva temprana (Figura 16C). La expresión se observó tanto en espermatídes, como en espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios (Figura 16B). En ratas de edad reproductiva tardía no se presentaron cambios significativos respecto a su grupo control (Figura 16F). Sin embargo, se aprecia una disminución de la inmunofluorescencia en las espermatogonias (Figura 16E).

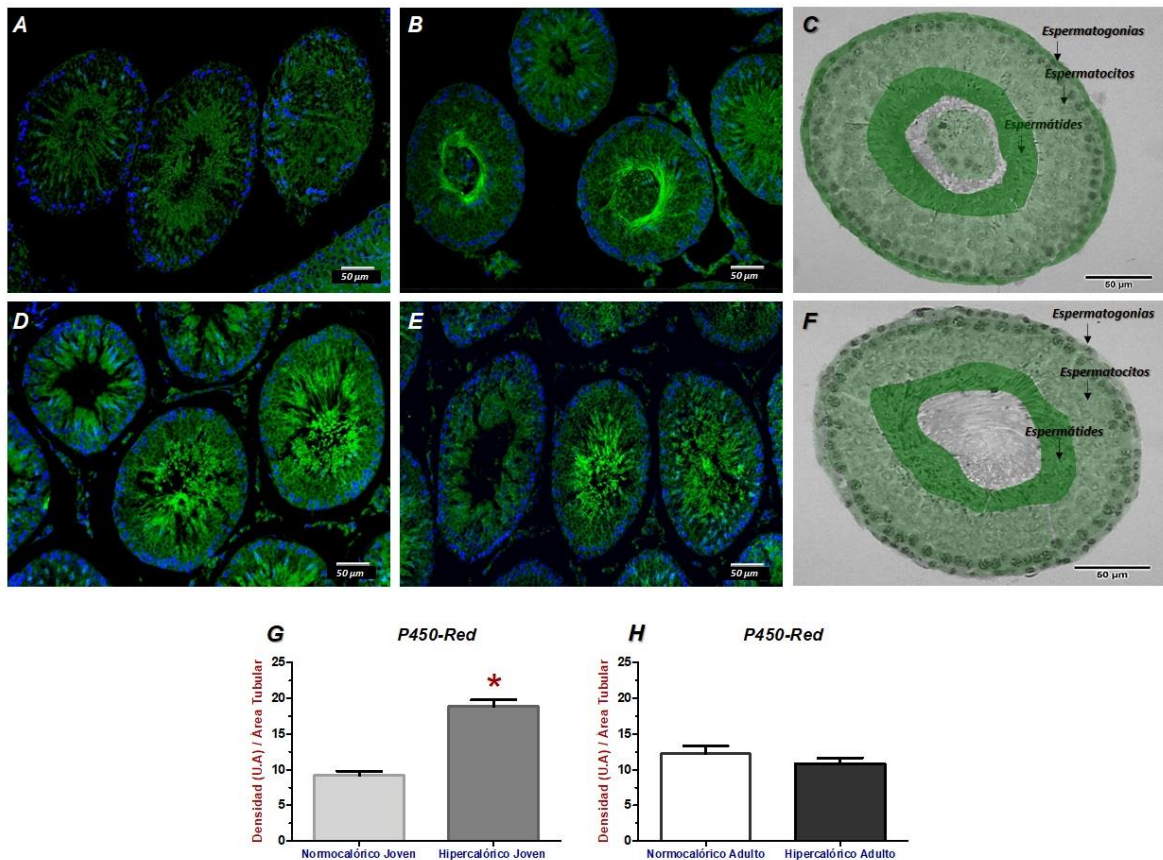


Figura 16. Expresión del citocromo *P450-Reductasa* (*P450-Red*) en túbulos seminíferos en edades reproductivas experimentales. Se muestran fotomicrografías representativas tomadas a 10X de los grupos experimentales: Normocalórico joven (A); Hipercalórico joven (B); Normocalórico adulto (D); Hipercalórico adulto (E). Esquema de la distribución de expresión del receptor en células del túbulo seminífero del grupo: Hipercalórico joven (C); Hipercalórico adulto (F). En los gráficos G y H se muestra el análisis densitométrico. Los resultados mostrados son el promedio del análisis de 45 túbulos por grupo \pm EEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. (*) Indica diferencias significativas a $p < 0.05$.

Modificaciones citoestructurales en túbulos seminíferos causados por el síndrome metabólico.

Los procesos de proliferación, diferenciación y maduración espermática se llevan a cabo dentro de los túbulos seminíferos. En dichas estructuras se organizan y distribuyen los diferentes estratos celulares precursores de espermatozoides, permitiendo el reconocimiento de distintos grupos de células germinales con características morfológicas específicas. En las figuras 17 y 18 se muestran fotomicrografías de cortes de testículo en donde se pueden

apreciar los túbulos seminíferos, observándose los diferentes tipos celulares y su maduración con características particulares entre cada una de estas poblaciones.

Las células de *Sertoli* (flechas de color negro) se encuentran en menor cantidad, estas son células que presentan núcleos alargados con coloración pálida, el citoplasma se extiende desde la periferia hasta la luz del túbulo (Figuras 17-18 C y F). Las células espermátogénicas, se encuentran en capas concéntricas: *espermátogonias* (flechas azules) ubicadas en la periferia pegadas a la membrana basal y soportadas por las células de Sertoli, son células diploides e inmóviles, presentan una forma redonda, un núcleo oval (aplanado) con abundante heterocromatina, lo que otorga un aspecto denso del núcleo. Posterior a estas células se encuentran los *espermátocitos* (flechas amarillas: espermátocitos primarios y verdes: espermátocitos secundarios) son las células más grandes del túbulo seminífero, tienen un núcleo grande redondeado con una cromatina distintiva debido a que su material cromático está siendo reorganizado. La población de las *espermátides* (flechas anaranjadas), ocupan el sitio más cercano a la luz tubular, presentan cabezas de color azul oscuro con núcleos esferoidales y flagelos eosinofílicos que sobresalen hacia la luz tubular (indicado con *).

Bajo condiciones fisiológicas, las células germinales se encuentran distribuidas e interconectadas entre sí en capas horizontales dentro del túbulo seminífero, cada capa celular se extiende en dirección hacia la luz tubular, de esta manera se asegura la correcta sincronización de los procesos mitóticos y meióticos, como se observa en las fotomicrografías representativas del grupo NCJ (Figuras 17 A-C) y el grupo NCA (Figuras 18 A-C). Cabe denotar que en el grupo HCJ (Figura 17 D-F) se observan cúmulos celulares en la zona de la luz tubular con diferentes grados de maduración, y de acuerdo con sus características histológicas corresponden a espermátocitos primarios y secundarios, los cuales no presentan puentes citoplasmáticos intercelulares con el resto de las células del epitelio seminífero. En lo que respecta al grupo HCA (Figura 18 D-F), no se observaron células inmaduras en el espacio luminal de los túbulos, sin embargo, se observa discontinuidad entre las uniones intercelulares del epitelio, generando espacios libres de células.

Para lograr una caracterización estructural y morfométrica, se determinó el área celular y número de células por túbulo seminífero. El grupo HCJ presentó un incremento estadísticamente significativo del área celular (10.9%) respecto de su grupo control (Figura 19E), sin cambios en el número de células por túbulo (Figura 19G). Mientras que, en el grupo HCA no se presentaron diferencias en el área celular por túbulo seminífero o número de células por túbulo (Figuras 19F y H).

Además, se realizó un conteo diferencial de los diferentes tipos celulares en los grupos experimentales. De acuerdo con los resultados mostrados en la figura 20, en el grupo HCJ se observaron cambios significativos en tres tipos celulares evaluados: células de Sertoli, espermatocitos primarios y espermatocitos secundarios, las primeras con un decremento del 11.9%, mientras que, por el contrario, se presentó un incremento del 12% en los espermatocitos primarios y del 12.9% en los secundarios. En lo que respecta al grupo HCA, no se observaron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los tipos celulares analizados.

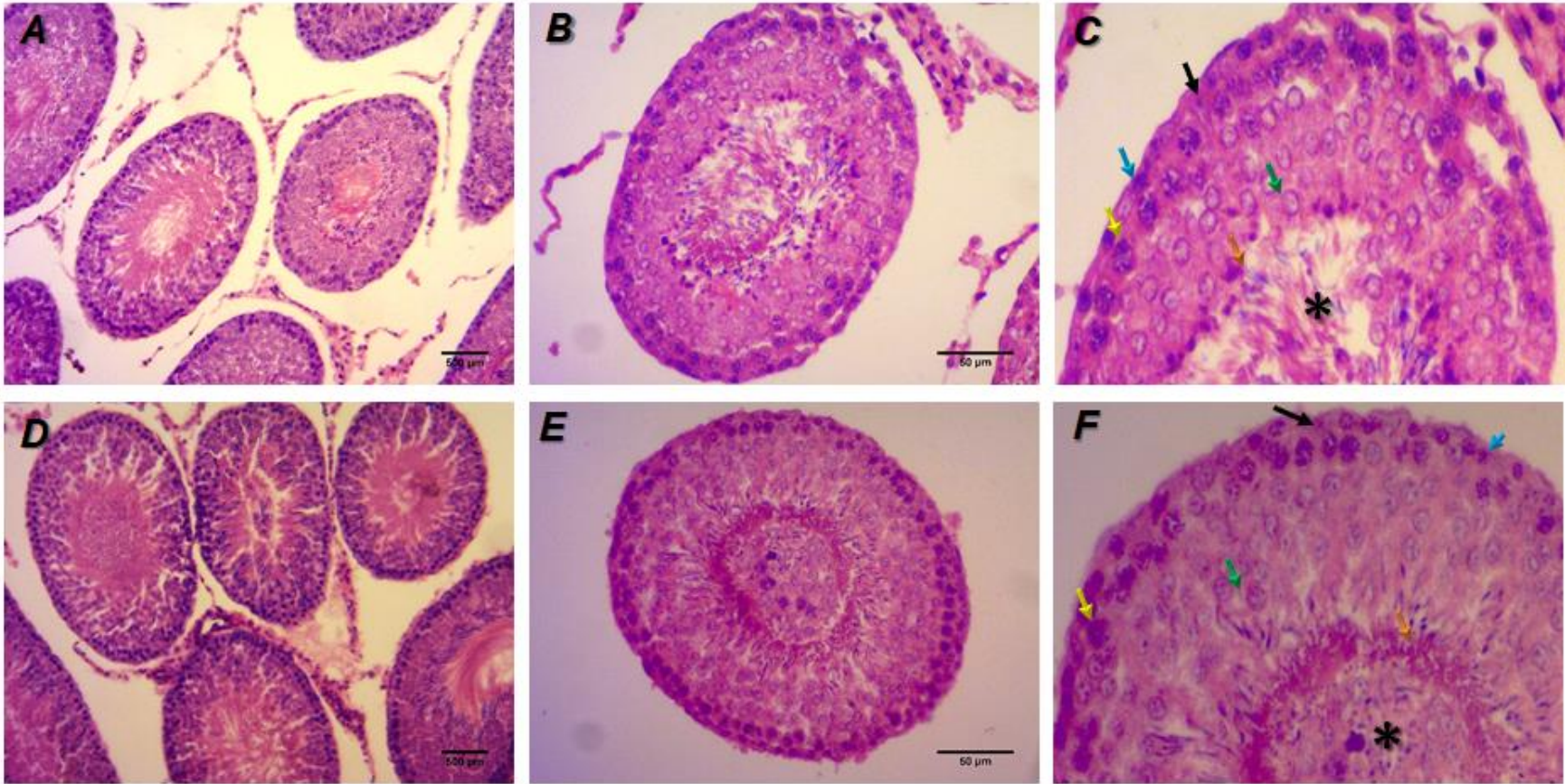


Figura 17. Histología de los túbulos seminíferos de ratas macho Wistar en edad reproductiva temprana. Se muestran fotomicrográficas representativas de túbulos seminíferos de los grupos: Histología testicular grupo control (A-C), magnificación a 10X (A), magnificación a 20x (B), diferenciación celular del túbulo seminífero NCJ (C); Histología testicular grupo hipercalórico (D-F), magnificación a 10X (D), magnificación a 20X (E), diferenciación celular del túbulo seminífero HCJ (F). Células de Sertoli (→); Espermatogonia (→); Espermatocito primario (→); Espermatocito secundario (→); Espermátides (→).

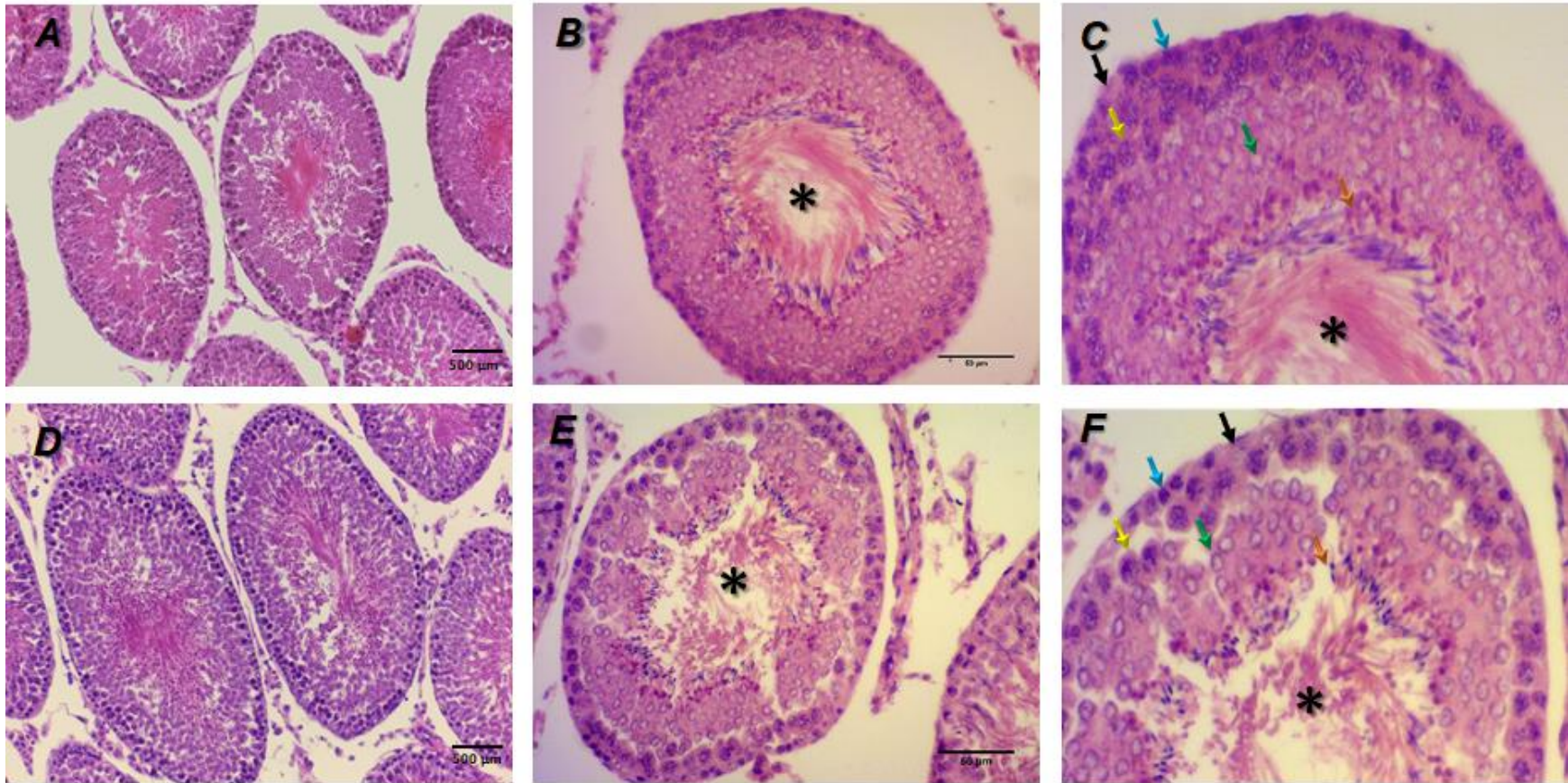


Figura 18. *Histología de los túbulos seminíferos de ratas macho Wistar en edad reproductiva tardía.* Se muestran fotomicrografías representativas de túbulos seminíferos de los grupos: Histología testicular grupo control (A-C), magnificación a 10X (A), magnificación a 20x (B), diferenciación celular del túbulo seminífero NCA (C); Histología testicular grupo hipercalórico (D-F), magnificación a 10X (D), magnificación a 20X (E), diferenciación celular del túbulo seminífero HCA (F). Células de Sertoli (→); Espermatogonia (→); Espermatocito primario (→); Espermatocito secundario (→); Espermatídes (→).

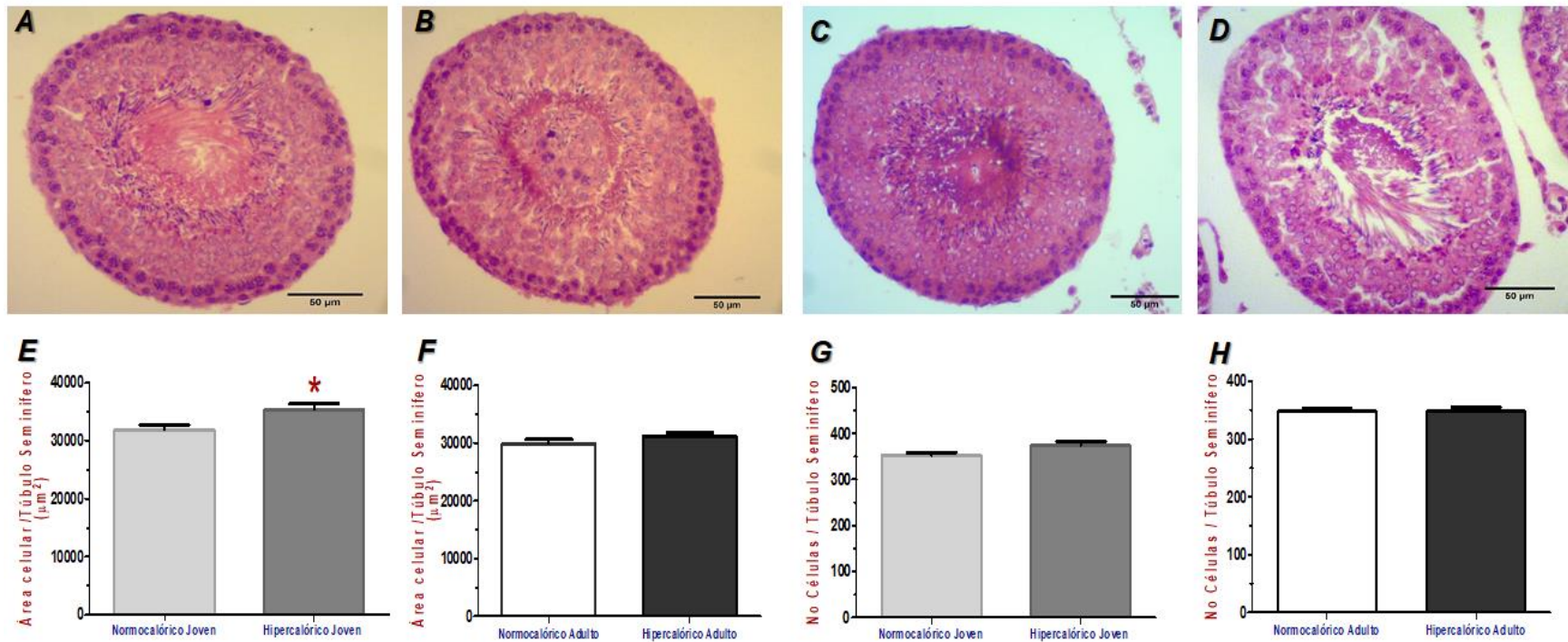


Figura 19. Impacto del síndrome metabólico sobre el área celular y número de células en túbulos seminíferos de ratas macho Wistar en edades reproductivas experimentales. Se muestran fotomicrografías representativas de los grupos: Normocalórico Joven a 20X (A); Grupo Hipercalórico Joven a 20X (B); Normocalórico Adulto a 20X (C) y Grupo Hipercalórico Adulto a 20X (D). Efecto sobre el área celular total de túbulos seminíferos (μm^2) (E y F); y sobre el número total de células (G y H). Los resultados mostrados son el promedio del análisis de 100 túbulos por grupo \pm EEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de inferencia t-Student. (*) Indica diferencias significativas a $p < 0.05$.

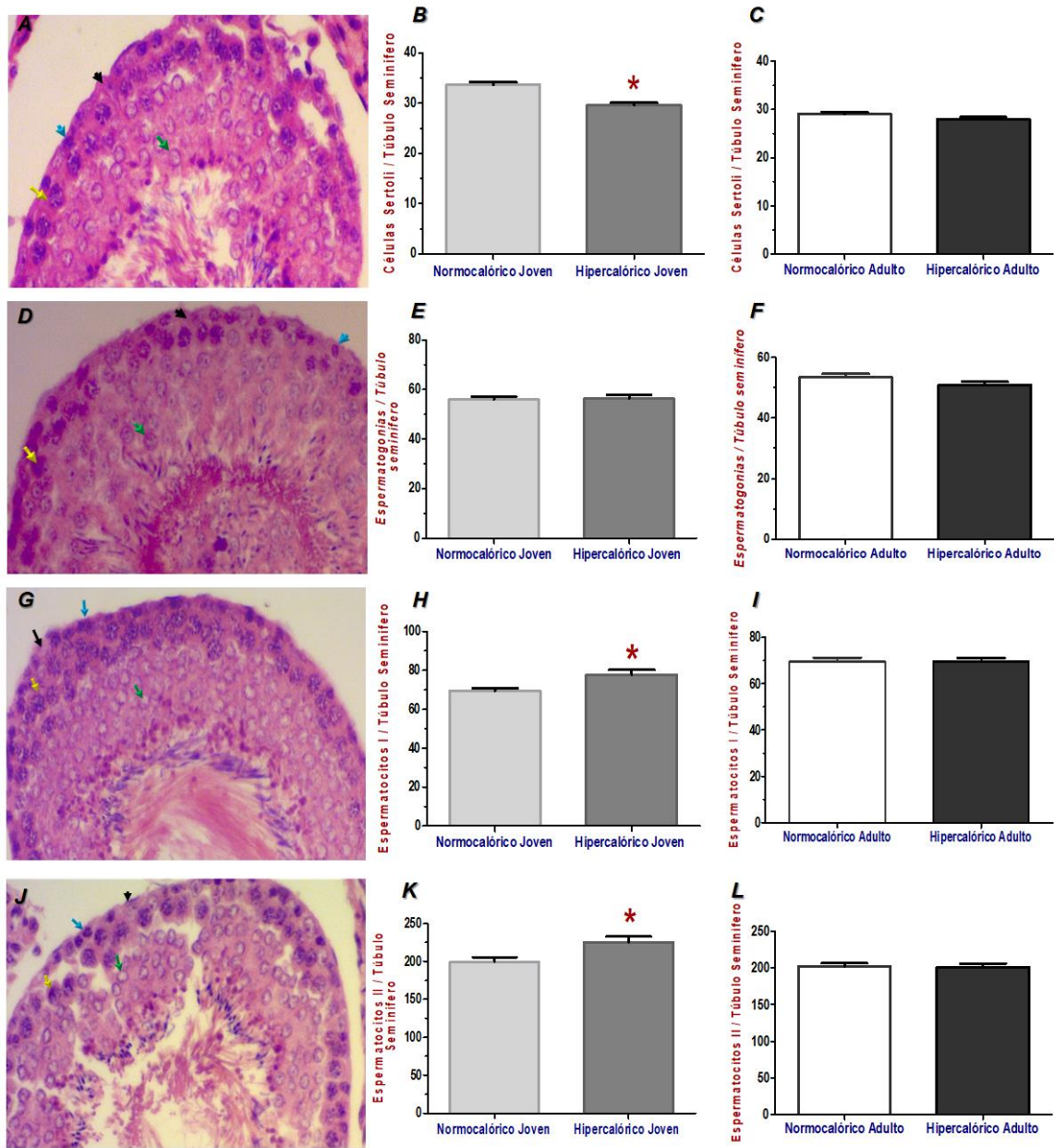


Figura 20. Impacto del síndrome metabólico sobre el número de células espermáticas en edades reproductivas experimentales. Se muestran fotomicrografías representativas de los grupos: Normocalórico Joven (A); Hipercalórico Joven (D); Normocalórico Adulto (G) y Grupo Hipercalórico Adulto (J). Efecto sobre el número total de células en túbulos seminíferos redondos: Células de Sertoli (→) (B-C); Espermatogonia (→) (E-F); Espermatocito primario (→) (H-I); Espermatocito secundario (→) (K-L). Los resultados mostrados son el promedio del análisis de 100 túbulos por grupo \pm EEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. (*) Indica diferencias significativas a $p < 0.05$

Por otro lado, la tinción con DAPI nos permitió distinguir diferentes poblaciones celulares en los túbulos seminíferos en función de la posición, el tamaño y la forma de los núcleos, así como analizar la apariencia de la cromatina (Figura 21). El tipo y número de células mostró resultados semejantes a los obtenidos con el análisis de la tinción de hematoxilina y eosina. Además, el análisis realizado sobre las características de la cromatina demostró que en el grupo HCJ, el núcleo de los espermatoцитos, así como de las espermátides y espermatozoides presentaron condensación y fragmentación nuclear (Figura 21E y F). Mismos efectos se observaron en el grupo experimental HCA (Figuras 21K – L) tanto en los espermatoцитos secundarios como en las espermátides y espermatozoides. Para corroborar, el daño y probable muerte celular se realizó un análisis con la tinción con naranja de acridina (Figura 22). Un incremento en la muerte celular mostrado por la quimiofluorescencia naranja-rojiza fue localizada en espermatoцитos secundarios, espermátides y espermatozoides principalmente. El análisis densitométrico demostró un incremento del 135.2% en el grupo HCJ con respecto al NCJ (Figura 22C). Mientras que en el grupo HCA hubo un incremento del 97.3% con respecto al grupo normocalórico (Figura 22F).

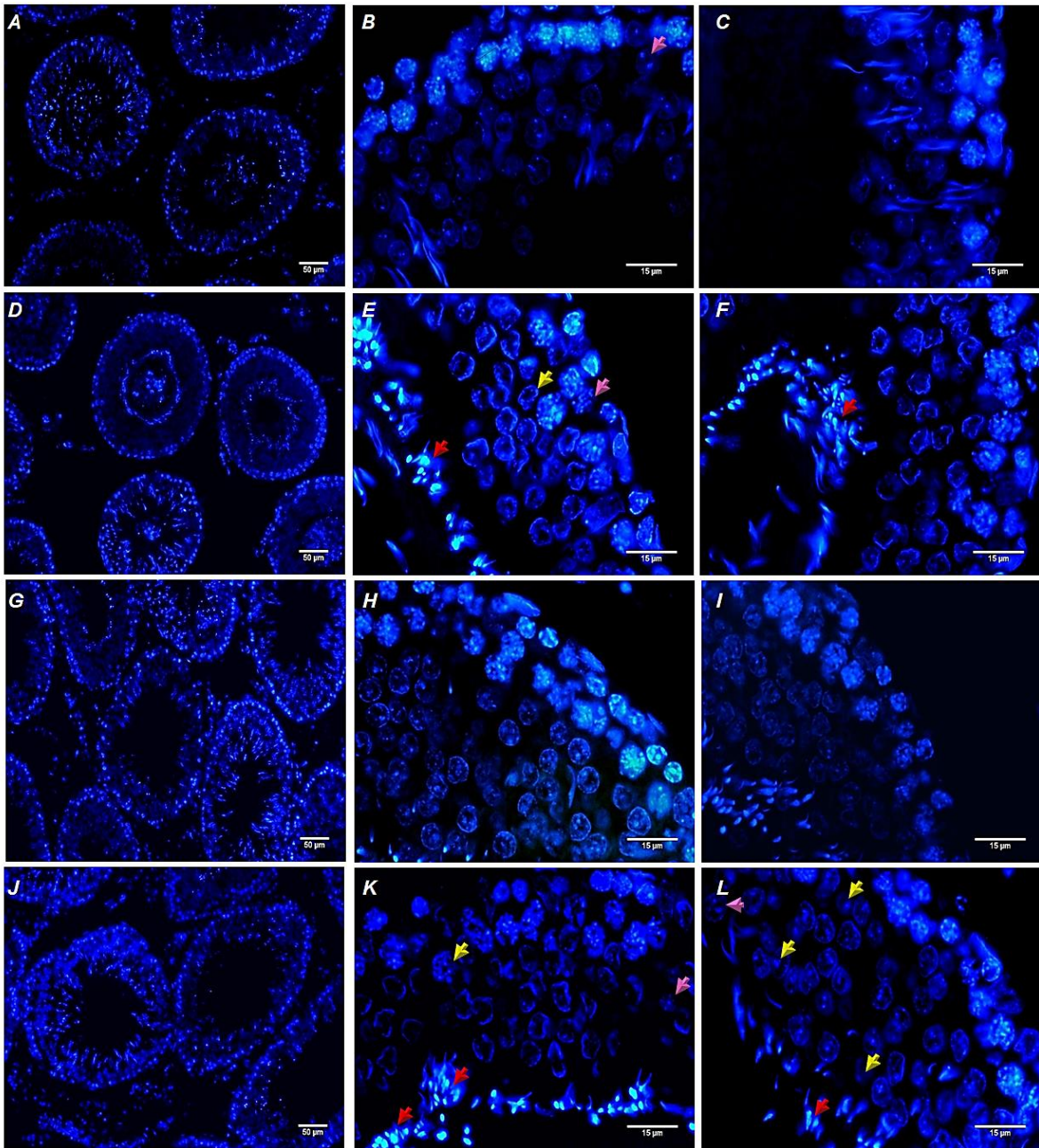


Figura 21. Efecto del síndrome metabólico sobre las características nucleares de células espermáticas en edades reproductivas experimentales. Se muestran fotomicrografías representativas de los grupos experimentales joven (A-F) y adulto (G-L) marcadas con DAPI. Grupo normocalórico joven (A-C); Grupo hipercalórico joven (D-F); Grupo normocalórico adulto (G-I); Grupo hipercalórico adulto (J-L). Condensación de la cromatina (→); Fragmentación nuclear (→) y condensación nuclear (→).

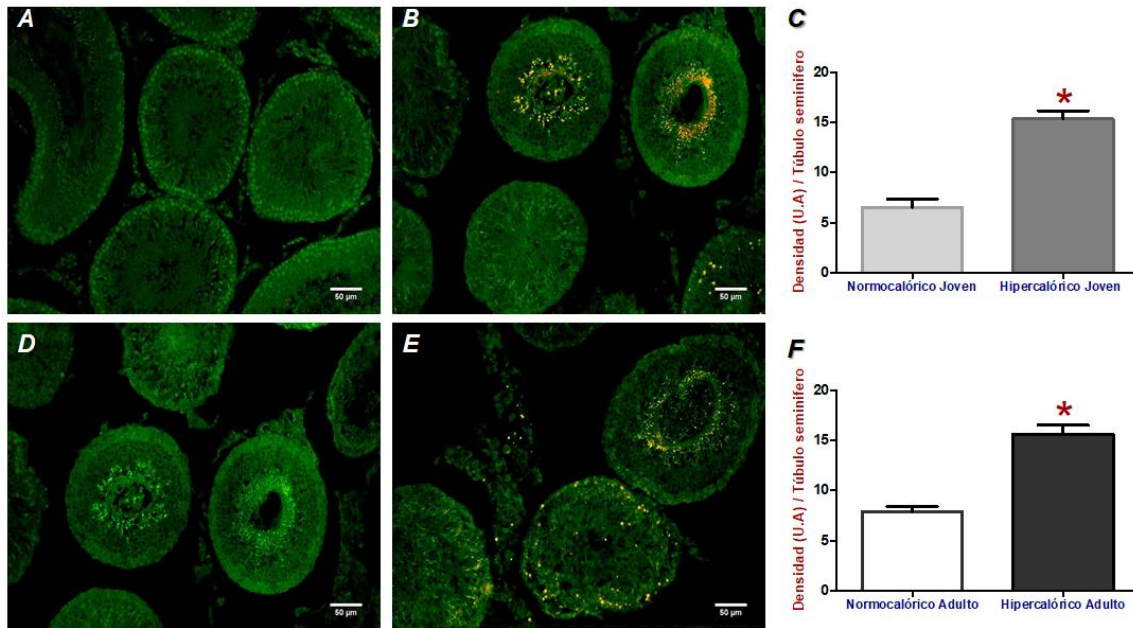


Figura 22. Fluorescencia con Naranja de Acridina de túbulos seminíferos en edades reproductivas experimentales. Se muestran fotomicrografías representativas tomadas a 10X de los grupos experimentales: normocalórico joven (A); hipercalórico joven (B); normocalórico adulto (D); hipercalórico adulto (E). Análisis densitométrico (C y F). Los resultados mostrados son el promedio del análisis de 30 túbulos por grupo \pm EEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. (*) Indica diferencias significativas a $p < 0.05$.

Impacto del síndrome metabólico sobre los principales tejidos andrógeno-dependientes

Complementariamente, en los tiempos de cohorte establecidos se realizó la extracción de los principales tejidos andrógeno-dependientes: testículos, epidídimos y vesícula seminal. Los cuales fueron pesados y posteriormente determinada la relación entre el peso del tejido con respecto al peso total del animal (Tabla 5).

De acuerdo con los resultados observados en la tabla 5, en los animales que conformaron al grupo HCJ hubo una disminución significativa del 8.9% en el peso del testículo derecho, así como en el epidídimo derecho (22.7%) e izquierdo (17.9%). Mientras que en los animales del grupo HCA hubo una disminución del 10.4%, 15.2% y 16.2% en el peso del epidídimo derecho, izquierdo y en la vesícula seminal respectivamente con respecto al grupo NCA. En el grupo HCJ se observó un incremento significativo en el índice gonadosomático derecho e

izquierdo al incrementar 26.4% y 34.0%, respectivamente. En el grupo HCA no se observaron diferencias en dicho índice.

Tabla 5. Características testiculares y de tejidos andrógeno dependientes de los diferentes grupos experimentales.

Grupo Experimental	Normocalórico Joven	Hipercaleórico Joven	Normocalórico Adulto	Hipercaleórico Adulto
Peso (g)				
Testículo derecho	1.809 ± 0.0361	1.648 ± 0.0436 ▼	1.787 ± 0.0399	1.715 ± 0.0575
Testículo izquierdo	1.704 ± 0.0970	1.633 ± 0.0355	1.799 ± 0.0393	1.725 ± 0.0572
Epidídimo derecho	0.8796 ± 0.0432	0.6710 ± 0.0455 ▼	0.8107 ± 0.0342	0.7261 ± 0.0197 ▼
Epidídimo izquierdo	0.7149 ± 0.0690	0.5873 ± 0.0242 ▼	0.8728 ± 0.0288	0.7406 ± 0.0232 ▼
Vesícula seminal	0.5922 ± 0.0476	0.6013 ± 0.04 51	0.5900 ± 0.0195	0.4944 ± 0.0328 ▼
Índice gonadosomático				
Testículo derecho	0.0053 ± 0.0006	0.0067 ± 0.0010 ▲	0.0050 ± 0.0003	0.0054 ± 0.0006
Testículo izquierdo	0.0050 ± 0.0009	0.0067 ± 0.0009 ▲	0.0050 ± 0.0004	0.0054 ± 0.0006
Relación Tejido/ peso corporal				
Epidídimo derecho	0.0026 ± 0.0004	0.0027 ± 0.0004	0.0022 ± 0.0002	0.0023 ± 0.0003
Epidídimo izquierdo	0.0021 ± 0.0006	0.0024 ± 0.0003	0.0024 ± 0.0002	0.0023 ± 0.0002
Vesícula seminal	0.0059 ± 0.0015	0.0060 ± 0.0014	0.0053 ± 0.0017	0.0049 ± 0.0010

Los resultados mostrados son el promedio de 10 sujetos experimentales ± el Error Estándar de la Media (EEM). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de inferencia *t*-Student. (▼/▲) Indica diferencia significativa a $p < 0.05$.

9. *Discusión*

Desarrollo de síndrome metabólico por consumo de una dieta hipercalórica-hiperglúcida

En la actualidad, los estudios dietéticos se han convertido en la piedra angular para la investigación del SMet, debido a que las dietas hipercalóricas tienen un impacto directo sobre la dinámica metabólica, principalmente en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos [Wong, 2016; Suman RK, 2016].

Los carbohidratos se consideran macromoléculas esenciales desde el punto de vista energético, ya que sirven como la fuente principal de energía a corto plazo, al ser más fácilmente metabolizados en comparación con las grasas. El consumo frecuente de dietas altas en carbohidratos simples, en conjunto con un estilo de vida sedentario favorece el almacenamiento de energía, sobrepeso y finalmente obesidad en tiempos prolongados [Wong SK, 2016]. Cuando la ingesta de carbohidratos excede los requerimientos diarios de energía por tiempos prolongados, la concentración de glucosa en sangre se incrementa.

En el presente trabajo se utilizó una dieta hipercalórica alta en carbohidratos (MX/E/2013/047377) para los grupos *Hipercalóricos* tanto *joven* como *adulto*. Dentro de los componentes de la dieta el 71.4% corresponde a carbohidratos simples, de los cuales el 80% son glucosa y el 20% restante fructosa. Una dieta normocalórica para roedores debe tener una composición de carbohidratos del 48.7% (LabDiet 5001). Nuestros resultados mostraron hiperglucemia e intolerancia a la glucosa en los grupos experimentales hipercalóricos (Tabla 2). En respuesta a la hiperglicemia, la liberación de insulina por las células beta pancreáticas incrementa, como se pudo observar en nuestros grupos experimentales (Tabla 2, curva de insulina), lo cual se conoce como hiperinsulinemia compensatoria, que a la cronicidad conlleva a la pérdida del efecto de la hormona, lo cual puede ser debido a una baja sensibilidad o el desarrollo de resistencia a insulina (RI) [Gadgil MD, 2013].

Trabajos de Ferrannini, DeFronzo y colaboradores, han demostrado que, en proporción al aumento de la concentración de glucosa plasmática, el aclaramiento hepático de glucosa se reduce marcadamente en todos los sujetos con RI, SMet y DM2, además de incrementar la gluconeogénesis [DeFronzo RA, 1989]. Para confirmar la RI en los grupos

hipercalóricos se utilizó el HOMA-IR (Tabla 2) observándose un incremento en ambos grupos expuestos a la dieta hipercalórica. En este sentido, también se conoce que, en el postprandio, la concentración de insulina en plasma en ayunas en sujetos con RI, es dos a cuatro veces mayor que en sujetos sanos. Debido a que la hiperinsulinemia es un potente inhibidor de la producción de glucosa hepática (PGH), la resistencia hepática a la acción de la insulina debe estar presente en nuestros modelos experimentales, lo cual explicaría la concentración excesiva de glucosa de segunda fase (pendiente negativa, de la curva de glucosa). Este evento se ha informado en los individuos metabólicamente comprometidos [Campbell, 1988]. Asimismo, este comportamiento se ha reportado en estudios previos en nuestro grupo de trabajo, en donde se mantiene una dieta hiperglúcida durante 2 a 5 meses [Treviño S, 2015; Moroni-Gonzalez D, 2016].

Por otro lado, la fructosamina (1-amino-1-desoxi fructosa) es un marcador de glicación proteica, este de manera similar a la prueba clínica de hemoglobina glucosilada fracción A1c, refleja de manera indirecta el control de glucosa sérica. Sin embargo, la fructosamina proporciona información del nivel glucémico promedio durante 2-3 semanas anteriores, a diferencia de la fracción A1c que otorga el valor promedio de los últimos 3 meses [Nansseu, J. R, 2015]. La fructosamina es una cetoamina estable, formada por el producto de reacción no enzimática de la glucosa y el grupo amino de una proteína (generalmente albúmina, pero incluye globulinas y lipoproteínas). La unión del grupo aldehído del carbohidrato con el aminoácido N-terminal de la proteína forma un producto intermedio reversible, una base de Schiff. Esta por un reordenamiento molecular forma un producto de Amadori estable [Gounden V, 2020]. Por lo tanto, valores elevados de fructosamina indican estados de hiperglicemia, por lo menos durante 3 semanas. De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 2, tanto el grupo HCJ como el HCA presentaron importantes incrementos en este parámetro.

Es conocido que la hiperglicemia e hiperinsulinemia causan modificaciones en la cascada de señalización de la insulina afectando la regulación de factores de transcripción como: las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP) y las proteínas de unión a elementos reguladores de carbohidratos (ChREBP), ambos regulan la expresión génica de la glucólisis y la lipogénesis [Xu X, 2013]. Particularmente, SREBP-1c se

considera el regulador transcripcional maestro de la síntesis de TG y ácidos grasos en respuesta a la estimulación con insulina, induciendo la transcripción de ARNm que codifican enzimas como: ATP-citrato liasa (ACL), acetyl-CoA sintetasa (ACS), acetyl-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintasa (FAS), esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD1) y glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) [Horton JD, 2003]. Mientras que, ChREBP ha sido reconocido como un factor de transcripción que se activa por un nivel alto de glucosa independiente de la insulina, y juega un papel clave en glucólisis y lipogénesis. ChREBP induce la transcripción de los genes: piruvato quinasa de tipo L (L-PK), ACC y FAS [Ma L, 2006]. Ambos redundantes sobre la vía lipogénica, explicando de esta manera el incremento en la concentración de TG en los grupos hipercalóricos mostrados en la tabla 2, correspondiente al panel lipídico sérico. Asimismo, la resistencia a insulina del tejido adiposo genera un flujo importante de AGL a hígado y otros tejidos. Sin embargo, en hígado este hecho favorece la lipogénesis *de novo* de manera redundante (Panel lipídico tabla 2).

En lo que respecta a las fracciones de colesterol, se presentó disminución de HDL, incrementó en LDL y VLDL, estas alteraciones están vinculadas con en el aclaramiento lipídico por la RI. De manera natural, un incremento en el consumo de carbohidratos estimula una mayor síntesis de ácidos grasos, y por ende de triacilgliceroles, movilizados en VLDL, que a su vez son hidrolizadas por la lipoprotein lipasa (la cual es inducida por insulina) en diferentes tejidos, lo que provoca la liberación de ácidos grasos hacia los tejidos blanco; los principales tejidos que llevan a cabo estas acciones son el tejido adiposo que lo resguarda y el tejido muscular que lo utiliza para la obtención de energía [Holvoet P, 2008]. En condiciones de RI, la concentración de AGL incrementa en músculo esquelético, lo que resulta a largo plazo en un menor aclaramiento de las VLDL [Sato K, 2016]. Además, el aumento de AGL en suero conlleva al hígado a sintetizar fracciones más grandes de VLDL que tardan mayor tiempo en ser aclaradas lo que fomenta el incremento de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Adicionalmente, existe una disminución de las HDL en estados de RI y SMet, lo que conlleva a la formación de partículas pequeñas y densas de LDL, que a su vez induce la formación de partículas pequeñas y densas de HDL [Boden G, 2003]. Por lo tanto, el consumo de la dieta hipercalórica hiperglúcida durante dos meses resulta en alteraciones

bioquímicas y metabólicas semejantes al SMet en humanos y que estas alteraciones persisten durante los tiempos cohorte evaluados experimentalmente (Figura 23).

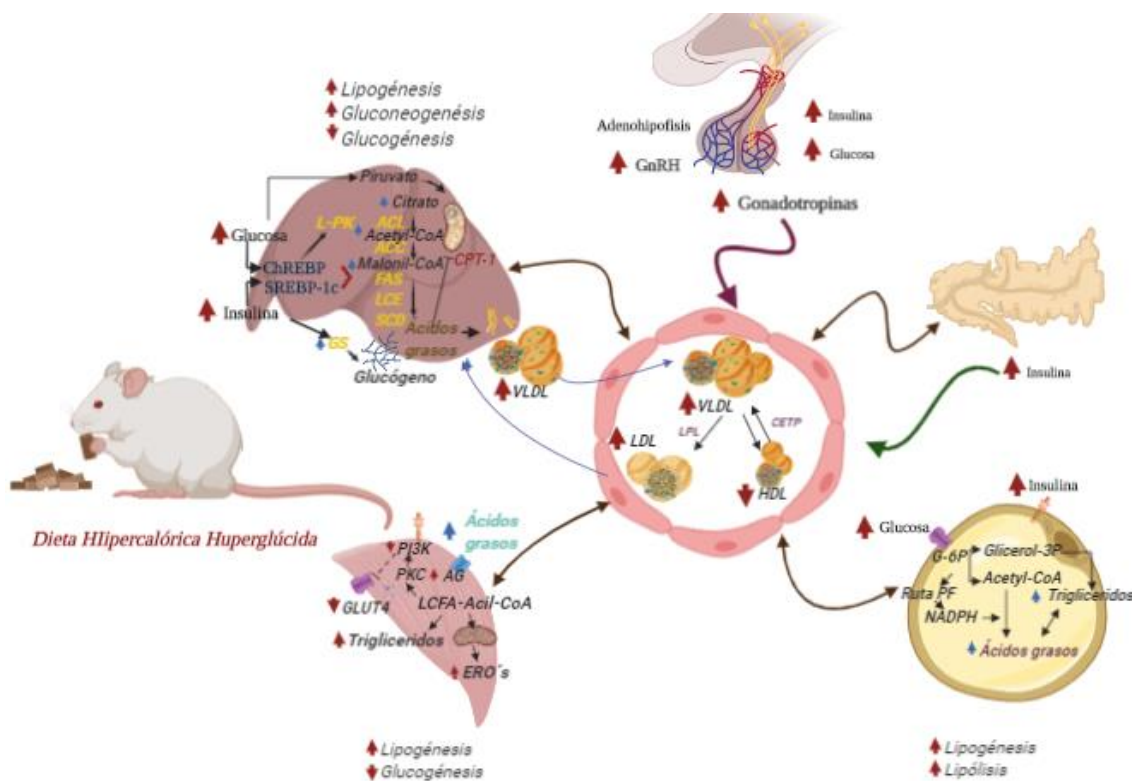


Figura 23. Efecto del consumo de una dieta hipercalórica hiperglúcida en ratas macho Wistar.

Efecto del SMet sobre las hormonas involucradas en el eje Adenohipófisis – Testículo.

a) Impacto del SMet sobre el comportamiento endocrino sérico en sujetos experimentales de edad reproductiva temprana

De acuerdo con la fisiología reproductiva de ratas macho, a partir de los 90 días de edad se presenta una maduración completa en lo que respecta a la regulación del eje HPG, así como en los procesos espermatogénicos [Tony M, 2015]. En este sentido, el objetivo del grupo hipercalórico joven es evaluar si el consumo de una dieta hipercalórica-hiperglúcida a partir de edades tempranas (periodo juvenil y peri-juvenil) tiene un impacto en la dinámica hormonal y en los procesos espermatogénicos en edades reproductivas tempranas que este relacionados con los problemas de infertilidad.

Nuestros resultados ponen en evidencia que el consumo de una dieta hipercalórica-hiperglúcida durante dos meses altera la regulación neuro-hormonal, al haber un incremento en la concentración de FSH y E2, así como, disminución en el nivel de TT y TL (Tabla 3). Diferentes grupos de investigación como los de Grossmann M y Maric C, en 2008 y 2010 respectivamente han presentado evidencia de los mismos comportamientos hormonales en humanos con DM2 [Baccetti B, 2002; Lopez-Alvarenga JC, 2002; Grossmann M, 2008; Maric C, 2010]. Sin embargo, es importante mencionar que los sujetos seleccionados para los distintos análisis fueron mayores a 30 años y en muy pocos casos se consideraron sujetos con edades menores a esta edad, por lo que el impacto de las alteraciones metabólicas sobre la dinámica hormonal en edades tempranas aún no se conoce con claridad.

Las neuronas hipotalámicas encargadas de la liberación de GnRH (neuronas GnRH) integran la información de diferentes señales como neurotransmisores, cambios ambientales y factores nutricionales para responder a los distintos estímulos mediante la regulación de la liberación de LH y FSH [Wierman, 2011].

La modulación de la función reproductiva por el estado nutricional se puede explicar fisiológicamente por interacciones entre factores metabólicos y activadores finales del eje reproductivo [Marie-Hélène, 2012]. El hipotálamo ejerce una influencia primordial sobre dos determinantes principales de la supervivencia de las especies: el equilibrio energético y la reproducción, funciones que están estrechamente vinculadas. Las reservas de energía adecuadas son un requisito previo para el desarrollo puberal normal y para la capacidad reproductiva continua en la edad adulta. Esto se ha evidenciado tanto en humanos como en roedores [Foster DL, 1999].

A nivel cerebral, en la región ventromedial del hipotálamo se encuentra el núcleo arqueado (AR), el cual participa de manera crítica en el mantenimiento de la homeostasis energética. Dentro de la región del AR se encuentran dos grupos de células antagonistas entre sí: las neuronas anorexigénicas que expresan la proopiomelanocortina (POMC) y las neuronas orexigénicas que expresan la proteína relacionada con Agouti (AgRP) / Neuropéptido Y (NPY). Las funciones y señalización de ambos conjuntos neuronales son críticos para mantener el equilibrio energético [Liu CM, 2018]. La dinámica neuronal de las POMC y AgRP / NPY es regulada y modificada por varias hormonas involucradas en hambre-

saciedad, que incluyen leptina, péptido YY (PYY), grelina e insulina [Werther GA, 1987]. Teniendo evidencia sobre los estados hiperinsulinémicos generados por el consumo de la dieta hipercalórica mostrados en la tabla 2, proponemos que sea uno de los factores que puedan tener un papel importante sobre la dinámica hormonal a nivel hipotalámico. Evidencia que sustenta esta idea es la generada por el grupo de investigación de Roa J. en 2012, en donde demuestran que los péptidos derivados de NPY / AgRP y POMC influyen directamente en la excitabilidad de la neurona GnRH, por lo que, a estos grupos neuronales se les consideran como reguladoras de la dinámica de secreción de las neuronas GnRH, y por tanto reguladoras de la conducta neuro-hormonal reproductiva [Roa J, 2012]. Además, estudios electrofisiológicos realizados por Qiu J. y colaboradores en 2014 han demostrado que la insulina excita las neuronas POMC [Qiu J, 2014; Dudek, M.2018]. Por lo tanto, cuadros de hiperinsulinemia como se presentan en nuestro modelo experimental conllevan a la modificación en la dinámica de secreción de GnRH indirectamente como resultado del estímulo excitatorio generado en las neuronas POMC.

En los últimos años, no solo la insulina ha tenido un papel importante en este tema, sino que también el conocimiento sobre diferentes señales periféricas como la grelina y la leptina ha puesto sobre la mesa la posibilidad de una comunicación entre el estado metabólico y el eje gonadal mediado por estas señales. Los procesos de regulación del eje HPG son altamente complejos y multifactoriales, en los cuales no sólo participan los órganos que conforman dicho eje, sino que existe evidencia en la que se demuestra que órganos periféricos tienen un papel importante en dichos procesos regulatorios. Por lo tanto, es necesario realizar diferentes diseños experimentales que permitan evaluar las concentraciones de grelina, leptina, GnRH en nuestros modelos, así como hacer un estudio histológico de la región hipotalámica e hipofisiaria de los cerebros de los grupos hipercalóricos en donde se presente la evidencia de la dinámica de expresión de receptores de las hormonas mencionadas, para reforzar y complementar la hipótesis de que las características neuro-hormonal-metabólicas generadas en el SMet conllevan a un cambio en la regulación del eje HPG.

La GnRH actúa uniéndose a su receptor (rGnRH) en la superficie celular de los gonadotropos de la hipófisis anterior. Activando cascadas de señalización y mecanismos de

transcripción, dependiendo de la variación en la frecuencia pulsátil y concentración de GnRH, estimulando la síntesis y liberación de FSH y LH [Abel MH, 2013; Stamatiades GA, 2018]. Interesantemente, a pesar de que la LH y FSH son secretadas por el mismo tipo neuronal, en nuestros resultados podemos observar que el comportamiento en cuanto a la concentración sérica entre ellas no es similar. Ya que solo se presentó un incremento en los niveles de FSH, mientras que los niveles de LH se mantienen similares a los del grupo NCJ (Tabla 3). Los efectos estimulantes de GnRH sobre la secreción de LH y FSH no son idénticos. La liberación de GnRH ocurre de manera pulsátil, con frecuencias de pulso bajas se estimula una mayor producción de FSH, por lo que su liberación está relacionada directamente con la pulsatilidad de la GnRH, mientras que, frecuencias de pulso altos estimulan una mayor producción de LH [Abel MH, 2013; Padmanabhan, V, 2001; Stamatiades GA, 2018]. En este sentido, planteamos la hipótesis de que las características neuro-hormonales generadas en el SMet estimulan positivamente la secreción de GnRH a nivel hipotalámico lo que resulta en un incremento en la frecuencia de pulsos bajos de esta hormona favoreciendo la producción y liberación de FSH sobre LH, reflejándose así un incremento en los niveles séricos de FSH y manteniéndose lo niveles de LH.

Una vez liberadas las gonadotropinas de la adenohipófisis a circulación, estas interactúan con sus receptores afines (rFSH y rLH) en los testículos. La FSH estimula a las células de Sertoli ubicadas dentro de los túbulos seminíferos para influir los procesos espermatogénicos. Mientras que, la LH estimula la esteroidogénesis en las células e Leydig, principalmente la producción de testosterona, quien tiene un papel muy importante en la promoción de la maduración-función sexual y en la regulación espermatogénica. En este sentido, modificaciones en las concentraciones de las hormonas gonadotrópicas impactan a nivel testicular en los procesos ya mencionados. Una manera de evaluar la respuesta testicular generada por el estímulo de las gonadotropinas es cuantificar los niveles de testosterona en circulación. De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla tres, los niveles de testosterona total y libre disminuyen.

Tanto en el humano como en los roedores aproximadamente el testículo proporciona el 95% de testosterona circulante y el 5% restante es generado en la corteza suprarrenal, y en menor cantidad a nivel cerebral [Rommerts F, 1990]. Esto sugiere que la deficiencia de andrógenos circulantes podría ser debida directamente a una disminución en la producción a

nivel testicular, sin embargo, las concentraciones de este andrógeno a nivel testicular (tabla 4) fueron similares a las del grupo NCJ. Evidencia que hace reconsiderar que el hipoandrogenismo sea ocasionado por una disminución en su biosíntesis a nivel testicular.

Para poder comprender este fenómeno podemos considerar que los niveles de T en circulación están determinados por la tasa de síntesis y la tasa de degradación, los cuales determinan el tiempo de vida media (12 minutos) y por tanto la duración del efecto biológico de esta hormona. Para mantener los niveles fisiológicos debe haber un equilibrio entre ambos procesos. Por lo que se podría realizar un análisis sobre los principales productos de degradación de la testosterona (androsterona y eticolanona) en orina; o bien, evaluar la expresión de las enzimas involucradas en dicho proceso. Siendo las más importantes: 5α y 5β -esteroide reductasa, 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 3α - y 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasas [Rommerts F, 1990]. De esta manera se pondría en evidencia que la disminución de testosterona se debe a una mayor ruta de degradación o bien, se puede considerar algunas rutas metabólicas que no terminan en la biosíntesis de moléculas inactivas.

Dentro de estas rutas se puede seguir la aromatización o reducción del enlace 14 de testosterona dando lugar a 17α -estradiol y 5α -dihidrotestosterona, respectivamente. Una revisión de Vakkat Muraleedharan en 2010, indica que en pacientes con SMet existe un incremento en la cantidad de tejido adiposo visceral, lo cual se caracteriza por presentar una elevada actividad de aromatasa, lo que favorece la biotransformación de testosterona en estrógenos, esto explica parcialmente el mayor nivel de estrógenos séricos en sujetos con SMet y DM2. De acuerdo con los resultados correspondientes al índice de Lee (tabla 2), no se presentan cambios en el porcentaje total de grasa corporal. Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo se ha puesto en evidencia que existe un incremento en la cantidad de tejido graso visceral y gonadal sin modificar el valor porcentual de grasa en los grupos alimentados con la dieta hipercalórica-hiperglúcida [Treviño S, 2015]. Por lo tanto, podemos plantear que en el grupo HCJ existe un incremento de la expresión de la aromatasa y por tanto una mayor biotransformación de T a E2 (ratio testosterona/estradiol, tabla 3), lo que se refleja en una disminución en los niveles séricos de TT y TL, así como el incremento en los niveles de E2 (tabla 3).

Cada vez existe mayor evidencia convincente de que los niveles bajos de TT sérica representan un alto riesgo para el desarrollo de SMet y DM2. La evidencia de los modelos de ratones con receptores de andrógenos inactivos demuestra que la deficiencia de la acción de los andrógenos disminuye la lipólisis y es principalmente responsable de la inducción de la obesidad [Jones TH, 2010; Jones H, 2010; Yanase, 2008]. Así mismo, se plantea la hipótesis de que la TT aumenta la sensibilidad a la insulina y regula el metabolismo de carbohidratos y lípidos en tejidos como el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo [Kelly D, 2013]. Por lo tanto, en condiciones con niveles de TT bajos, como en el caso del grupo HCJ, no sólo impactan en la regulación del eje HPG, sino también en la progresión del SMet (Figura 24).

En un contexto clínico, la Sociedad Endocrina ha definido el hipogonadismo masculino como un síndrome clínico que resulta en la caída de los niveles de andrógenos debido a una falla en su producción a nivel testicular que comprometen los procesos espermatogénicos debido a la interrupción de uno o más niveles del eje HPG [Bhasin S, 2006]. De acuerdo con los criterios de la guía de práctica Clínica de la Sociedad Endocrina y la Guía de la Asociación Europea de Urología (EAU), nuestros grupos experimentales presentan un cuadro clínico de hipogonadismo primario-secundario combinado, lo que da como resultado niveles bajos de TT y niveles variados de gonadotropinas [Bhasin S, 2018; Dohle GR, 2019]. Las guías clínicas contemplan también el análisis del número de espermias, movilidad y morfología, la cuantificación de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG, por sus siglas en inglés). Parámetros que dirigen a ser contemplados como perspectivas futuras para complementar la evidencia del efecto hipogonadal generado por el consumo de dietas hipercalóricas.

b) Impacto del SMet sobre el comportamiento endocrino sérico en sujetos experimentales de edad reproductiva tardía.

Nuestros resultados ponen en evidencia que el consumo de una dieta hipercalórica hiperglúcida tiene un impacto negativo sobre la regulación neuro-hormonal en edades tempranas como se discutió previamente. Este efecto persiste en sujetos en edad adulta alimentados con la dieta hipercalórica hiperglúcida. Se mantienen altos los niveles de FSH y E2 y los niveles bajos de T, pero se observa un efecto sobre los niveles de LH, al disminuir

(tabla 3). De acuerdo con la bibliografía, nuestros resultados son similares con los estudios realizados en humanos [Baccetti B, 2002; Lopez-Alvarenga JC, 2002; Grossmann M, 2008; Maric C, 2010]. Además de los estudios en humanos, también existe evidencia de estas alteraciones en modelos animales, sin embargo, estos se basan en inducción por fármacos, utilizando principalmente Estreptozotocina, Aloxano y en menor frecuencia modelos genéticamente modificados [Hutson JC, 1983; Benitez A, 1985; Seethalakshmi L, 1987; Ballester J, 2004; Aybek H, 2008; Ribeiro DL, 2008; Favaro WJ, 2009; Burul-Bozkurt N, 2010; Mohasseb M, 2011; Pontes DA, 2011; Porto EM, 2011; Bose R, 2012; Kianifard D, 2012; Schoeller EL, 2012, 2014; Trindade AA, 2013; Constanze C, 2018]. Por lo que nuestro trabajo, al menos en nuestro conocimiento, es el primero en evidenciar los mismos efectos al consumir una dieta hipercalórica hiperglúcida. Cabe mencionar que el empleo de estos fármacos tiene como característica la inducción de necrosis de las células β pancreáticas, generando cuadros clínicos de hipoinsulinemia [Wong SK, 2016]. Por lo que podrían presentarse mecanismos fisiopatológicos distintos a los que ocurren en individuos con SMet, RI y DM2, caracterizados por estados de hiperinsulinemia.

Una de las diferencias que se presentan en lo que se refiere a las hormonas gonadotrópicas evaluadas en el grupo en edad adulta es la disminución en los niveles de LH. Anteriormente, se mencionó que la dinámica de síntesis y liberación de FSH y LH es modulada diferencialmente, por lo que no presentan el mismo comportamiento en cuanto a concentración sérica se refiere.

Un novedoso factor crucial que regula el eje gonadotrópico es el sistema de kisspeptina. Este ha demostrado inducir un aumento en la liberación de LH en casi todos los modelos animales estudiados, incluidos los humanos, después de su administración a través de diferentes rutas centrales y periféricas. El efecto estimulante de las kisspeptinas se ejerce tanto en animales machos como en hembras, en casi todas las etapas de la vida (neonatal a la edad adulta tardía) con aumentos claros en los niveles de LH y FSH, aunque la elevación en FSH requiere la administración de dosis mayores de kisspeptinas [Chan YM, 2012; Pinilla L, 2012]. En hembras, el E2 junto con la progesterona y la inhibina ejercen una retroalimentación negativa sobre la secreción de LH, pero cambia para inducir un efecto estimulante en esta fase del ciclo que induce una descarga de LH que provoca la ovulación [Plant TM, 2015]. Sin embargo, en machos, estos picos de liberación de LH no se producen.

La única retroalimentación negativa es la inducida por E2 a nivel adenohipofisario. Por otro lado, la T y su metabolito activo, la DHT, inhiben la liberación de LH y FSH a través de los mecanismos hipofisario e hipotalámico [Casanueva FF, 2018].

La evidencia mostrada por el grupo de investigación de George JT en 2010 indica la capacidad de estas neuronas Kiss para responder a los cambios en los niveles de E2, leptina, mediadores inflamatorios (TNF α e IL-6) e hiperglucemia [George JT, 2010]. Estas neuronas son muy sensibles a los cambios en el medio esteroide sexual; los efectos gonadales se ejercen principalmente a través de rE α , que se expresa en casi todas las neuronas Kiss1 y sus efectos son específicos del núcleo. En consecuencia, en los roedores, los estrógenos inhiben los niveles de ARNm de Kiss1 en el arqueado, inhibiendo así la secreción de LH. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que en condiciones de hiperestrogenismo como es en el caso del grupo HCA y el HCJ (tabla 3), se mantiene inhibida la ruta del sistema kisspeptina lo que conlleva a la disminución de los niveles de LH conforme avanza la fisiopatología del SMet generado por el consumo de la dieta hipercalórica hiperglúcida. Esto, a su vez reduce la estimulación gonadal e inhibe la liberación de T causando así un estado de hipogonadismo primario-secundario combinado persistente. Además de las consideraciones ya mencionadas en el grupo joven (Figura 24).

Un punto importante para considerar es que la vía androgénica suprarrenal contribuye aproximadamente el 1% de los andrógenos circulantes en condiciones fisiológicas, además de que tienen un papel importante como precursores en sangre de testosterona y estrógenos. Dentro de estos, se encuentran la dehidroepoandrosterona (DHEA), sulfato de DHEA (DHEAS), androstenediol, androstenediona (A4), 11 β -hidroxiandrostenediona (11OHA). Estos dos últimos se biotransforman en 11-ceto-testosterona (11KT) y 11-ceto-dihidrotestosterona (11KDHT) mediante la actividad de la 11 β -hidroxilasa (CYP11B1) suprarrenal, los cuales presentan una alta actividad androgénica similar a la de la testosterona y DHT. Así mismo la A4 y la testosterona pueden convertirse en estrona (E1) y estradiol (E2), respectivamente, por la aromatasas (CYP19A1). Vías que puede estar teniendo un papel importante en la desregulación neuroendocrina generada por el consumo de la dieta hipercalórica-hiperglúcida, por lo que debe de ser evaluada para considerar el impacto que tienen las suprarrenales en esta desregulación [Turcu A, 2014].

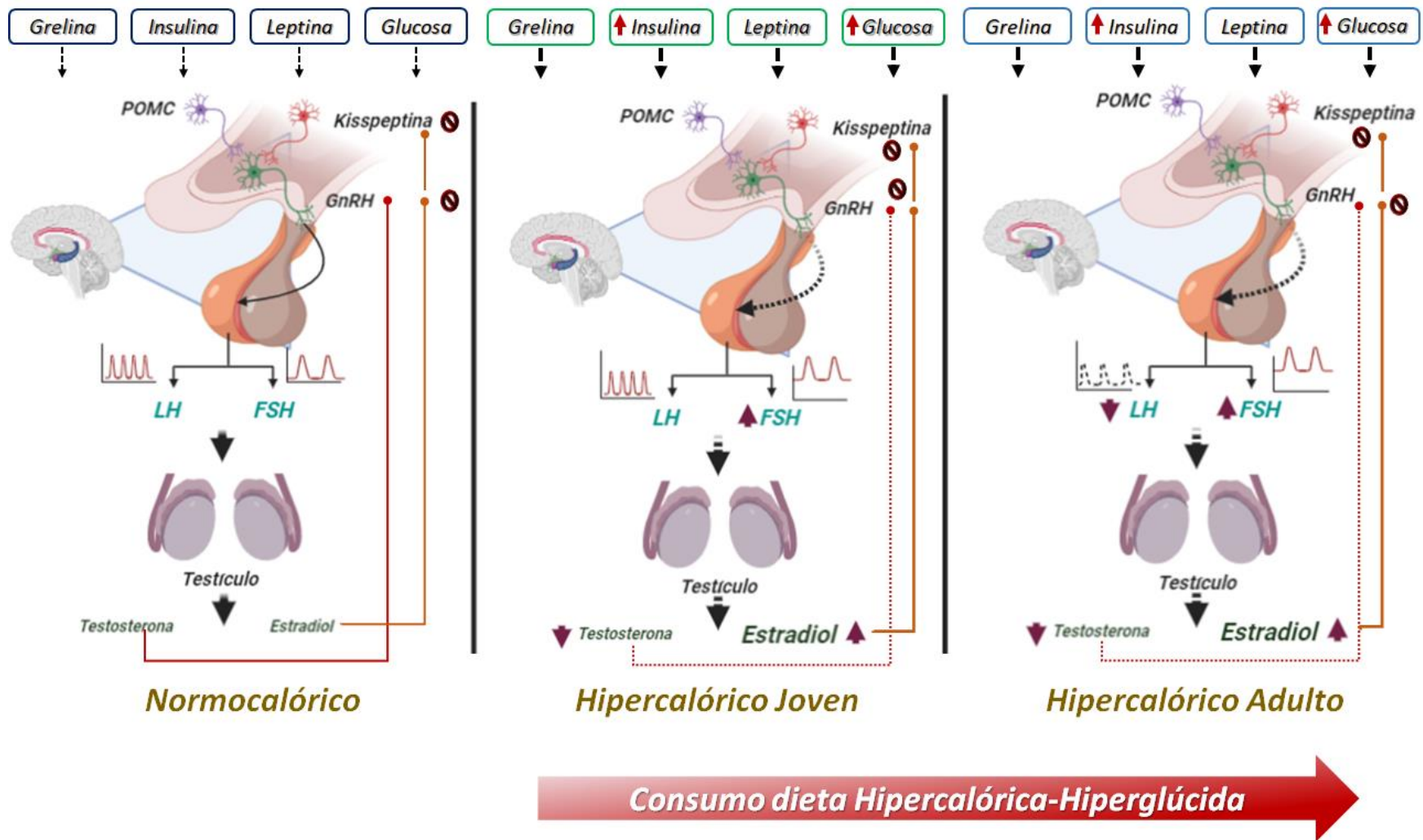


Figura 24. Efecto del consumo de una dieta hipercalórica-hiperglúcida en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo en edad reproductiva temprana y adulta.

c) Impacto del SMet sobre el comportamiento endocrino gonadal en sujetos experimentales

El órgano blanco de las hormonas gonadotrópicas es el testículo. Dicho órgano es el encargado de la producción de células sexuales y de la síntesis de hormonas masculinas, siendo la T la principal. Ambos procesos están regulados por la señalización generada por las hormonas del eje. La evidencia de cambios en los niveles circulantes de estas hormonas sugiere que existe un impacto a nivel testicular no sólo modificando la dinámica hormonal, sino también alterando los procesos de proliferación, diferenciación y maduración espermática.

En lo que respecta a la producción hormonal, las células de Leydig son altamente especializadas para la producción de T, ya que expresan toda la maquinaria génica necesaria para su producción. Durante la estimulación de la LH, incrementa la producción de hormonas esteroideas [Miller WL, 2011]. La evidencia obtenida de la disminución en los niveles circulantes de LH en el grupo HCA, permite suponer que la síntesis de hormonas esteroideas a nivel testicular podría disminuir, acción que se correlaciona con las modificaciones en la concentración de T. Mientras que, en el caso del grupo HCJ, los niveles menores se podrían relacionar con biotransformaciones extragonadales por los mecanismos propuestos anteriormente.

El sustrato base esencial para la síntesis de hormonas esteroideas es el colesterol, el cual comienza a transformarse con ayuda de un pool de enzimas mitocondriales y citoplasmáticas. En un primer paso, las moléculas de colesterol son transportadas a la membrana mitocondrial interna por la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR). En seguida, el sistema de escisión de la cadena lateral compuesto por la enzima CYP11A1 (P450_{scc}) convierten el colesterol en pregnenolona, luego, se convierte a través de la vía delta 5 en 17 α -hidroxipregnenolona (17OHPreg) y dehidroepiandrosterona (DHEA). Ambas conversiones son compatibles con la enzima CYP17A1 (P450_{c17}). Luego, la DHEA se transfiere paso a paso a T a través de androstenediona. La T puede convertirse en DHT, la cual es catalizada por la 5 α -reductasa [Miller WL, 2011]. Con las evidencias previas de que el consumo de la dieta hipercalórica modifica los niveles de colesterol LDL y HDL, así como los niveles de LH, se sugiere que los procesos de síntesis hormonal estén alterados por la

modificación en la disponibilidad del colesterol y/o por el efecto de señalización generado por la LH en las células de Leydig. De acuerdo con esto, en la tabla 4 se muestra que en el grupo hipercalórico adulto se presentan niveles altos de colesterol testicular.

Estudios *in vitro* por el grupo de investigación de Eacker SM y colaboradores han puesto en evidencia que modificaciones en los niveles de AMPc generados en la interacción entre la LH y su receptor, así como al incrementar los niveles en los cultivos celulares desencadenan la regulación positiva de síntesis de *novο* de colesterol mediada por SREBP2. Asimismo, la señalización de SREBP2 permite la expresión del receptor de LDL (LDL-r) y de la proteína transportadora SR-B1, que favorecen la absorción de colesterol del espacio extracelular. Además, ponen en manifiesto que la T actúa como un regulador negativo sobre la expresión de genes biosintéticos de colesterol, proporcionando un punto adicional de la regulación en las células de Leydig [Eacker, SM, 2008]. Por lo que, nuestros resultados sugieren que el consumo de una dieta hipercalórica puede modificar las vías de síntesis de *novο* de colesterol, así como la recaptura del medio extracelular, lo que repercute en la disponibilidad de colesterol en las células de Leydig. En este sentido, se tienen que realizar diferentes estudios enfocados en las rutas esteroideogénicas, las enzimas participantes, los productos intermedios y finales de las rutas de biosíntesis principales y alternas dentro de las células de Leydig, así como los mecanismos de síntesis de *novο* de colesterol; receptores y transportadores involucrados en la internalización de esta molécula a las células, para comprender y dilucidar el impacto del SMet en la dinámica hormonal a nivel testicular, así como el papel que estos procesos tienen con respecto al decremento de los niveles séricos de testosterona.

Al cuantificar la concentración de la hormona previa a la formación de T, androstenediona, como se muestra en la tabla 4, interesantemente no se encontraron cambios significativos. La modificación en los niveles de hormonas gonadotrópicas impacta en la biosíntesis de andrógenos a nivel testicular, sin embargo, estas hormonas en conjunto tienen un papel fundamental como reguladores de los procesos de proliferación, diferenciación y maduración espermática, por lo que, la variación en su disponibilidad y señalización comprometen la efectividad del proceso espermatogénico, y por tanto la eficacia de los procesos reproductivos. El organismo, como respuesta de regulación, mantiene los niveles

de andrógenos en testículo, a expensas de una disminución en los niveles de estos a nivel sanguíneo [Eacker, SM, 2008].

A nivel testicular, la síntesis de estrógenos se lleva a cabo en cantidades muy pequeñas, en donde la androstenediona se convierte en estrona y estradiol, a través de la actividad aromatasa (CYP19A1). De acuerdo con la evidencia de nuestros resultados en lo que se refiere al porcentaje de biotransformación de T a E2 y a los niveles de E2 gonadal mostrados en la tabla 4, el consumo de una dieta hipercalórica tiene un efecto positivo sobre los procesos de aromatización de andrógenos, en donde se favorece la producción de E2 en ambos grupos hipercalóricos. Diversos trabajos han puesto en evidencia que la mayor parte de E2 circulante se deriva de la aromatización periférica de la T en el tejido adiposo [Simpson ER, Longcope C, 1969]. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el incremento en los niveles de estrógenos también se lleva a cabo a nivel testicular y no sólo a nivel periférico. Efecto que podría impactar directamente en el proceso espermatogénico.

Efecto del SMet sobre la expresión de receptores hormonales a nivel testicular

La interacción entre las hormonas y sus receptores depende del número de receptores, la concentración de la hormona circulante y la afinidad de la hormona por el receptor. En general, la afinidad de los receptores hormonales no cambia y, por lo tanto, la respuesta biológica depende de la concentración de la hormona y del número de receptores. Este último mecanismo es una parte importante de la función endocrina y ocurre a través de la regulación positiva o negativa del número de receptores mediante un proceso conocido como desensibilización de los receptores. Esto ocurre al aumentar o disminuir la síntesis del receptor, mediante la internalización de los receptores de membrana después de la unión del ligando, o al desacoplar el receptor de su vía de transducción de señales (desensibilización) [Nussey S, 2001]. Hasta el momento se han analizado los niveles circulantes de las hormonas, y a partir de esto se han propuestos distintos mecanismos por los cuales se explicaría el efecto observado a nivel testicular, por lo que, lo siguiente en discutir es la expresión de cada uno de los receptores de las hormonas que tienen efecto a nivel gonadal para confirmar los efectos observados.

En los testículos, no solo las células de Sertoli expresan el receptor de FSH, sino que las células espermáticas también lo hacen, pero en menor número (Figuras 11 A, B, D y E). Algo muy importante a considerar, es que la tasa de expresión del rFSH depende de la etapa del ciclo del epitelio seminífero, siendo los niveles más altos durante las etapas XIII-II y más bajos en las etapas VII-VIII [Heckert LL, 1991]. Como resultado, hay una activación cíclica de las vías de señalización mediadas por FSH. Por lo que, hay que tener presente que los túbulos analizados en este trabajo fueron aquellos que estuvieran en etapa I-VIII. La señalización de la FSH en las células de Sertoli tiene una estrecha relación con la adecuada maduración, proliferación, diferenciación y sobrevivencia de las células precursoras de los espermatozoides [Mruk DD, 2010; 2012]. Por lo tanto, modificación en la biodisponibilidad de la FSH repercute en la dinámica de las células de Sertoli, las cuales se reflejan en la actividad de los procesos proliferativos espermáticos [Smith L B, 2015].

Nuestros resultados obtenidos del análisis densitométrico (Figura 11) muestran una tendencia a la disminución en el grupo HCJ (Figura 11C), mientras que, en el HCA (Figura 11F) se muestra una disminución significativa en términos estadísticos. Considerando que se presente un efecto biológico con estos niveles de expresión, no se presenta un efecto de retroalimentación negativa en las células testiculares en edad reproductiva joven. Por el contrario, en la edad adulta ocurre este efecto de retroalimentación por lo que se presenta una regulación a nivel testicular con la finalidad de que los niveles elevados de FSH no tengan un impacto sobre los procesos espermatogénicos. Para confirmar esta idea es necesario realizar un análisis dirigido a las rutas de señalización generadas por la interacción FSH-rFSH en las células testiculares que expresan dicho receptor, así como evaluar el efecto biológico del resultado de la activación de las vías de señalización, considerando marcadores del ciclo celular y de proliferación celular.

Cuando incrementan los niveles de FSH o su resultante de la señalización vía proteínas G que es el AMPc, se induce transitoriamente la expresión de un inhibidor del factor estimulante río arriba (USF, por sus siglas en inglés) en células de Sertoli llamado ID2 (inhibidor de unión y diferenciación de ADN) para causar retroalimentación negativa sobre los niveles del r-FSH [Viswanathan P, 2009]. Efecto que puede estar pasando en los grupos experimentales hipercalóricos, al disminuir la densidad del receptor, como se observa en la figura 11. Distintos estudios realizados en animales knockout o con modificaciones en el

receptor han puesto en evidencia que la activación del r-FSH es capaz de regular al menos cinco vías de señalización intracelular específicas: AMPc– PKA, MAPK, PI3K -AKT-mTOR-p70S6K, Ca^{2+} y fosfolipasa A2. Señales que culminan en efectos como lo son: 1) determinación del número de células de Sertoli y, por lo tanto, su capacidad para mantener la espermatogénesis; 2) proliferación y diferenciación de las células de Sertoli; 3) regulación de los genes estructurales implicados en la organización de las uniones célula-célula; 4) regulación de los genes necesarios para el metabolismo y el transporte de sustancias reguladoras y nutritivas a las células germinales [Oduwole OO, 2018].

No sólo la FSH tiene un efecto directo sobre las células de Sertoli, sino también se ha demostrado que la T lo tiene. En conjunto ambas hormonas inician vías de señalización que contribuyen al apoyo de la espermatogénesis: i) la elevación de Ca^{2+} en las células de Sertoli; ii) aumentar de forma independiente el número de células de Sertoli [Ramaswamy S, 2000], aunque la FSH es aparentemente más efectiva [Johnston H, 2004]; iii) efecto sinérgico en la regulación del factor de transcripción CREB (de sus siglas en inglés, CAMP responsive element binding protein), el cual proporciona los factores necesarios para mantener la espermatogénesis; iv) actuar en oposición en las vías de señalización específicas para apoyar la espermatogénesis [Shupe J, 2011].

En el caso de una alteración en las cascadas de señalización, cómo es probable que ocurra en el grupo HCJ y más evidentemente en el grupo HCA, las uniones correctas de adhesión de células germinales-células de Sertoli podrían no formarse y las células germinales se liberarían prematuramente. Por lo tanto, de acuerdo con lo mencionado, en el grupo experimental joven al no haber evidencia del proceso de retroalimentación negativa, se presenta una sobre activación de la vía de señalización que se refleja en el análisis histológico (Figura 17), con la variación en el número de células de Sertoli (Figura 20), y la disminución de los niveles de testosterona modificando el efecto sinérgico con la FSH (efecto probable en el grupo HCA), lo que resulta en la disrupción en la continuidad e integridad del túbulo seminífero, al modificarse las uniones célula-célula, siendo esto más evidente en el grupo HCA (Figuras 18 y 19), y encontrando células inmaduras en espacio luminal en el grupo HCJ, como se muestra en la fotomicrografías de la figura 17.

Por otro lado, la LH ejerce sus efectos sobre la espermatogénesis principalmente a través de la promoción de la secreción de T en las células de Leydig, con el andrógeno

actuando como un factor paracrino dentro de los testículos. Los efectos de los andrógenos están mediados por el receptor androgénico (rA). En los testículos, se expresa en células de Sertoli, Leydig, células peritubulares (CPT), células germinales, músculo liso y células endoteliales vasculares (Figura 12). Su expresión aumenta progresivamente durante las etapas II-VII y luego disminuye bruscamente durante o inmediatamente después de la etapa VII para apenas ser detectable en las etapas IX-XIII [Shan LX, 1995].

Los gráficos C y F de la figura 12 muestran que, tanto en el grupo HCJ como en el HCA se presenta un incremento en la expresión del rA en respuesta a la disminución de los niveles de T. En distintos experimentos en donde se modifican el receptor o se suprimen o disminuyen los niveles de T; tal y como es el caso que se presenta en el grupo HCJ (tabla 4), da como resultado alteraciones importantes de la espermatogénesis. Primero, se interrumpe la integridad de la barrera hematotesticular (BHT), lo que ocasiona que las células germinales meióticas y posmeióticas, anteriormente en un entorno especializado aislado, se expongan a ataques autoinmunes y factores citotóxicos [Meng J, 2011], incrementando los procesos apoptóticos; resultados que ponemos en evidencia en las figuras 21 y 22 con el uso de DAPI y NA, respectivamente. Segundo, la conversión de espermátidas redondas en espermátidas alargadas se inhibe debido a defectos en la adhesión celular, que causan el desprendimiento prematuro de las espermátidas redondas de las células de Sertoli. Efecto mostrado en nuestros resultados histológicos (Figura 17) [O'Donnell L, 1996; Holdcraft RW, 2004].

Además, hemos mencionado que la T puede convertirse en DHT, la cual es catalizada por la 5 α -reductasa y que esta se considera la forma activa. Al encontrar disminuidos los niveles de T en el grupo HCJ, se podría pensar que, como sistema de compensación los procesos de reducción de la T se verían favorecidos, para comprobar esta teoría se analizaron los niveles de expresión de la P450-Red, y efectivamente se presentó un incremento en el grupo HCJ como se aprecia en la figura 16C.

La expresión de esta enzima se encuentra principalmente en las células de Leydig y Sertoli, y en menor cantidad en las células germinales [Viger RS & Robaire B, 1995]. El grupo de trabajo de Patris K y O'Donnell L en 2003 puso en evidencia que la expresión de la P450-Red está regulada por la FSH y la T usando un modelo *in vivo* [Pratis K, 2003]. La T ejerce una regulación negativa sobre la expresión de la reductasa. Por lo tanto, una disminución en los niveles de este andrógeno, como es en el caso de nuestro modelo con el

consumo de la dieta hipercalórica, probablemente conduce a un aumento en el metabolismo de la testosterona al metabolito más potente, la DHT. De esta manera, cuando los niveles de testosterona circular son bajos y no se puede mantener la producción de espermias, la amplificación del estímulo androgénico a través de la conversión de T a DHT permitiría niveles bajos continuos de los procesos espermatogénicos. Asimismo, en el mismo trabajo se pone en evidencia que la FSH no solo favorece la expresión de la reductasa, sino que incrementa su actividad, de esta manera se mantienen los niveles de DHT necesarios para continuar de forma eficiente con la espermatogénesis [Pratis K, 2003]. Por lo que esta gonadotropina también favorece el incremento de la expresión de la reductasa.

En lo que respecta a la ruta de biosíntesis de esteroides, la androstenediona y la T pueden ser convertidas en estrona y 17β -estradiol, respectivamente, mediante la actividad de la aromatasa citocromo P450 (P450-Arom). [Conley A, 2001; Lambard, 2005]. La capacidad de los testículos para convertir los andrógenos irreversiblemente en estrógenos está relacionada con la presencia de este complejo enzimático microsómico. Su expresión no solo es en las células de Leydig sino también en las células germinales y especialmente en las espermátidas alargadas como se puede apreciar en la figura 15 [Carreau, S, 2003].

En 2003 el grupo de Carreaus y colaboradores, empleando trabajos de inmunolocalización demostraron que las células germinales de ratas macho adultas representan una nueva fuente de estrógenos, ya que la expresión de la aromatasa es mayor en los espermaticitos en paquiteno que en las espermátidas redondas y en los espermatozoides. Por el contrario, la actividad de la aromatasa es mayor en las células germinales haploides que en las células germinales más jóvenes [Levallet J, 1998; Carreau, S, 2003]. Además, en la rata adulta, la transcripción de aromatasa varía según las etapas del epitelio seminífero, observándose un máximo entre las etapas XIII y II [Bois C, 2010].

A partir de estudios *in vitro* realizados con diversas células testiculares purificadas de ratas adultas, el grupo de investigación de Bourguida S en 2003, ha demostrado que la expresión del gen de aromatasa se expresa de forma constitutiva y está controlada por diversos factores. Entre ellos, las gonadotropinas, el AMP cíclico, las hormonas esteroideas, factor de crecimiento transformante (TGF) y factor de necrosis tumoral (TNF), junto con otros factores paracrinos probablemente de origen de las células de Sertoli y de células germinales [Bourguiba S, 2003]. Así, el incremento en los niveles de FSH conllevan al

incremento en los niveles de AMPc provocando un aumento en la expresión de P450-Aro, resultados que concuerdan con lo encontrado en nuestros grupos experimentales (Figura 15).

En células germinales, los andrógenos y principalmente la señalización generada por la interacción con el rA actúan como fuertes moduladores de la expresión y actividad de los genes de la aromatasas [Bourguiba S, 2003]. Por lo tanto, al presentar un incremento en la expresión de los receptores androgénicos en ambos grupos hipercalóricos analizados (Figura 12), sugiere que favorecen la expresión de la P450-Aro (Figura 15 C y F).

En las células germinales, el E2 regula negativamente la expresión del gen de aromatasas probablemente a través de la señalización generada por los rE's, cuya expresión es mayor en las etapas VII a XIV del ciclo del epitelio seminífero [Saunders P.T.K, 2001]. Debido a las nuevas evidencias sobre la importancia de los estrógenos, ahora está claro que no solo las células de Leydig y Sertoli pueden expresar la P450-Aro, sino que también las células germinales tanto meióticas como postmeióticas. Lo que sugiere que, los E2 podrían tener un papel paracrino y / o autocrino en la función y maduración de las células germinales, y, por lo tanto, en la modulación de la espermatogénesis.

Como las hormonas esteroideas son liposolubles, son capaces de difundir dentro y fuera de las células atravesando la membrana celular con relativa facilidad [Kraus WL, 1995; Nilsson S, 2001]. Debido a ello, la mayor parte de los efectos de los E2 en sus órganos blanco se deben a la cadena de eventos celulares conocida como "señalización estrogénica", la cual es una vía de transducción celular que inicia con la activación de los rE's. Con la evidencia mostrada en las tablas 3 y 5, donde se aprecian estados de hiperestrogenismo tanto a nivel sérico como a nivel testicular se puede intuir que la señalización estrogénica se ve favorecida en los grupos experimentales hipercalóricos.

Para confirmar o descartar esta idea se evaluó la expresión de los rE's tipo α y β , como se muestra en la figura 13. Interesantemente, los resultados obtenidos con el análisis densitométrico se encontró que el consumo de una dieta alta en carbohidratos repercute en la dinámica de expresión de ambos receptores estrogénicos, dependiendo de la edad reproductiva del animal. En el caso del grupo HCJ disminuyó la expresión del rE α , siendo las células espermáticas correspondientes a espermatogonias, espermátocitos primarios y secundarios los más afectados (Figura 13D). Mientras que, en lo que respecta a la expresión del rE β se presentó una disminución localizada principalmente en la zona de las espermátides

y espermatozoides (Figura 13K). Por otro lado, en el grupo HCA disminuyó la expresión del rE α , principalmente en los espermátides y espermatozoides (Figura 13J). No hubo diferencias significativas en la expresión del rE β , sin embargo, se nota un cambio en los niveles de expresión en las distintas células, es decir, se muestra mayor expresión en la región donde se localizan los espermatoцитos primarios y secundarios, mientras que, se observa una disminución en la expresión de las células correspondientes a espermátides y espermatozoides (Figura 13L). La disminución de la expresión de estos receptores se podría explicar como un mecanismo de compensación negativa, en donde al existir un exceso de E2 a nivel testicular se disminuye la expresión de los receptores, de esta manera se mantiene regulada la señalización estrogénica y por tanto la regulación de los procesos de proliferación, diferenciación maduración y supervivencia celular espermática.

En ausencia del ligando, los rE's permanecen inactivos, ya que se encuentran unidos a proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins), quienes los mantienen en una conformación que oculta los péptidos señal de localización nuclear. La unión del receptor con la hormona correspondiente provoca cambios de conformación separando las proteínas de choque térmico, liberando señales de localización nuclear, permitiendo su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, el complejo hormona-receptor se une a secuencias específicas de ADN, que se denominan elementos de respuesta a la hormona o HRE (hormone response element). Cuando los receptores nucleares se unen HRE reclutan un gran número de proteínas o correguladores transcripcionales: coactivadores o correpresores, que facilitan o inhiben la transcripción de los genes blanco [Gruber CJ, 2004].

Los rE α y rE β tienen funciones específicas, diferente especificidad de ligando y actividad transcripcional, por tanto, no representan dos isoformas redundantes del mismo receptor, sino dos diferentes herramientas para señalización estrogénica, con propiedades funcionales específicas. El rE α tiene una afinidad 5 veces mayor por el estradiol que los rE β *in vitro*. [Dumasiak K, 2015]. En particular, el rE β muestra una actividad transcripcional más débil en comparación con rE α . Esta diferencia se debe a la presencia de diferentes isoformas del rE β , que puede modular la señalización de E2 usando diferentes vías y conducir a diferentes impactos en la regulación de genes diana [Heldring N, 2007]. Además, debe considerarse que la coexpresión de rE α y rE β en la misma célula determina una señalización cruzada compleja, que finalmente produce el efecto antagonista ejercido por rE β sobre la

transcripción dependiente de $rE\alpha$, es decir, el $rE\beta$ disminuye la sensibilidad del $rE\alpha$ al estrógeno, actuando como un regulador fisiológico de los efectos proliferativos del $rE\alpha$. Por lo tanto, la presencia/ausencia de subtipos del rE , junto con la señalización resultante en la activación de ambos receptores determinará la capacidad de una célula para responder a diferentes ligandos, así como la regulación de la transcripción de diferentes genes objetivo [Heldring N, 2007].

De acuerdo con lo mencionado, el hecho de encontrar cambios en la dinámica de expresión de los rE 's en los distintos tipos celulares, como se comentó anteriormente podría estar relacionado con los efectos de muerte celular encontrados en los espermatoцитos, como mostró el análisis con la tinción de naranja de acridina y DAPI (Figuras 21 y 22); y con los cambios en los procesos proliferativos en las etapas meióticas mostrados en el análisis histológico. Los procesos apoptóticos se han relacionado con los estrógenos, ya que, dentro de las proteínas que se activan durante la señalización estrogénica generada principalmente por el $rE\beta$ y el receptor de membrana GPR30, se han encontrado a distintos marcadores apoptóticos como lo son: BAX, FAS y FASL, en espermatoцитos y espermátidas principalmente, al activar la cascada de señalización EGFR / ERK / c-jun, que a su vez, desencadena una vía mitocondrial apoptótica que implica un aumento en la expresión de Bax y una reducción concomitante de los niveles de genes de ciclina A1 y B1 [Carreau S, 2011; Chimento A, 2011].

Estudios realizados en roedores y primates han demostrado que la espermatogénesis está bajo el control de los estrógenos a diferentes niveles. Por ejemplo, se demostró que la exposición a una dosis baja de E2 acelera la aparición de espermatogénesis [Gancarczyk M, 2004]. Otros estudios han demostrado una mejora en la espermatogénesis en roedores tratados con E2 [Pak TR, 2002]. También hay evidencia de la participación directa de los estrógenos en la prevención de la apoptosis de células germinales, como lo demuestran los efectos del E2 en cultivos de túbulos seminíferos adultos humanos [Pentikainen V, 2000]. La exposición de ratas macho adultas a una dieta rica en fitoestrógenos altera la espermatogénesis al aumentar la apoptosis de las células germinales [Assinder S, 2007]. Una disminución significativa del número de espermátidas redondas y alargadas, pero no de espermatogonias y espermatoцитos, en ratones ArKO demuestra claramente el papel de los

estrógenos en la regulación de los factores de supervivencia en las espermátidas [Robertson KM, 1999]. Todas estas evidencias reafirman los resultados obtenidos en nuestro trabajo. Distintos estudios como los del grupo de investigación de Fisher JS, Oliveira CA y colaboradores, han puesto en evidencia que el $rE\alpha$, no sólo se expresa en células testiculares, sino que también se localiza en conductos eferentes, en la región proximal, el cuerpo, la cauda del epidídimo y vesícula seminal [Fisher JS, 1997; Oliveira CA, 2004; Rochira V, 2000], jugando un papel clave en el mantenimiento espermático y composición del líquido seminal al modular los procesos de reabsorción de líquidos. Por lo que los estrógenos no solo tienen un papel crucial en los procesos de proliferación y maduración espermática, sino que también en la actividad, vitalidad, movilidad, sobrevivencia y funcionalidad espermática. Con esta idea se requieren más estudios en donde se ponga en evidencia el papel e impacto del estado hiperestrogénico generado por el consumo de dietas hipercalóricas en la funcionalidad espermática y la eficiencia reproductiva.

Impacto del SMet sobre la estructura y celularidad de los túbulos seminíferos

La evidencia de cambios en los niveles circulantes de LH, FSH, testosterona y estradiol, sugiere que existe un impacto a nivel testicular no sólo modificando la dinámica hormonal, sino también alterando los procesos de proliferación, diferenciación y maduración espermática. La espermatogénesis tiene como finalidad la producción de gametos masculinos, que tiene lugar en los túbulos seminíferos. Este es un proceso multifacético que da como resultado la formación del tipo de célula más altamente especializado en el cuerpo humano, el esperma.

El epitelio seminífero se encuentra en constante renovación a medida que las nuevas generaciones de células germinales comienzan a diferenciarse en la lámina basal y maduran. Los espermatozoides se liberan de la parte apical a la luz tubular [Ramaswamy S, 2015]. Las células de Sertoli son objetivos de la FSH y la T, estas hormonas generan estímulos en la regulación paracrina de la espermatogénesis y coordinan la expresión génica en las células germinales. La FSH afecta principalmente a las células germinales premeióticas, mientras que la T actúa durante la diferenciación de las células germinales masculinas [Bremner WJ,

1998; Fok KL, 2014; Ramaswamy S, 2015]. De acuerdo con la evidencia existente que se tiene hasta el momento, la modificación en los niveles de FSH (al verse incrementados) y en los de T (al verse disminuidos) modifican el equilibrio entre el mantenimiento, auto renovación y diferenciación de las células germinales. Alteraciones que se reflejan en el análisis histológico, siendo el grupo experimental en edad reproductiva joven el más afectado, ya que se observaron acumulados celulares en la zona de la luz tubular de diferentes grados de maduración (espermatoцитos primarios y secundarios). Condiciones que generan un incremento del área celular de los túbulos seminíferos y una reducción en la luz tubular en el grupo joven y un incremento en el contado diferencial de espermatoцитos primarios y secundarios, mientras que el número de células de Sertoli disminuyó (Figuras 17-20).

Los resultados del grupo de investigación de O'Shaughnessy PJ y colaboradores obtenidos al usar tratamientos con FSH y ratas hipofisectomizada, ponen en evidencia que la FSH aumenta el número de células germinales varias veces, al incrementar el número de espermatogonias y espermatoцитos, es decir, la mitosis y meiosis, pero no la maduración de las células germinales [Allan CM 2001; O'Shaughnessy PJ, 2010]. Asimismo, trabajos de Ramaswamy S en 2015, concluyen que la FSH es esencial para el desarrollo puberal completo de las células de Sertoli, y que sólo tiene un impacto cuantitativo en la espermatogénesis lo que resulta en una disminución de la producción de esperma en el adulto [Ramaswamy S, 2015]. Estas características se presentaron en nuestros modelos experimentales, de esta manera se explica cómo en el grupo experimental en edad reproductiva temprana es más susceptible a la modificación en los procesos espermatogénicos en comparación con el grupo en edad reproductiva tardía.

La LH y la T también son fundamentales en los procesos espermatogénicos. La evidencia obtenida ha sido a través del uso de animales transgénicos con mutaciones que ocasionan la pérdida de función de la LH- β o del rLH; la ablación química de las células de Leydig de roedores adultos *in vivo* y el tratamiento con etano di metano sulfonato (EDS); en donde se ha encontrado que la disminución y/o privación de LH, conduce a la detención de la espermatogénesis, pero interesantemente, sin impedir los procesos de meiosis I [Franca LR, 1998; El Shennawy A, 1998]. Mientras que, con la disminución o ausencia de T en tiempos prolongados se mantiene el número de espermatogonias, pero la espermatogénesis

se detiene durante la meiosis II, lo que se refleja en una disminución en la producción de espermatozoides [Chang C, 2004; De Gendt K, 2004].

En condiciones fisiológicas, los niveles de T testicular no se asocian con la producción de espermatozoides debido a que en el testículo el nivel de este andrógeno se mantiene muy encima del límite necesario para estimular la espermatogénesis, con la finalidad de mantener los niveles circulantes de T, en un punto establecido que sea óptimo para la función de los tejidos no gonadales dependientes de andrógenos, como en el músculo esquelético, el cerebro y el tracto reproductor masculino [Ramaswamy S, 2015]. Sin embargo, en condiciones crónicas, en donde la disminución de T persiste, se comprometen los niveles testiculares, y, por ende, el inicio de la espermatogénesis, por lo que el mecanismo de adaptación de este tejido es disminuir los niveles circulantes, pero mantener los testiculares, como se observa en nuestros resultados (Tabla 3).

Otro de los efectos observados en el análisis estructural de la histología testicular, fue la acumulación de grupos celulares en la zona de la luz tubular. Trabajos de O'Donnell L en 2006 exponen que la supresión de T y alteración en los niveles de las gonadotropinas inhibe el proceso de espermiación (el cual es dependiente de T), ocasionando la retención de células inmaduras en los túbulos seminíferos, siendo las espermátidas los tipos celulares más afectados [Ramaswamy S, 2015; O'Donnell L, 2006]. También, estos trabajos ponen en evidencia que, los espermatoцитos primarios y las espermátides redondas exhiben los primeros signos de degeneración celular (apoptosis) y este efecto es altamente específico en la etapa VII / VIII del ciclo del epitelio seminífero. Efecto que se evidenció con las fotomicrografías de los tejidos marcados con DAPI y naranja de acridina (Figuras 21 y 22).

Dentro de las hormonas reguladoras de la espermatogénesis también se encuentran los estrógenos, siendo el E2 el de mayor importancia. Su papel tiene como objetivo controlar los procesos apoptóticos, los de maduración y diferenciación de las células germinales [Carreau S, 2011]. Asimismo, se ha puesto en evidencia con modelos genéticamente modificados que los estrógenos inhiben el desarrollo, el crecimiento y la función de las células de Leydig, resultando en la supresión de la producción de andrógenos, así como el incremento de apoptosis en espermátides, por lo que se sugiere que los estrógenos alteran el proceso espermatogénico al detener el desarrollo de espermatoцитos [O'Donnell L, 2001].

Por lo tanto, nuestros resultados indican que los estados de hiperestrogenismo y el hipogonadismo impactan sobre los procesos espermatogénicos, al favorecer la meiosis y mitosis I, incrementando el número de los tipos celulares que participan en estos eventos (espermatogonias y espermatocitos). Sin embargo, se incrementan los procesos apoptóticos en espermátides (Figura 25). Cabe mencionar que nuestros resultados histológicos, son los primeros en poner en evidencia que el consumo de una dieta hipercalórica hiperglúcida conlleva a estas alteraciones, puesto que, la mayoría de los avances científicos en este campo se han realizado en base a modificaciones genéticas, administración de fármacos o cultivos celulares.

Impacto del SMet sobre las gónadas y órganos andrógeno dependientes.

Los parámetros biométricos corporales y testiculares son muy importantes para establecer patrones reproductivos [Caldeira, B. C, 2010]. Se ha observado una correlación directa entre el peso del testículo y la población de espermatozoides en especies animales, ya que el tamaño del testículo refleja principalmente el volumen total del túbulo seminífero, su componente principal [Amann RP, 1970; T.T Olar, 1983; Luiz R, 1998]. La evidencia de nuestro trabajo demuestra que la desregulación hormonal del eje HPG generado por el SMet tiene un impacto directo en los procesos de proliferación, diferenciación y maduración celular, como se muestra en las imágenes 17-19. En donde se observa un incremento en el área celular de los túbulos seminíferos analizados en el grupo HCJ. Efectos que se reflejan macroscópicamente en el peso testicular y en el índice gonadosomático (tabla 4). El epidídimo y glándulas anexas del aparato reproductor masculino se les considera como tejidos andrógeno dependientes, debido a que sus características funcionales y tamaño son determinadas por los niveles de andrógenos [Caldeira BC, 2010]. La reducción en el peso del epidídimo en ambos grupos experimentales, así como la disminución del peso de la vesícula seminal en el grupo HCA (tabla 5), son sugerentes de que el SMet tiene un efecto negativo en la funcionalidad de estos tejidos y, por ende, compromete la eficacia reproductiva de la rata Wistar macho.

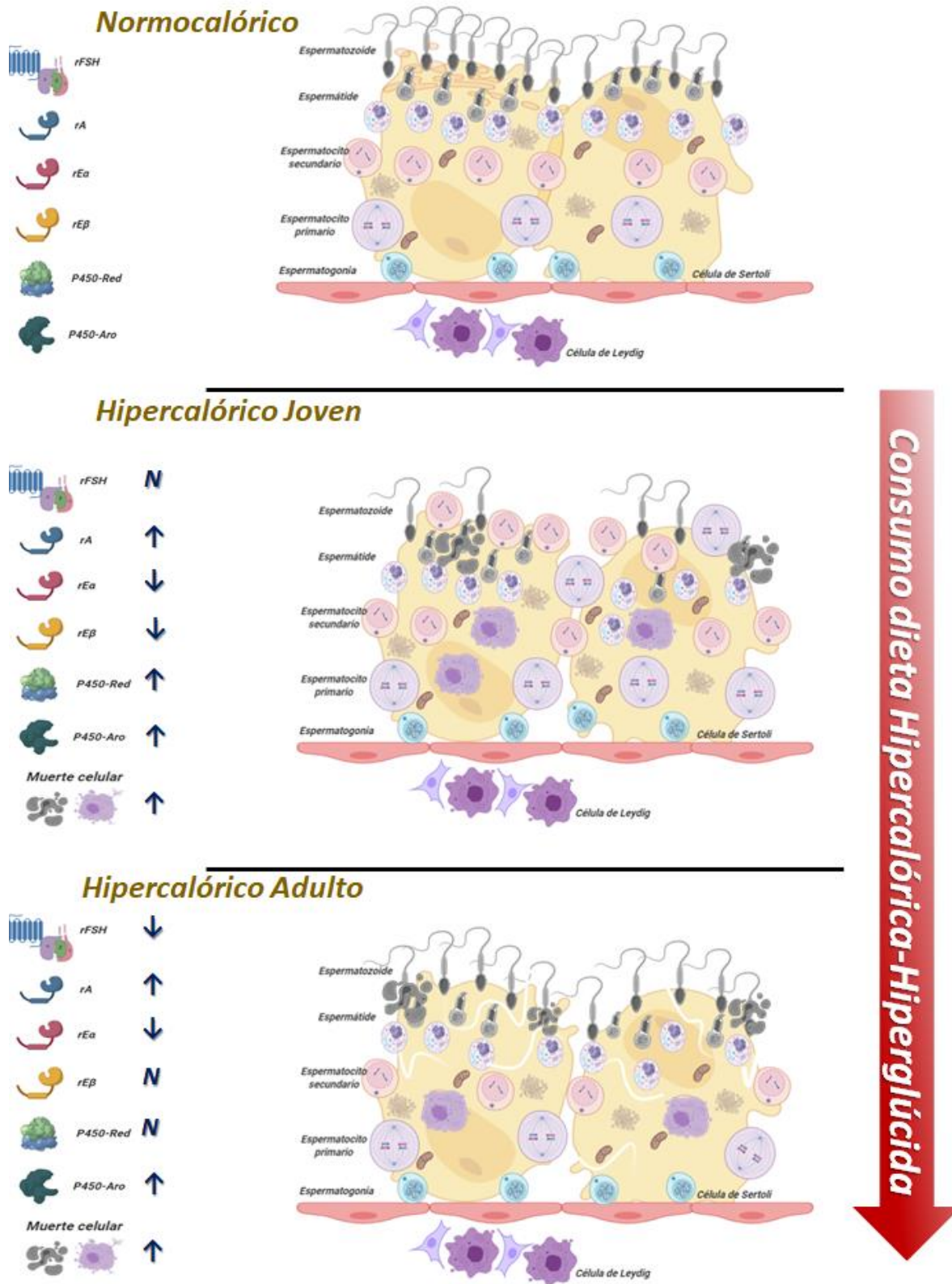


Figura 25. Impacto del SMet en la dinámica de expresión de receptores hormonales implicados en el eje HPG y en la estructura de los túbulos seminíferos.

Después del proceso de espermiación, los espermatozoides son dirigidos al epidídimo en donde culmina su diferenciación morfológica (maduración extra-testicular), que propicia la propiedad de motilidad, la cual se adquiere en el tránsito de las distintas regiones epididimarias [Gervasi MG ,2017]. Se ha puesto en evidencia que muchas hormonas como los estrógenos, prolactina, vitamina D, melatonina, progesterona y factores de crecimiento, pero en particular y con mayor importancia la T y DHT desempeñan funciones específicas en la regulación epididimaria [Robaire B, 2011]. Una serie de estudios han demostrado inequívocamente que, la DHT ejerce la principal acción androgénica mediadora en el epidídimo. Algunos de los datos clave que respaldan esta conclusión son: 1) después de la inyección de testosterona radiomarcada, DHT es el andrógeno activo presente en los núcleos de las células epididimarias; 2) las células epididimales pueden sintetizar metabolitos a partir de testosterona con ayuda de la 5α -reductasa *in vitro* [Robaire B, 2011]. En el caso particular de la vesícula seminal tiene la función de síntesis de líquido seminal, el cual tiene un papel central en la maduración, supervivencia, almacenamiento y transporte de espermatozoides [Pastor Soler 2001]. El volumen inadecuado de semen es una de las causas de infertilidad masculina de acuerdo con los trabajos mostrados por Roberts Tash en 2000 y 2009, en donde realizaron estudios de líquido seminal en pacientes con hipogonadismo [Roberts M, 2009; Tash, 2000].

Con estas evidencias, es necesario hacer un estudio en lo que respecta a la expresión del receptor androgénico, así como de la P450-Red, la capacidad de síntesis y propiedades del líquido seminal, en relación al hipogonadismo observado, en conjunto con las alteraciones metabólicas para entender el impacto que tiene el SMet sobre estos tejidos, y cuál es su papel sobre la infertilidad masculina asociada con alteraciones en los procesos de proliferación, diferenciación y maduración espermática en testículo.

10. Conclusión

Los resultados demostraron que el consumo de una dieta hipercalórica hiperglúcida genera un cuadro dismetabólico en ratas macho Wistar, semejante al SMet en humanos, en edad reproductiva temprana y adulta, acentuándose en la adulta.

El desarrollo de SMet altera la dinámica del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, teniendo como evidencia el incremento de FSH y estrógenos, así como la disminución de testosterona en ambos grupos experimentales.

En testículo se compensó el hipogonadismo, manteniendo el proceso espermatogénico, al modificar la expresión de receptores y complejos citocromales, en ambas edades reproductivas.

Las modificaciones en la dinámica androgénica/estrogénica testicular favorecen los procesos de mitosis y meiosis I, incrementando el número de espermatogonias y espermatocitos, en la edad reproductiva temprana. Mientras que, las mismas condiciones en la edad adulta, dañan la integridad y continuidad de los túbulos seminíferos, resultando en la pérdida de la interacción célula-célula. Lo que culmina en una mayor muerte celular de espermátides principalmente, en ambas edades reproductivas.

Finalmente, las alteraciones metabólicas y hormonales afectan negativamente a tejidos accesorios dependientes de andrógeno del aparato reproductor de la rata macho Wistar, en ambas edades reproductivas.

11. Bibliografía

- 2015 Obesity collaborators GBD. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N Engl J Med*. 2017.
- Abel MH, Charlton HM, Huhtaniemi I, Pakarinen P, Kumar TR, Christian HC. An investigation into pituitary gonadotrophic hormone synthesis, secretion, subunit gene expression and cell structure in normal and mutant male mice. *J*.
- Ahima RS. Overview of metabolic syndrome. In: Ahima RS, editor. *Metabolic syndrome: a comprehensive textbook*. Cham: Springer International Publishing; 2016. pp. 3–12.
- Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*. 1998;15(7):539–553.
- Allan CM, Haywood M, Swaraj S, Spaliviero J, Koch A, Jimenez M, Poutanen M, Levallet J, Huhtaniemi I, Illingworth PH, Handelsman DJ. A novel transgenic model to characterize the specific effects of follicle-stimulating hormone on gonadal physiology in the absence of luteinizing hormone actions. *Endocrinology* 2001; 142:2213–20; PMID:11356665.
- Amagasa J. Mechanisms of photodynamic inactivation of acridine orange-sensitized transfer RNA: participation of singlet oxygen and base damage leading to inactivation. *J Radiat Res.* (1986) 27:339–51. 10.1269/jrr.27.339).
- Amann, R. P. (1970). *The Male Rabbit. IV. Quantitative Testicular Histology and Comparisons Between Daily Sperm Production as Determined Histologically and Daily Sperm Output***Authorized for publication on December 19, 1969 as Paper No. 3714 in the Journal Series of the Pennsylvania Agricultural Experiment Station. This investigation was supported by Research Grant HD-01356 from the National Institute of Child Health and Human Development. *Fertility and Sterility*, 21(9), 662–672. doi:10.1016/s0015-0282(16)37743-3.
- Araujo AB, O'Donnell AB, Brambilla DJ, et al. Prevalence and incidence of androgen deficiency in middle-aged and older men: estimates from the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(12):5920–5926.
- Ashok S, Sigman M (2007) Bioavailable testosterone should be used for the determination of androgen levels in infertile men. *J Urol* 177(4):1443–1446 quiz 591.
- Assinder S, Davis R, Fenwick M, Glover A. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. *Reproduction*. 2007;133:11–19.
- Aybek H, Aybek Z, Rota S, Sen N, Akbulut M. The effects of diabetes mellitus, age, and vitamin E on testicular oxidative stress. *Fertil Steril* 2008;90:755–760.
- Azziz R, Carmina E, Chen Z, et al. Polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16057.
- Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4237–45.
- Baccetti B, La Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, De Leo V. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod* 2002;17:2673–2677.
- Bain J, Langevin R, D'Costa M, Sanders RM, Hucker S (1988) Serum pituitary and steroid hormone levels in the adult male: one value is as good as the mean of three. *Fertil Steril* 49(1):123–126
- Balen AH, Conway G, Homburg R, Legro R. *Polycystic ovary syndrome: A guide to clinical management*. UK: Taylor & Francis; 2006.
- Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation: European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) *Diabetic Medicine*. 1999;16(5):442–443
- Ballester J, Munoz MC, Dominguez J, Rigau T, Guinovart JJ, Rodriguez-Gil JE. Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. *J Androl* 2004;25:706–719.
- Basaria S, Muller DC, Carducci MA, Egan J, Dobs AS. Hyperglycemia and insulin resistance in men with prostate carcinoma who receive androgen-deprivation therapy. *Cancer*. 2006;106:581–588.
- Benitez A, Perez Diaz J. Effect of streptozotocin-diabetes and insulin treatment on regulation of Leydig cell function in the rat. *Horm Metab Res* 1985;17:5–7.
- Bhasin S, Brito JP, Cunningham GR, et al. Testosterone Therapy in Men With Hypogonadism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 May 1;103(5):1715–1744

- Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, et al: Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndromes: an endocrine society clinical practice guideline, *J Clin Endocrinol Metab* 91(6): 1995–2010, 2006
- Bhattacharya SM, Ghosh M, Nandi N. Diabetes mellitus and abnormalities in semen analysis. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40:167–171.
- Boden, G, Shulman, GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2002; 32(Suppl. 3): 14–23
- Boden, G. (2003). Effects of Free Fatty Acids (FFA) on Glucose Metabolism: Significance for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 111(03), 121–124. <https://doi.org/10.1055/s-2003-39781>
- Bois C, Delalande C, Nurmio M, Parvinen M, Zanatta L, Toppari J, et al. Age and cellrelated gene expression of aromatase and estrogen receptors in the rat testis. *J Mol Endocrinol* 2010;45:147–59.
- Bose R, Adiga SK, D'Souza F, Salian SR, Uppangala S, Kalthur G, Jain N, Radhakrishnan RA, Bhat N, Krishnamurthy H et al. Germ cell abnormalities in streptozotocin induced diabetic mice do not correlate with blood glucose level. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:1405–1413.
- Bourguiba, S., Genissel, C., Lambard, S., Bouraïma, H., & Carreau, S. (2003). Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86(3-5), 335–343. doi:10.1016/s0960-0760(03)00343-1
- Breen KM, Billings HJ, Debus N, Karsch FJ. Endotoxin inhibits the surge secretion of gonadotropin-releasing hormone via a prostaglandin-independent pathway. *Endocrinology* 2004;145: 221–7.
- Bremner WJ, Matsumoto AM, Sussman AM, Paulsen CA. Follicle-stimulating hormone an human spermatogenesis. *J Clin Invest.* 1981;68(4):1044–52.
- Burns KH, Matzuk MM. Minireview: genetic models for the study of gonadotropin actions. *Endocrinology.* 2002;143:2823–2835.
- Burul-Bozkurt N, Pekiner C, Kelicen P. Diabetes alters aromatase enzyme levels in gonadal tissues of rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010; 382:33–41.
- Byvaltsev, V. A., Bardanova, L. A., Onaka, N. R., Polkin, R. A., Ochkal, S. V., Shepelev, V. V., Aliyev, M. A., & Potapov, A. A. (2019). Acridine Orange: A Review of Novel Applications for Surgical Cancer Imaging and Therapy. *Frontiers in oncology*, 9, 925. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00925>
- C. Genissel, J. Levallet, S. Carreau, Regulation of cytochrome P450 aromatase gene expression in adult rat Leydig cells. Comparison with estradiol production, *J. Endocrinol.* 168 (2001) 95–105.
- Caldeira, B. C., Paula, T. A. R. de, Matta, S. L. P. da, Balarini, M. K., & Campos, P. K. A. (2010). Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). *Revista Ceres*, 57(5), 569–575.
- Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 2004;33(2):351–375
- Campbell PJ, Mandarino LJ, Gerich JE. Quantification of the relative impairment in actions of insulin on hepatic glucose production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1988; 37: 15– 21
- Carreau S, Bouraïma-Lelong H, Delalande C. Estrogens in male germ cells. *Spermatogenesis.* 2011;1(2):90–94. doi:10.4161/spmg.1.2.16766
- Carreau S, de Vienne C, Galeraud-Denis I (2008) Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Adv Med Sci* 53(2):139–144. doi:10.2478/v10039-008-0022-z.
- Carreau, S., Bois, C., Zanatta, L., Silva, F. R. M. B., Bouraïma-Lelong, H., & Delalande, C. (2011). Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sciences*, 89(15-16), 584–587. doi:10.1016/j.lfs.2011.06.004
- Carreau, S., Bouraïma-Lelong, H., & Delalande, C. (2011). Estrogens in male germ cells. *Spermatogenesis*, 1(2), 90–94. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16766>
- Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B., & Bourguiba, S. (2003). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 1, 35. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-35>.
- Casanueva, F. F., & Ghigo, E. (Eds.). (2018). *Hypothalamic-Pituitary Diseases*. *Endocrinology*. doi:10.1007/978-3-319-44444-4.
- César E. Montalvo Arenas. (2015). *Aparato Reprodutor masculino*. Marzo 2017, de UNAM Sitio web: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/Doc/Mas.pdf>

- Chan YM, Butler JP, Sidhoum VF, Pinnell NE, Seminara SB. Kisspeptin administration to women: a window into endogenous kisspeptin secretion and GnRH responsiveness across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E1458–67.
- Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Guillou F, Lardy H, Yeh S. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(18):6876-81; PMID:15107499; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307306101>.
- Chapin RE, Wine RN, Harris MW, Borchers CH, Haseman JK. Structure and control of a cell-cell adhesion complex associated with spermiation in rat seminiferous epithelium. *J Androl* 2001; 22:1030–52.
- Chen Y. Metabolism: Carbohydrate. In: Mooren FC, editor. *Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 570–3.
- Cheung LP. Polycystic ovary syndrome: not only a gynaecological disease. *J Paediatr Obstet Gynaecol* 2008(May/June):125-31.
- Chimento A, Sirianni R, Zolea F, Bois C, Delalande C, Ando S, et al. GPR30 and ERs are expressed in rat round spermatids and mediate estrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax. *Int J Androl.* 2011 doi: 10.1111/j.1365-2605.2010.01100.x.
- Chirala, S. S., & Wakil, S. J. (2004). Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*, 39(11), 1045–1053. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15726818>.
- Cleeman JI. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) *Journal of the American Medical Association.* 2001;285(19):2486–2497.
- Clermont Y, Leblond CP, Messier B. (1959). Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.*, 48 (1): 37-55.
- Conley A., Hinshelwood M. 2001. Mammalian aromatases. *Reproduction* 121:685-695.
- Constanze C Maresch, Dina C Stute, Marco G Alves, Pedro F Oliveira, David M de Kretser, Thomas Linn, Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: a systematic review, *Human Reproduction Update*, Volume 24, Issue 1, January-February 2018, Pages 86–105, <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx033>.
- Dai, Y, Mercanti, F, Dai, D. LOX-1, a bridge between GLP-1R and mitochondrial ROS generation in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 437(1): 62–66.
- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G (2004) A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5):1327–1332. doi:10.1073/pnas.0308114100.
- De Roux N, Young J, Misrahi M, et al. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med* 1997;337:1597–602.
- DeFronzo RA, Ferrannini E, Simonson DC. Fasting hyperglycemia in non-insulin dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. *Metabolism* 1989; 38: 387– 395.
- DEFRONZO, R. (1997). Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *The Netherlands Journal of Medicine*, 50(5), 191–197. doi:10.1016/s0300-2977(97)00012-0.
- Diamanti-Kandarakis E, Argyrakopoulou G, Economou F, Kandaraki E, Koutsilieris M. Defects in insulin signaling pathways in ovarian steroidogenesis and other tissues in polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;109:242-6.
- Dohle GR, Arver S, Bettocchi C, Jones TH, Kliesch S. European Association of Urology (EAU) guideline on male hypogonadism. EAU 2019.
- Dudek, M., Ziarniak, K., & Sliwowska, J. H. (2018). Kisspeptin and Metabolism: The Brain and Beyond. *Frontiers in endocrinology*, 9, 145. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00145>.
- Dumasiak K., Kumar A., Kadam L., Balasinor NH. 2015. Effect of estrogen receptor-subtype-specific ligands on fertility in adult male rats. *The Journal of Endocrinology* 255(3):169-180.
- Dym M, Clermont Y. (1970). Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *Am J Anat.*, 128: 265-282.
- Eacker, S. M., Agrawal, N., Qian, K., Dichek, H. L., Gong, E. Y., Lee, K., & Braun, R. E. (2008). Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(3), 623–635. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0534>.

- Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH, et al. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocrine Practice*. 2003;9(3):237–252.
- El Shennawy A, Gates RJ, Russell LD. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: cell viability after hormonal replacement in adults after intermediate periods of hypophysectomy. *J Androl* 1998; 19(3):320-34; discussion 41-2; PMID:9639049.
- Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* 2005; 433:269–77.
- Favaro WJ, Padovani CR, Cagnon VH. Ultrastructural and proliferative features of the ventral lobe of the prostate in non-obese diabetic mice (NOD) following androgen and estrogen replacement associated to insulin therapy. *Tissue Cell* 2009;41:119–132.
- Federación Internacional de Diabetes. *Atlas de la Diabetes de la FID, 9ª edición*. Bruselas, Bélgica: Federación Internacional de Diabetes, 2019.
- Fisher JS, Millar MR, Majdic G, Saunders PT, Fraser HM, Sharpe RM. Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *The Journal of endocrinology* 1997; 153:485-495.
- Fok KL, Chen H, Ruan YC, Chan HC. Novel regulators of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;29:31–42.
- Foster DL, Nagatani S. 1999. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. *Biol Reprod* 60: 205– 215.
- Franca LR, Parreira GG, Gates RJ, Russell LD. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomy. *J Androl* 1998; 19(3):335-40; PMID:9639050.
- Frey HL, Peng S, Rajfer J. Synergy of abdominal pressure and androgens in testicular descent. *Biol Reprod* 1983;29:1233–9.
- Gadgil MD, Appel LJ, Yeung E, Anderson CA, Sacks FM, Miller 3rd ER. The effects of carbohydrate, unsaturated fat, and protein intake on measures of insulin sensitivity: results from the OmniHeart trial. *Diabetes Care*. 2013;36:1132–7.
- Gancarczyk M, Paziewska-Hejmej A, Carreau S, Tabarowski Z, Bilinska B. Dose- and photoperiod-dependent effects of 17 β -estradiol and the anti-estrogen ICI 182,780 on testicular structure, acceleration of spermatogenesis and aromatase immunoexpression in immature bank voles. *Acta Histochem*. 2004;106:269–278.
- Gatner L, Hiatt J. (2007) *Histología, texto y atlas*. Tercera Edición. Editorial McGraw Hill. México, D.F. 628-645.
- George JT, Millar RP, Anderson RA. Hypothesis: kisspeptin mediates male hypogonadism in obesity and type 2 diabetes. *Neuroendocrinology* 2010;91(4):302–7.
- Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, 5(2), 204–218. <https://doi.org/10.1111/andr.12320>
- Glass AR, Herbert DC, Anderson J. Fertility onset, spermatogenesis, and pubertal development in male rats: effect of graded underfeeding. *Pediatr Res* 1986;20:1161–7.
- Gobal, F, Deshmukh, A, Shah, S. Triad of metabolic syndrome, chronic kidney disease, and coronary heart disease with a focus on microalbuminuria: death by overeating. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57(23): 2303–2308).
- Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S, Gonzales GF. (2006). Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 448–454.
- Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:219-31.
- Gounden V, Jialal I. Fructosamine. [Updated 2020 Feb 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470185/>
- Grossmann M, Thomas MC, Panagiotopoulos S, Sharpe K, Macisaac RJ, Clarke S, Zajac JD, Jerums G. Low testosterone levels are common and associated with insulin resistance in men with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1834–1840.
- Gruber CJ., Gruber DM., Gruber IM., Wieser F., Huber JC. 2004. Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol Metab* 15:73-78.
- Hammarström A, Annandale E. A conceptual muddle: an empirical analysis of the use of ‘sex’ and ‘gender’ in ‘gender-specific medicine’ journals. *PLoS One*. 2012;7:e34193.

- Hayes FJ, DeCruz S, Seminara S, BBoepple P, ACrowley W, Jr. 2001. Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86:53–58. (doi:10.1210/jc.86.1.53).
- Hayes FJ, Seminara S, BDecruz S, Boepple P, ACrowley W, Jr. 2000. Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85:3027–3035. (doi:10.1210/jc.85.9.3027).
- Heckert LL, Griswold MD. Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testis and Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 1991;5:670–7.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews* 2007; 87:905–931.
- Herbison AE. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12:452–66.
- Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. (2010). Surfing the wave, cycle, life history and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy Research and Technique*, 73: 243–278.
- Holdcraft RW, Braun RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 2004;131:459–67.
- Holvoet, P., De Keyser, D., Jacobs, D. R., & Jr. (2008). Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidology*, 3(6), 637–649. <https://doi.org/10.2217/17460875.3.6.637>.
- Horton JD, Shah NA, Warrington JA, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12027–12032.
- Hutson JC, Stocco DM, Campbell GT, Wagoner J. Sertoli cell function in diabetic, insulin-treated diabetic, and semi-starved rats. *Diabetes* 1983;32:112–116.
- Jangir RN, Jain GC. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Curr Diabetes Rev*. 2014;10:147–157.
- Johnston H, Baker PJ, Abel M, et al. Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology* 2004;145:318–29.
- Jones H., Howell J., Channer K. (2010) Testosterone improves glycaemic control, insulin resistance, body fat and sexual function in men with the metabolic syndrome and/or type 2 diabetes: a Multicentre European Clinical Trial: the TIMES2 Study. *Endocrine Abstracts* 21: OC1.6.
- Jones T.H. (2010) Testosterone deficiency: a risk factor for cardiovascular disease? *Trends Endocrinol Metab* 21: 496–503.
- Juhan-Vague, I, Alessi, MC, Mavri, A. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7): 1575–1579.
- Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C, Lareyre JJ. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol* 2007;153:346–64.
- Kalra SP, Kalra PS. Do testosterone and estradiol-17 beta enforce inhibition or stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion? *Biol Reprod*. 1989;41(4):559–70.
- Kaur J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology research and practice*, 2014, 943162. <https://doi.org/10.1155/2014/943162> (Retraction published *Cardiol Res Pract*. 2019 Jan 31;2019:4301528).
- Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocr Rev*. 2016;37(3):278–316. doi:10.1210/er.2015-1137.
- Kelly, D., & Jones, T. (2013). Testosterone: a metabolic hormone in health and disease, *Journal of Endocrinology*, 217(3), R25-R45. Retrieved Jul 8, 2020, from <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/217/3/R25.xml>
- Kianifard D, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S. The ultrastructural changes of the Sertoli and leydig cells following streptozotocin induced diabetes. *Iran J Basic Med Sci* 2012;15:623–635.
- Kopera IA, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD (2010) Sertoli–germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365(1546):1593–1605.
- Korenbrott CC, Huhtaniemi IT, Weiner RI. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol Reprod* 1977;17:298–303.
- Kraus WL., McInerney EM., Katzenellenbogen BS. 1995. Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:12314–12318.

- Kusuzaki K, Matsubara T, Satonaka H, Matsumine A, Nakamura T, Sudo A, et al. Intraoperative Photodynamic Surgery (iPDS) with acridine orange for musculoskeletal sarcomas. *Cureus*. (2014) 6:e204 10.7759/cureus.204.
- Kusuzaki K, Murata H, Takeshita H, Hashiguchi S, Nozaki T, Emoto K, et al. Intracellular binding sites of acridine orange in living osteosarcoma cells. *Anticancer Res*. (2000) 20:971–5.
- Lambard S., Silandre D., Delalande C., Denis-Galeraud L., Bourguiba S., Carreau S. 2005. Aromatase in testis: Expression and in male reproduction. *Journal of steroid Biochemistry and Molecular Biology* 95:63-69.
- Lee SJ, Kirigiti M, Lindsley SR, et al. Efferent projections of neuropeptide Y-expressing neurons of the dorsomedial hypothalamus in chronic hyperphagic models. *J Comp Neurol* 2013;521:1891–914.
- Levallet J, Bilinska B, Mittre H, Genissel C, Fresnel J, Carreau S. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol Reprod*. 1998;58:919–926.
- Lewis, GF, Steiner, G. Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state. *Diabetes Care* 1996; 19(4): 390–393.
- Li C, Chen P, Smith MS. The acute suckling stimulus induces expression of neuropeptide Y (NPY) in cells in the dorsomedial hypothalamus and increases NPY expression in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 1998;139:1645–52.
- Lindsay, RS, Funahashi, T, Hanson, RL. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002; 360(9326): 57–58).
- Liu, C. M., & Kanoski, S. E. (2018). Homeostatic and non-homeostatic controls of feeding behavior: Distinct vs. common neural systems. *Physiology & behavior*, 193(Pt B), 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.02.011>.
- Longcope C, Kato T, Horton R 1969 Conversion of blood androgens to estrogens in normal adult men and women. *J Clin Invest* 48:2191–2201.
- Lopez-Alvarenga JC, Zarinan T, Olivares A, Gonzalez-Barranco J, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A. Poorly controlled type I diabetes mellitus in young men selectively suppresses luteinizing hormone secretory burst mass. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5507–5515.
- Lotti F, Corona G, Degli Innocenti S, Filimberti E, Scognamiglio V, Vignozzi L, et al. Seminal, ultrasound and psychobiological parameters correlate with metabolic syndrome in male members of infertile couples. *Andrology*. 2013;1:229–239.
- Lotti F, Corona G, Vignozzi L, Rossi M, Maseroli E, Cipriani S, et al. Metabolic syndrome and prostate abnormalities in male subjects of infertile couples. *Asian J Androl*. 2014;16:295–304.
- Luiz R. França, Takehiko Ogawa, Mary R. Avarbock, Ralph L. Brinster, Lonnie D. Russell, Germ Cell Genotype Controls Cell Cycle during Spermatogenesis in the Rat, *Biology of Reproduction*, Volume 59, Issue 6, 1 December 1998, Pages 1371–1377, <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1371>.
- Ma L, Robinson LN, Towle HC. ChREBP**Mlx* is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem*. 2006;281(39):28721–28730.
- Maric C, Forsblom C, Thorn L, Waden J, Groop PH, FinnDiane Study G. Association between testosterone, estradiol and sex hormone binding globulin levels in men with type 1 diabetes with nephropathy. *Steroids* 2010;75:772–778.
- Marie-Hélène Pesant, Andrew Dwyer, Pedro Marques Vidal, Philippe Schneider, Vittorio Giusti, Luc Tappy, François P Pralong, The lack of effect of insulin on luteinizing hormone pulsatility in healthy male volunteers provides evidence of a sexual dimorphism in the metabolic regulation of reproductive hormones, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 96, Issue 2, August 2012, Pages 283–288, <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.030189>.
- Martins AD, Majzoub A, Agawal A. Metabolic Syndrome and Male Fertility. *World J Mens Health*. 2019;37(2):113–127. doi:10.5534/wjmh.180055.
- Matsuzawa, Y, Funahashi, T, Nakamura, T. The concept of metabolic syndrome: contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. *J Atheroscler Thromb* 2011; 18(8): 629–639).
- Mauvais-Jarvis F. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22:24–33.
- McGee SR, Narayan P. Precocious puberty and Leydig cell hyperplasia in male mice with a gain of function mutation in the LH receptor gene. *Endocrinology* 2013;154:3900–13.
- Mehta, PK, Griendling, KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(1): C82–C97.
- Meng J, Greenlee AR, Taub CJ, Braun RE. Sertoli cell-specific deletion of the androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice. *Biol Reprod* 2011;85:254–60.

- Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 2011;32(1):81–151.
- Moggetti P, Castello R, Negri C, et al. Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:139-46.
- Mohammed, M., Al-Habori, M., Abdullateef, A., & Saif-Ali, R. (2018). Impact of Metabolic Syndrome Factors on Testosterone and SHBG in Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome. *Journal of diabetes research*, 2018, 4926789. <https://doi.org/10.1155/2018/4926789>.
- Mohasseb M, Ebied S, Yehia MA, Hussein N. Testicular oxidative damage and role of combined antioxidant supplementation in experimental diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2011;67:185–194.
- Moroni-Gonzalez, D., Treviño, S., & Díaz, A. (2016). Estudio del efecto insulínico del extracto de Stevia rebaudiana Bertoni como modulador del metabolismo de glucosa y lípidos en ratas wistar expuestas a dieta normo e hipercalórica. BUAP.
- Mruk DD, Cheng CY. In search of suitable in vitro models to study germ cell movement across the blood-testis barrier. *Spermatogenesis* 2012; 2:6-10; PMID:22553485; <http://dx.doi.org/10.4161/spmg.19878>.
- Mruk DD, Cheng CY. Tight junctions in the testis: new perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365:1621-35; PMID:20403874; <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2010.0010>.
- Muraleedharan, V., & Jones, T. H. (2010). Testosterone and the metabolic syndrome. *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*, 1(5), 207–223. <https://doi.org/10.1177/2042018810390258>
- Nansseu, J. R., Fokom-Domgue, J., Noubiap, J. J., Balti, E. V., Sobngwi, E., & Kengne, A. P. (2015). Fructosamine measurement for diabetes mellitus diagnosis and monitoring: a systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ open*, 5(5), e007689. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-007689>.
- Navarro G, Allard C, Xu W, Mauvais-Jarvis F. The role of androgens in metabolism, obesity, and diabetes in males and females. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23:713–719.
- Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384:766–781.
- Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest*. 2004;113:1582–1588.
- Nilsson S., Makela S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G., Enmark E., Pettersson K., Warner M., Gustafsson JA. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews* 81:1535-1565.
- Nussey S, Whitehead S. *Endocrinology: An Integrated Approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2001. Chapter 1, Principles of endocrinology. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20/>
- O'Donnell L, McLachlan RI, Wreford NG, de Kretser DM, Robertson DM. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1996;55:895–901.
- O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: Neill JD, editor; Plant TM, Pfaff DW, Challis JRG, de Kretser DM, Richards JS, Wassarman PM, section editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Sydney, Australia: Elsevier; 2006. p. 1017-70.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine reviews* 2001; 22:289-318.
- Oduwole, O. O., Peltoketo, H., & Huhtaniemi, I. T. (2018). Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. *Frontiers in endocrinology*, 9, 763. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00763>
- Ogurtsova K, Fernandes JD, Huang Y, et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes research and clinical practice*. 2017;128:40–50.
- Ojeda SR, Andrews WW, Advis JP, White SS. Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocr Rev* 1980;1:228–57.
- Oliveira CA, Mahecha GA, Carnes K, Prins GS, Saunders PT, Franca LR, Hess RA. Differential hormonal regulation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta and androgen receptor expression in rat efferent ductules. *Reproduction (Cambridge, England)* 2004; 128:73-86.
- Omura T, Morohashi K. (1995). Gene regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 53: 19-25.
- O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Abel MH. Efecto de la FSH sobre la morfología testicular y la espermatogénesis en ratones hipogonadales deficientes en gonadotropina que carecen de receptores de andrógenos. *Reproducción* 2010; 139 : 177-184; <http://dx.doi.org/10.1530/REP-09-0377>.

- Ouchi, N, Ohishi, M, Kihara, S. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension* 2003; 42(3): 231–234.
- P.T.K. Saunders, R.M. Sharpe, K. Williams, S. MacPherson, H. Urquart, D.S. Irvine, M. Millar, Differential expression of oestrogen receptor and proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol. Hum. Reprod.* 7 (2001) 227–236.
- Padmanabhan, V., & McNeilly, A. (2001). Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction*, 121(1), 21–30. doi:10.1530/rep.0.1210021.
- Pak TR, Lynch GR, Tsai PS. Estrogen accelerates gonadal recrudescence in photo-regressed male siberian hamsters. *Endocrinology*. 2002;143:4131–4134.
- Pant, S, Deshmukh, A, Gurumurthy, GS. Inflammation and atherosclerosis – revisited. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2014; 19(2): 170–17.
- Pastor-Soler N, Bagnis C, Sabolic I, Tyszkowski R, McKee M, Van Hoek A, Breton S, Brown D (2001) Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. *Biol Reprod* 65:384–393.
- Pellatt L, Hanna L, Brincat M, et al. Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:240-5.
- Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:2057–2067.
- Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 2012;92:1235–316.
- Plant TM. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J Endocrinol.* 2015;226:T41–54.
- Plemel JR, Caprariello AV, Keough MB, Henry TJ, Tsutsui S, Chu TH, et al. . Unique spectral signatures of the nucleic acid dye acridine orange can distinguish cell death by apoptosis and necroptosis. *J Cell Biol.* (2017) 216:1163–81. 10.1083/jcb.201602028.
- Pontes DA, Fernandes GS, Piffer RC, Gerardin DC, Pereira OC, Kempinas WG. Ejaculatory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: the role of testosterone. *Pharmacol Rep* 2011;63:130–138.
- Porto EM, Dos Santos SA, Ribeiro LM, Lacorte LM, Rinaldi JC, Justulin LA Jr, Felisbino SL. Lobe variation effects of experimental diabetes and insulin replacement on rat prostate. *Microsc Res Tech* 2011;74:1040–1048.
- Power ML, Schulkin J. Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins. *Br J Nutr.* 2008;99:931–940.
- Pozza C, Isidori AM. What's behind the obesity epidemic. Cham: Imaging in Bariatric Surgery, Springer International Publishing AG; 2018. pp. 1–8.
- Pratis, K., O'Donnell, L., Ooi, GT., Stanton, PG., McLachlan, RI., & Robertson, DM. (2003). Differential regulation of rat testicular 5alpha-reductase type 1 and 2 isoforms by testosterone and FSH, *Journal of Endocrinology*, 176(3), 393-403. Retrieved May 7, 2020, from <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/176/3/393.xml>.
- Pretorius E., Africander D.J., Vlok M., Perkins M.S., Quanson J., Storbeck K.H. 11-Ketotestosterone and 11-ketodihydrotestosterone in castration resistant prostate cancer: potent androgens which can no longer be ignored. *PLoS One.* 2016;11:e0159867.
- Purchase Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* - 4th Edition. Print Book & E-Book. ISBN 9780123971753, 9780123977694.
- Qiu J, Zhang C, Borgquist A, Nestor CC, Smith AW, Bosch MA, et al. Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels. *Cell Metab* (2014) 19(4):682–93.10.1016/j.cmet.2014.03.004 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
- Ramaswamy S, Dwarki K, Ali B, Gibbs RB, Plant TM. The decline in pulsatile GnRH release, as reflected by circulating LH concentrations, during the infant-juvenile transition in the gonadal male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) is associated with a reduction in kisspeptin content of KNDy neurons of the arcuate nucleus in the hypothalamus. *Endocrinology* 2013;154:1845–53.
- Ramaswamy S, Plant TM, Marshall GR. Pulsatile stimulation with recombinant single chain human luteinizing hormone elicits precocious Sertoli cell proliferation in the juvenile male rhesus monkey. *Biol Reprod* 2000;63:82–8.
- Ramaswamy S, Weinbauer GF. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/testosterone. *Spermatogenesis.* 2015;4(2):e996025. Published 2015 Jan 26. doi:10.1080/21565562.2014.996025.

- Ramaswamy, S., & Weinbauer, G. F. (2015). Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis*, 4(2), e996025. <https://doi.org/10.1080/21565562.2014.996025>.
- Ramm, S. A., Scharer, L., Ehmcke, J., & Wistuba, J. (2014). Sperm competition and the evolution of spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 20(12), 1169–1179. doi:10.1093/molehr/gau070.
- Raven HP; Dale MM, Riter JM, Moore PK. (2004). *Farmacología*. Quinta Edición. Elsevier. España, 184-188.
- Rémy Burcelin, Bernard Thorens, Micheline Glauser, Rolf C. Gaillard, François P. Pralong, Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion from Hypothalamic Neurons: Stimulation by Insulin and Potentiation by Leptin, *Endocrinology*, Volume 144, Issue 10, 1 October 2003, Pages 4484–4491, <https://doi.org/10.1210/en.2003-0457>.
- Repaci A, Pasquali R. Reproductive disorders and obesity in males and females and focus on the polycystic ovary syndrome. *Metabolic syndrome: a comprehensive textbook*. Cham: Springer International Publishing AG; 2014. pp. 1–19.
- Ribeiro DL, Marques SF, Alberti S, Spadella CT, Manzato AJ, Taboga SR, Dizeyi N, Abrahamsson PA, Goes RM. Malignant lesions in the ventral prostate of alloxan-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol* 2008;89:276–283.
- Roa J, Herbison AE. Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology* (2012) 153(11):5587–99. [10.1210/en.2012-1470](https://doi.org/10.1210/en.2012-1470).
- Robaire, B., & Hamzeh, M. (2011). Androgen Action in the Epididymis. *Journal of Andrology*, 32(6), 592–599. doi:10.2164/jandrol.111.014266.
- Roberts M, Jarvi K (2009) Steps in the investigation and management of low semen volume in the infertile man. *Can Urol Assoc J* 3:479–485.
- Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, et al. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp 19*) gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:7986–7991.
- Rochira V, Madeo B, Diazi C, et al. Estrogens and male reproduction. [Updated 2016 Nov 24]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278933/>.
- Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S., & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 215–225.
- Rojas J, Chávez M, Olivar L, et al. Polycystic ovary syndrome, insulin resistance, and obesity: navigating the pathophysiologic labyrinth. *Int J Reprod Med* 2014;2014:719050.
- Rommerts F.F.G. (1990) Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and action. In: Nieschlag E., Behre H.M. (eds) *Testosterone*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(2):12. Published 2018 Feb 26. doi:10.1007/s11906-018-0812-z.
- Sato, K., Okajima, F., Miyashita, K., Imamura, S., Kobayashi, J., Stanhope, K. L., ... Nakajima, K. (2016). The majority of lipoprotein lipase in plasma is bound to remnant lipoproteins: A new definition of remnant lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, 461, 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.06.020>.
- Schiebinger L, Klinge I, Sánchez de Madariaga I, Paik H, Schraudner M, Stefanick M. Gendered innovations in science, health, medicine, engineering and environment. 2011–2015. Available at <http://genderinnovations.stanford.edu/> Accessed January 10, 2015.
- Schoeller EL, Albanna G, Frolova AI, Moley KH. Insulin rescues impaired spermatogenesis via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in Akita diabetic mice and restores male fertility. *Diabetes* 2012;61:1869–1878.
- Schoeller EL, Chi M, Drury A, Bertschinger A, Esakky P, Moley KH. Leptin monotherapy rescues spermatogenesis in male Akita type 1 diabetic mice. *Endocrinology* 2014;155:2781–2786.
- Seethalakshmi L, Menon M, Diamond D. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. *J Urol* 1987;138:190–194.
- Sengenès C, Miranville A, Lalmède K, Curat CA, Bouloumié A. The role of endothelial cells in inflamed adipose tissue. *J Intern Med*. 2007;262:415–421.
- Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*. 2013;4(6):624–630.
- Shaha Ch. (2008). *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Chapter 3. Landes Bioscience and Springer Science Business Media, 46-47.
- Shan L-X, KZhu L-J, Bardin CW, Hardy MP. Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization. *Endocrinology* 1995;136:3856–62.
- Sharma, Rakesh & Agarwal, Ashok. (2013). *Spermatogenesis: An Overview*. 10.1007/978-1-4614-8459-2_8.

- Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, editor; Neill JD, editor. editors. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, Ltd; 1994. p. 1363-434.
- Shupe J, Cheng J, Puri P, Kostereva N, Walker WH. Regulation of sertoli-germ cell adhesion and sperm release by FSH and nonclassical testosterone signaling. *Mol Endocrinol* 2011;25:238–52.
- Sigman M, Jarow JP (1997) Endocrine evaluation of infertile men. *Urology* 50(5):659–664.
- Sikka SC, Wang R (2008) Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Androl* 10(1):134–145.
- Simpson ER 2003 Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:225–230.
- Smith ER, Damassa DA, Davidson JM. Feedback regulation and male puberty: testosterone-luteinizing hormone relationships in the developing rat. *Endocrinology* 1977;101:173–80.
- Smith, L.B. (2015). Chapter 16 – Hormone Signaling in the Testis.
- Stamatiades GA, Kaiser UB. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2018 Mar 05;463:131-141.
- Suckow, M., Weisbroth, S., & Franklin, C. (2005). *The Laboratory Rat, Second Edition* (American College of Laboratory Animal Medicine). Toronto: Academic Press.
- Suman RK, Ray Mohanty I, Borde MK, Maheshwari U, Deshmukh YA. Development of an experimental model of diabetes co-existing with metabolic syndrome in rats. *Adv Pharmacol Sci.* 2016;2016:11.
- T. T. Olar, R. P. Amann, B. W. Pickett, Relationships Among Testicular Size, Daily Production and Output of Spermatozoa, and Extragonadal Spermatozoal Reserves of the Dog, *Biology of Reproduction*, Volume 29, Issue 5, 1 December 1983, Pages 1114–1120, <https://doi.org/10.1095/biolreprod29.5.1114>.
- Tash JA, McGovern JH, Schlegel PN (2000) Acquired hypogonadotropichypogonadism presenting as decreased seminal volume. *Urology* 56:669.
- Tooke, JE, Hannemann, MM. Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome. *J Intern Med* 2000; 247(4): 425–431.
- Treviño, S., Sánchez-Lara, E., Sarmiento-Ortega, V. E., Sánchez-Lombardo, I., Flores-Hernández, J. Á., Pérez-Benítez, A., ... González-Vergara, E. (2015). Hypoglycemic, lipid-lowering and metabolic regulation activities of metforminium decavanadate (H₂Metf)₃ [V₁₀O₂₈]·8H₂O using hypercaloric-induced carbohydrate and lipid deregulation in Wistar rats as biological model. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 147, 85–92. doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.04.002.
- Trindade AA, Simoes AC, Silva RJ, Macedo CS, Spadella CT. Long term evaluation of morphometric and ultrastructural changes of testes of alloxan-induced diabetic rats. *Acta Cir Bras* 2013;28:256–265.
- Tripathy, D, Mohanty, P, Dhindsa, S. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 2003; 52(12): 2882–2887.
- Tschritter, O., Fritsche, A., Shirkavand, F., Machicao, F., Häring, H., & Stumvoll, M. (2003). Assessing the shape of the glucose curve during an oral glucose tolerance test. *Diabetes Care*, 26(4), 1026–1033. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663568>.
- Tsigos, C, Kyrou, I, Chala, E. Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity. *Metabolism* 1999; 48(10): 1332–1335.
- Turcu, A., Smith, J. M., Auchus, R., & Rainey, W. E. (2014). Adrenal androgens and androgen precursors-definition, synthesis, regulation and physiologic actions. *Comprehensive Physiology*, 4(4), 1369–1381. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140006>
- Vanecková, I, Maletínská, L, Behuliak, M. Obesity-related hypertension: possible pathophysiological mechanisms. *J Endocrinol* 2014; 223(3): R63–R78.
- Varlamov O, Bethea CL, Roberts CT., Jr Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:241.
- Ventimiglia E, Capogrosso P, Colicchia M, Boeri L, Serino A, Castagna G, et al. Metabolic syndrome in white European men presenting for primary couple's infertility: investigation of the clinical and reproductive burden. *Andrology*. 2016;4:944–951.
- Vida B, Deli L, Hrabovszky E, et al. Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol* 2010;22:1032–9.
- Viger RS & Robaire B 1995 Steady state steroid 5-reductase messenger ribonucleic acid levels and immunocytochemical localization of the type 1 protein in the rat testis during postnatal development. *Endocrinology* 136 5409–5415.

- Viswanathan P, Wood MA, Walker WH. Follicle-stimulating hormone (FSH) transiently blocks FSH receptor transcription by increasing inhibitor of deoxyribonucleic acid binding/differentiation- 2 and decreasing upstream stimulatory factor expression in rat Sertoli cells. *Endocrinology* 2009;150:3783–91.
- Walker WH. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids*. 2009;74:602–607.
- Watanobe H, Hayakawa Y. Hypothalamic interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, mediate the endotoxin-induced suppression of the reproductive axis in rats. *Endocrinology* 2003;144:4868–75.
- Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, McKinley MJ, Figdor R, Allen AM, et al. Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology*. 1987;121:1562–70.
- Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, et al. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999–2004), 2008. *Arch Int Med*. 168:1617–24.
- Wisse, BE . The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(11): 2792–2800.
- Wong, S. K., Chin, K.-Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A., & Ima-Nirwana, S. (2016). Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutrition & Metabolism*, 13(1). doi:10.1186/s12986-016-0123-9.
- Xu, X., So, J. S., Park, J. G., & Lee, A. H. (2013). Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Seminars in liver disease*, 33(4), 301–311. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1358523>.
- Yanase T., Fan W., Kyoya K., Min L., Takayanagi R., Kato S., et al. (2008) Androgens and metabolic syndrome: Lessons from androgen receptor knock out (ARKO) mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109: 254–257.
- Yki-Järvinen H, Mäkimattila S, Utriainen T, Rutanen EM. Portal insulin concentrations rather than insulin sensitivity regulate serum sex hormone-binding globulin and insulin-like growth factor binding protein 1 in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3227-32.
- Zhang, Y.#, L. Zhong#, B. Xu#, Y. Yang#, R. Ban, J. Zhu, H. J. Cooke, Q. Hao and Q. Shi* (2013). SpermatogenesisOnline 1.0: a resource for spermatogenesis based on manual literature curation and genome-wide data mining. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue): D1055-1062.
- Zitzmann M, Faber S, Nieschlag E. Association of specific symptoms and metabolic risks with serum testosterone in older men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91:4335–4343.
- Zitzmann M. Testosterone deficiency, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Nature reviews Endocrinology*. 2009;5:673–681.

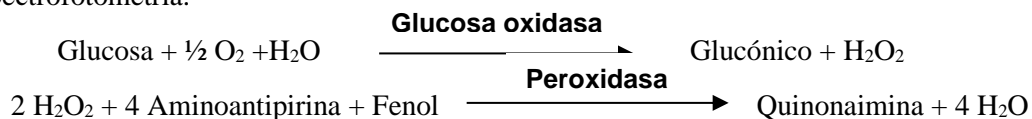
12. Anexos

Anexo I. Determinación de la concentración de glucosa sérica.

Método: De Trinder, Glucosa oxidasa- Peroxidasa. Automatizado

Fundamento:

La glucosa presente en la muestra origina un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



Procedimiento:

Condiciones de ensayo:

Longitud de onda: 505 nm

Temperatura: 37 °C

1. Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada
3. Pipetear en un tubo de ensayo:

	<i>Blanco</i>	<i>Patrón</i>	<i>Muestra</i>
<i>RT (mL)</i>	300	300	300
<i>Patrón (μL)</i>	---	3	---
<i>Muestra (μL)</i>	---	---	3

3. Agitar bien e incubar los tubos durante 5 minutos a 37 °C.
4. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

Cálculos

$$\frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Patrón}} \times 100 (\text{Concentración Patrón}) = \text{mg/dL de glucosa}$$

Anexo 2. Determinación de la concentración de insulina sérica

Método: Ensayo Inmunoenzimométrico

Fundamento:

Los reactivos esenciales requeridos para un ensayo inmunoenzimométrico incluyen anticuerpos de una alta afinidad y especificidad (Ab), (enzima conjugada e inmovilizada), con epitopes de reconocimiento diferentes y distintos, en exceso, y antígeno nativo (Ag). En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo en la superficie del pozo en el micro plato durante la interacción de estreptavidina cubierto sobre el pozo y agregando exógenamente anticuerpo de insulina monoclonal biotinilado. Una vez mezclado el anticuerpo monoclonal biotinilado, el anticuerpo de enzima etiquetada y un suero que contiene el antígeno nativo resulta una reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia o sterio hindrance, para formar un complejo de sándwich soluble. Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a través de la reacción de alta afinidad de estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo-atado es separado del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo-limite es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno.

Procedimiento

1. Saque los micropozos necesarios para cada suero de referencia, controles y muestras. Coloque 50 μL de los sueros de referencia, controles y muestras en los pozos correspondientes.
2. Agregue 100 μL de la solución del Reactivo de la Enzima de Insulina a todos los pozos y golpear suavemente uno de los extremos de la microplaca por 20- 30 segundos para mezclar. Selle la microplaca con una cubierta de plástico.
3. Incube por 120 minutos a temperatura ambiente (20-27 °C)
4. Deseche el contenido de la microplaca por decantación o aspiración.
5. Agregue 300 μL de la solución de lavado. Repita dos (2) veces adicionales.
6. Agregue 0.100 mL (100 μL) de la solución de sustrato a todos los pozos
7. Incube en la temperatura ambiente por quince (15) minutos.
8. Agregue 0.050 mL (50 μL) de la solución de paro a cada pozo y mezcle suavemente por 15-20 segundos. Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.
9. Lea la absorbancia en cada pozo a 450nm (con una longitud de onda de referencia de 620-630nm para reducir al mínimo imperfecciones del pozo) en un lector de microplacas. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de haber agregado la solución de paro.

Cálculos

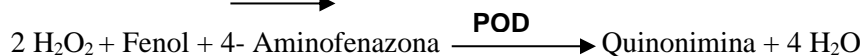
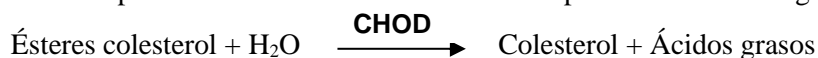
Una curva en la reacción se usa para comprobar la concentración de insulina en especímenes desconocidos. Registre la absorbancia obtenida del listado del lector de microplacas. Trace la absorbancia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de Insulina en $\mu\text{IU/mL}$. Calcule la ecuación de la línea recta para la curva de calibración.

Anexo 3. Determinación de la concentración de colesterol total sérico

Método: CHOD-POD, líquido. Automatizado

Fundamento:

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada.

Procedimiento

Condiciones de ensayo:

Longitud de onda: 505 nm

Temperatura: 37 °C

4. Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.
5. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada
6. Pipetear en un tubo de ensayo:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	300	300	300
Patrón (µL)	---	3	---
Muestra (µL)	---	---	3

3. Agitar bien e incubar los tubos durante 10 minutos a 37 °C.
4. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

Cálculos

$$\frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Patrón}} \times 100 \text{ (Concentración Patrón)} = \text{mg/dL de colesterol}$$

Anexo 4. Determinación de la concentración de triglicéridos séricos

Método: GPO-POD, líquido. Automatizado

Fundamento:

La concentración sérica de triglicéridos, se realizó por química líquida mediante reacciones acopladas que corresponde a una reacción coloreada que se evalúa por espectrofotometría, en la cual los triglicéridos se hidratan mediante una lipasa, en la cual se obtienen glicerol y ácidos grasos libres, el glicerol reacciona con ATP contenido en el reactivo reacción propiciada por la enzima glicerol cinasa, resultando glicerol-3-fosfato y ADP, el glicerol-3-fosfato se oxida por una reacción acoplada por una G-3-P-oxidasa dicha reacción tiene por productos dihidroxiacetona-P y peróxido de hidrógeno, este reacciona a su vez con 4-aminoantipirina y 4- clorofenol mediante una peroxidasa obteniéndose una reacción coloreada de quinonaimina que es medida a una longitud de onda de 505 nm.

Procedimiento

Condiciones de ensayo:

Longitud de onda: 505 nm

Temperatura: 37 °C

7. Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.
8. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada
9. Pipetear en un tubo de ensayo:

	<i>Blanco</i>	<i>Patrón</i>	<i>Muestra</i>
<i>RT (mL)</i>	300	300	300
<i>Patrón (μL)</i>	---	3	---
<i>Muestra (μL)</i>	---	---	3

3. Agitar bien e incubar los tubos durante 5 minutos a 37 °C.
4. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

Cálculos

$$\frac{Abs\ Muestra}{Abs\ Patrón} \times 100 \text{ (Concentración Patrón)} = \text{mg/dL de triglicéridos}$$

Anexo 5. Determinación de la concentración de Fructosamina

Método: NBT, colorimétrico

Fundamento:

El ensayo de fructosamina es una prueba colorimétrica que determina el grado de glicación de las proteínas del suero al medir la actividad reductora del suero en solución alcalina generando como productos de oxidación a la N-Caroximetil-Lisina y N8-(3-Lactato)-Lisina. La prueba se basa en la capacidad de los compuestos de Amadori para reducir el tetrazolio de nitro azul (NBT), que genera un colorante formazan muy coloreado (morado). La medición de Fructosamina tiene utilidad para conocer retrospectivamente dos a tres semanas el nivel de concentración de glucosa en sangre.

Procedimiento

1. Atemperar los reactivos a temperatura ambiente.
2. Pipetear en tubos de ensaye:
Reactivo A: 500 µL
Muestra/Patrón: 5 µL
Reactivo B: 500 µL
3. Mezclar bien e incubar inmediatamente a 37 °C, poner en marcha el cronometro.
4. Leer la absorbancia de la muestra y el patrón a 530 nm exactamente a los 10 minutos (**A1**) y a los 15 minutos (**A2**) de incubación, frente a agua destilada.

Cálculos

$$\frac{(A2-A1) \text{ Muestra}}{(A2-A1) \text{ Patrón}} \times 624 \text{ (Concentración Patrón)} = \mu\text{mol/L de fructosamina}$$

Anexo 6. Determinación de la concentración de colesterol HDL reactivo precipitante

Método: Reactivo precipitante

Fundamento:

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y baja densidad (LDL) del suero o plasma, se precipitan con fosfotungstato en presencia de iones magnesio. Tras la centrifugación, el sobrenadante contiene lipoproteínas de alta densidad (HDL). La fracción de HDL colesterol se determina utilizando el reactivo enzimático de colesterol total.

Procedimiento

1. Condiciones de ensayo:

Longitud de onda: 505 nm.

2. Agregar en un tubo de ensayo:

Reactivo: 25 µL

Suero: 250 µL

3. Mezclar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar 2 min a 12 rpm
5. Recoger el sobrenadante y procesar como muestra en la determinación de colesterol total.

NOTA: Es muy importante formar el sobrenadante del menisco formado en el tubo, para ello no introducir demasiado la punta y no arrastrar las fracciones VLDL y LDL.

Cálculos

Seguir las instrucciones detalladas en el inserto de colesterol:

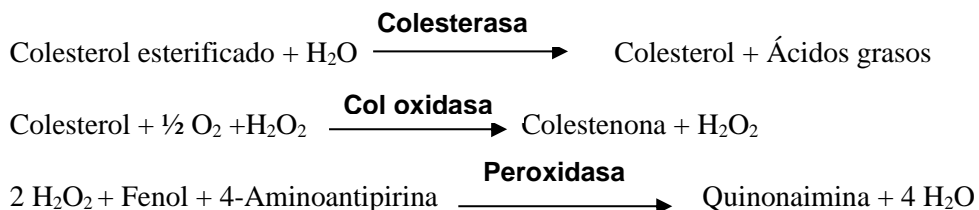
$$\frac{Abs\ Muestra}{Abs\ Patrón} \times 100 \text{ (Concentración Patrón)} = \text{mg/dL de colesterol}$$

Anexo 7. Determinación de la concentración de colesterol LDL reactivo precipitante

Método: Reactivo precipitante

Fundamento:

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) presentes en la muestra, precipitan en presencia de fosfotungstato y iones magnesio. El sobrenadante contiene las lipoproteínas de elevada densidad (HDL), cuyo colesterol se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación:



Procedimiento

1. Pipetear en un tubo de ensaye:
Reactivo: 100 μL
Suero: 200 μL
2. Agitar bien y dejar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar 2 min a 12,000 rpm.
4. Recoger cuidadosamente el sobrenadante y procesar como muestra en la determinación de colesterol total.

NOTA: El sobrenadante debe ser completamente claro. En caso de persistir la turbidez o de no obtener una buena sedimentación del precipitado, adicionar otros 200 μL de reactivo, mezclar bien y centrifugar de nuevo. Multiplicar el resultado obtenido por 1.3 para corregir la dilución efectuada.

Cálculos

La concentración de colesterol en el sobrenadante se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Patrón}} \times 100 (\text{Concentración Patrón}) \times \text{Factor de dilución} = \text{mg/dL de colesterol}$$

Anexo 8. Determinación de la concentración de ácidos grasos libres

Método: Colorimétrico

Fundamento:

Está basado en la formación de sales metálicas de los ácidos y la posterior estimación del metal en los jabones extraídos con un reactivo de color adecuado. La extracción se realiza con cloroformo. Esta afinidad se mejora con alcohol y con el nitrato de cobre. El cobre presente durante la extracción reacciona primero con los ácidos grasos libres generando jabones de cobre, estos son extraídos con el cloroformo. La trietanolamina proporciona un medio básico y favorece la formación de complejos de cobre. La forma en cómo se agita la muestra durante la extracción es de suma importancia, siendo la mezcla vertical en vortex a velocidad media la manera ideal. Se utiliza en una solución con etanol o isopropanol en una relación 1:1 y se desarrolla un color de baja intensidad. El color aparece inmediatamente después de agregar la solución de amoníaco y aumenta rápidamente dependiendo de la concentración de ácidos grasos presentes en la muestra y permanece estable al menos por 25 minutos.

Reactivos

- Cloroformo
- Reactivo de cobre: Consiste en $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 40,0 g/litro; trietanolamina 99%, 120,0 ml/L (135,0 g/L). Se disuelve el nitrato cúprico en 500 ml de agua destilada, agregue la trietanolamina y diluir a 1 litro con agua destilada.
- Reactivo cuprizona. Este consiste en ácido oxálico-bis (cyclohexylidenehydrazide), 0.40 g/litro de isopropanol. Disolver la cuprizona en 10 mL de cloroformo y se diluye con isopropanol para 1 L.
- Reactivo amoníaco. 100 mL de una solución al 58% de NH_4OH (concentrado) se diluye hasta 1 L con agua destilada agua.

Procedimiento

1. Añadir 50 μL de suero en un tubo de ensayo
2. A un tubo semejante, se añaden 50 μL de estándar de ácido oleico.
3. Para otro tubo de ensayo añadir 100 μL de agua, este será el blanco de reactivo.
4. Para todos los tubos añadir 150 μL de reactivo de cobre y 1 ml de cloroformo.
5. Coloque los tubos verticalmente en un vortex y agite por 10 min.
6. Centrifugar los tubos 10 minutos a 1500 rpm.
7. Extraer las fases de cloroformo en otros tubos de ensayo cuidando el no extraer la fase acuosa de color azul.
8. De cada tubo, pipetear 500 μL de extracto de cloroformo y colocar en un nuevo tubo, la evaporación debe mantenerse a un mínimo.
9. A cada tubo, añadir 450 μL de reactivo cuprizona, tapar y agitar suavemente.
10. A cada tubo, añadir 50 μL de solución de amoníaco, tapar y agite suavemente.
11. Lea la absorbancia a 620 nm (frente a un blanco a cero de absorbancia) 10 minutos después de agitar con la solución de amoníaco. Si aparece un precipitado azul, agitar la cubeta enérgicamente para redispersarlo y leer la absorbancia.

Cálculos

El ácido graso libre (FFA) contenido se calcula:

$$\text{Concentración en mg/dl} = (\text{Abs muestra} / \text{Abs estándar}) \times 8.6 \text{ mg/dL}$$

Anexo 9. Determinación de la concentración de Hormona Luteinizante

Método: Inmunoensayo enzimático

Fundamento:

La prueba cuantitativa de LH está basada en un ensayo inmunoabsorbente vinculado a las enzimas de fase sólida (ELISA). El ensayo utiliza un anticuerpo anti-ratón- α LH para la inmovilización de la fase sólida (micropozos) y un anticuerpo anti- β -LH monoclonal de ratón en la solución de conjugado (peroxidasa de rábano picante) del anticuerpo-enzima. La muestra de prueba es permitida reaccionar simultáneamente con los anticuerpos, causando que las moléculas de LH se encuentren entre la fase sólida y los anticuerpos vinculados a las enzimas. Después de una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente, los pozos son lavados con agua para remover los anticuerpos etiquetados no adheridos. Una solución de TMB es agregada e incubada por 20 minutos, provocando el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color es frenado con la adición de Solución de paro, y el color es cambiado a amarillo y medido espectrofotométricamente a 450 nm. La concentración de LH es directamente proporcional a la intensidad del color de la muestra de prueba.

Procedimiento

1. Agregue **150 μ L** de la muestra en los pozos, en el caso del estándar adicione 50 μ L.
2. Dispense 100 μ L de Reactivo de enzima conjugada en cada pozo.
3. Mezcle cuidadosamente por **99 segundos**. Es muy importante tener un mezclado completo en este paso.
4. Incube a temperatura ambiente (18 - 25 °C) por **90 min (Agitar 99 segundos cada 10 min hasta completar los 90 min de incubación)**.
5. Remueva la mezcla incubada dando pequeños golpes y vierta el contenido de la placa en un contenedor para desechos.
6. Lave y dé pequeños golpes a la placa de microtira 5 veces con **agua destilada**.
7. Sobre un papel o toalla absorbente remueva las gotas residuales.
8. Agregue 100 μ L de Reactivo TMB en cada pozo y agite suavemente por 10 segundos.
9. Incube a temperatura ambiente en la oscuridad por **30 minutos**.
10. Detenga la reacción añadiendo 100 μ L de solución de paro a cada pozo.
11. Mezclar cuidadosamente por 30 segundos. Es importante asegurarse que todo el color azul cambie a color amarillo totalmente.
12. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de Micro-Elisa dentro de un plazo no mayor a 15 minutos.

NOTA IMPORTANTE: EL procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente resulta en una pobre precisión y absorbancias falsamente elevadas.

Cálculos

Calcule el valor de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, especímenes, controles, y muestras. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida de cada estándar de referencia comparada con su concentración en **mIU/ mL**.

Anexo 10. Determinación de la concentración de Hormona Folículo Estimulante

Método: Inmunoensayo enzimático

Fundamento:

La prueba cuantitativa de FSH está basada en un ensayo inmunoabsorbente vinculado a la enzima de fase sólida (ELISA). El sistema de ensayo utiliza un anticuerpo anti- α -FSH monoclonal de ratón para la inmovilización de la fase sólida (pozos de microvaloración) y otro anticuerpo anti- β -FSH monoclonal de ratón en la solución de conjugado (peroxidasa de rábano picante) enzima- anticuerpo. La muestra de la prueba es permitida reaccionar simultáneamente con los dos anticuerpos, causando que las moléculas de FSH se encuentren entre la fase sólida y los anticuerpos enlazados a las enzimas. Después de una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente, los pozos son lavados con agua para remover los anticuerpos sin adherir etiquetados. Una solución de TMB es agregada e incubada a temperatura ambiente por 20 minutos, provocando el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color es frenado con la adición de 1N HCl, cambiando el color a amarillo. La concentración de FSH es directamente proporcional a la intensidad de color de la muestra de la prueba.

Procedimiento

1. Agregue **150 μ L** de la muestra en los pozos, en el caso del estándar adicione 50 μ L.
2. Dispense 100 μ L de Reactivo de enzima conjugada en cada pozo.
3. Mezcle cuidadosamente por **99 segundos**. Es muy importante tener un mezclado completo en este punto.
4. Incube a temperatura ambiente (18 - 25 °C) por **90 min (Agitar 99 segundos cada 10 min hasta completar los 90 min de incubación)**.
5. Remueva la mezcla incubada dando pequeños golpes y vierta el contenido de la placa en un contenedor para desechos.
6. Lave y dé pequeños golpes a la placa de microtira 5 veces con **agua destilada**.
7. Sobre un papel o toalla absorbente remueva las gotas residuales.
8. Agregue 100 μ L de Reactivo TMB en cada pozo y agite suavemente por 10 segundos.
9. Incube a temperatura ambiente en la oscuridad por **30 minutos**.
10. Detenga la reacción añadiendo 100 μ L de solución de paro a cada pozo.
11. Mezclar cuidadosamente por 30 segundos. Es importante asegurarse que todo el color azul cambie a color amarillo totalmente.
12. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de Micro-Elisa dentro de un plazo no mayor a 15 minutos.

NOTA IMPORTANTE: EL procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente resulta en una pobre precisión y absorbancias falsamente elevadas.

Cálculos

Calcule el valor de absorbancia media (A450) para cada juego de estándares de referencia, especímenes, controles, y muestras. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida de cada estándar de referencia comparada con su concentración en **mIU/mL**.

Anexo 11. Determinación de la concentración de Estradiol

Método: Inmunoensayo enzimático

Fundamento:

El E2 está basado en el principio de adherencia competitiva entre E2 en el espécimen de prueba y el conjugado de E2–HRP para una cantidad constante de anti-estradiol de conejo. En la incubación, los pozos revestidos de IgG anti-conejo de cabra son incubados con 25µl de estándares de E2, controles, y muestras de paciente, 100µL de Reactivo de Conjugado de Estradiol-HRP y 50 µL de reactivo anti-Estradiol de conejo a 37 °C por 90 minutos. Durante la incubación, una cantidad fijada de E2 etiquetado de HRP compite con el E2 endógeno en el estándar, muestra, o suero de control de calidad para un número fijo de sitios de adherencia del anticuerpo de E2 específico. Así, la cantidad de conjugado de peroxidasa de E2 inmunológicamente adherida al pozo disminuye progresivamente conforme la concentración de E2 en el espécimen aumenta. El conjugado de peroxidasa de E2 no adherido es después removido y los pozos son lavados. Después, una solución de TMB es agregada e incubada a temperatura ambiente por 20 minutos, provocando el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color es frenado con la adición de 1N HCl, y la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 450nm. La intensidad del color formada es proporcional a la cantidad de enzima presente y está inversamente relacionada con la cantidad de E2 no etiquetado en la muestra.

Procedimiento

1. Agregue **50 µL suero / tejido** de la muestra en los pozos, en el caso del estándar adicione 50 µL.
2. Agregue 50 µL del reactivo anti-estradiol de conejo en cada pozo.
3. Agregue 100 µL del reactivo de conjugado de estradiol-HRP en cada pozo.
4. Mezcle cuidadosamente por **99 segundos** y después **cada 10 minutos** hasta transcurrir el tiempo de incubación.
5. Incube a temperatura ambiente (18 - 25 °C) por **90 minutos**.
6. Enjuague y sacuda suavemente los pozos 5 veces con **agua destilada**.
7. Agregue 100 µL de Reactivo TMB en cada pozo y agite suavemente por 10 segundos.
8. Incube a temperatura ambiente en la oscuridad por **15 minutos / 20 minutos**.
9. Detenga la reacción añadiendo 100 µL de solución de paro a cada pozo.
10. Mezclar cuidadosamente por 30 segundos. Es importante asegurarse que todo el color azul cambie a color amarillo totalmente.
11. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de Micro-Elisa dentro de un plazo no mayor a 15 minutos.

NOTA IMPORTANTE: EL procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente resulta en una pobre precisión y absorbancias falsamente elevadas.

Cálculos

Calcule el valor de absorbancia media (A450) para cada juego de estándares de referencia, controles, y muestras. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en **pg/mL**.

Anexo 12. Determinación de la concentración de Testosterona total

Método: Inmunoensayo enzimático

Fundamento:

La prueba de testosterona EIA está basada en el principio competitivo entre la testosterona en la muestra y el conjugado de testosterona-HRP por un constante aumento en la cantidad de anti-testosterona de conejo. En la incubación los pozos recubiertos de cabra anti-IgG de conejo son incubados con 10 µL de estándar de testosterona, controles, muestras del paciente, 100 µL de testosterona-HRP reactivo conjugado con 50 µl de reactivo anti-testosterona de conejo a 37° C por 90 minutos. Durante la incubación un aumento fijado de HRP-etiquetado de testosterona establece una competencia con la testosterona endógena, en él estándar, muestra o control de calidad del suero para fijar un número de sitios unidos en el anticuerpo específico de la Testosterona. Las no-uniones del conjugado peroxidasa de testosterona son ahora removidas de los micro pozos por medio de los lavados. Al agregar el reactivo TMB, éste es responsable de dar el color azul en una incubación a temperatura ambiente por 20 minutos. El desarrollo del color es detenido al adicionar la solución de paro (HCl) y la absorbancia es medida a 450 nm. La intensidad del color que se forme es proporcional a la cantidad de enzima presente e inversamente proporcional a la cantidad de testosterona en la muestra.

Procedimiento

1. Dispensar **25 µL de suero / tejido**, estándares y controles en los pozos apropiados.
2. Dispensar 50 µL de Reactivo anti-Testosterona de conejo en cada pozo.
3. Mezcle agitando suavemente por **99 segundos**. Es muy importante que el mezclado sea completo.
4. Dispensar 100 µL del reactivo conjugado de testosterona HRP en cada pozo.
5. Incubar a 37°C por **90 minutos**.
6. Lave y enjuague la microplaca 5 veces con agua destilada.
7. Agregar 100 µL de reactivo TMB dentro de cada pozo. Mezclar cuidadosamente por 10 segundos.
8. Incubar a temperatura ambiente (18-22 °C) durante **15 minutos**.
9. Para detener la reacción agregue 100 µL de solución de paro a cada pozo.
10. Mezcle cuidadosamente por 30 segundos. Es importante asegurar que todo el color azul cambie al amarillo completamente.
11. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de micro pozos dentro de un lapso de 15 minutos.

NOTA IMPORTANTE: El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente puede tener poca precisión y absorbancias elevadamente falsas. Si existen burbujas dentro de los pozos, se crearán lecturas falsas. De favor utilice agua destilada para remover las burbujas antes de agregar el sustrato.

Cálculos

Calcule los valores de absorbancia media (A450) para cada juego de estándares de referencia, control, y muestras. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en **ng/mL**.

Anexo 13. Determinación de la concentración de Testosterona libre

Método: Inmunoensayo enzimático

Fundamento:

El principio de la siguiente prueba de inmunoensayo enzimático sigue el típico escenario de unión competitiva. La competencia ocurre entre un antígeno no marcado (presente en estándares, controles y muestras de pacientes) y un antígeno marcado con enzima (conjugado) para un número limitado de sitios de unión de anticuerpos en la microplaca. Los procedimientos de lavado y decantación eliminan los materiales no unidos. Después de la etapa de lavado, se agrega el sustrato enzimático. La reacción enzimática se termina mediante la adición de la solución de paro. La absorbancia se mide en un lector de placa de microtitulación. La intensidad del color formado es inversamente proporcional a la concentración de testosterona libre en la muestra. Se utiliza un conjunto de estándares para trazar una curva estándar a partir de la cual se puede leer directamente la cantidad de testosterona libre en muestras de pacientes y controles. Se utiliza un anticuerpo policlonal anti-testosterona de conejo altamente específico con una baja capacidad de unión (concentración K_{eq} x) para mantener las alteraciones mínimas del equilibrio de la testosterona. Los otros componentes en el sistema de prueba también están optimizados para no alterar la concentración original de testosterona libre.

Procedimiento

1. Prepare la solución de trabajo del conjugado de testosterona libre-HRP:

Solución de trabajo 1:50

2 μ L concentrado 50X + 100 μ L de buffer por muestra

2. Agregue **25 μ L de suero / 50 μ L tejido** en los pozos apropiados.
3. Adicione 100 μ L del conjugado de la solución de trabajo y agite suavemente durante **99 segundos**.
4. Incubar a 37°C por **60 minutos**.
5. Lave y enjuague la microplaca 3 veces con agua destilada.
6. Agregar 150 μ L de reactivo TMB dentro de cada pozo. Mezclar cuidadosamente por 10 segundos.
7. Incubar a 37 °C durante **20 minutos**.
8. Para detener la reacción agregue 50 μ L de solución de paro a cada pozo y mezcle cuidadosamente por 30 segundos.
9. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de micro pozos dentro de un lapso de 15 minutos.

NOTA IMPORTANTE: El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente puede tener poca precisión y absorbancias elevadamente falsas. Si existen burbujas dentro de los pozos, se crearán lecturas falsas. De favor utilice agua destilada para remover las burbujas antes de agregar el sustrato.

Cálculos

Calcule los valores de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, control, y muestras. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en **pg/mL**.

Anexo 14. Determinación de la concentración de Androstenediona

Método: Inmunoensayo enzimático

Fundamento:

La Androstenediona (antígeno) en la muestra compite con la Androstenediona antigénica conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) para unirse a un número limitado de anticuerpos anti-Androstenediona recubiertos en la microplaca (fase sólida). Después de la incubación, la eliminación del antígeno no unido se realiza mediante un simple lavado en fase sólida. Luego, la enzima HRP en la fracción unida reacciona con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB y desarrolla un color azul que cambia a amarillo cuando se agrega la solución de paro (H_2SO_4). La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de androstenediona en la muestra.

Procedimiento

1. Permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.
2. Las tiras de micropocillos recubiertos no utilizados deben liberarse de manera segura en la bolsa de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2-8 °C.
3. Prepare como se indica a continuación:

Reactivo	Calibrador	Muestra / control	Blanco
Muestra/ control		25 μ L	
Calibrador C0 - C5	25 μ L		
Conjugado	200 μ L	200 μ L	

4. Incubar a 37 °C durante **60 minutos**.
5. Retire el contenido de los pozos, lave 3 veces con agua destilada.
6. Agregare:

TMB	100 μ L	100 μ L	100 μ L
-----	-------------	-------------	-------------

7. Incube a temperatura ambiente durante 15 minutos.
8. Adicione:

Solución de paro	100 μ L	100 μ L	100 μ L
------------------	-------------	-------------	-------------

9. Lea la absorbancia a 450 nm en 5 minutos.

Cálculos

Calcule los valores de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, control, y muestras. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en **ng/mL**.

Anexo 15. Deshidratación y embebido en parafina

🚩 Fundamento:

Se realiza el proceso de fijación para detener la vida de las células e impedir las modificaciones *postmortem* que puedan sufrir las células (procesos autolíticos) manteniendo la estructura morfológica de las células y tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos. Esto se consigue inmovilizando las moléculas proteicas e inhibiendo principalmente las enzimas al hacerlas insolubles. Esta acción garantiza la integridad celular y de los tejidos, se efectúa con el uso de agentes fijadores como lo es la formalina. Después de la fijación y el lavado de las muestras, son deshidratadas e infiltradas con el solvente de la sustancia de inclusión con la finalidad de extraer o remover el agua de los tejidos, para ello se someten las muestras en baños sucesivos en soluciones de concentraciones crecientes de alcohol etílico.

Las parafinas son hidrocarburos saturados provenientes de la destilación del petróleo. La penetración de la parafina a interior de los tejidos se efectúa cuando esta se encuentra en estado líquido. El primer recipiente con parafina recibirá a las muestras embebidas en xilol, la parafina reemplazará el xilol de las muestras y se infiltrará al interior de estas, la parafina 3 servirá como contenedor de las muestras.

🚩 Procedimiento

1. Los tejidos extraídos fueron resguardados en formalina al 4% en PBS 1X, 96 horas antes de la deshidratación se cambiaron a una solución tamponada con formalina al 10%
2. Los tejidos fueron cortados a la mitad y colocados en casets para inclusión y rotulados con lápiz.
3. Realizar el siguiente tren de deshidratación:
 - 45 minutos en PBS 1X para limpiar la formalina del tejido
 - 1 hora en alcohol al 80%
 - 1 hora en alcohol al 96%-1
 - 1 hora en alcohol al 96%-2
 - 1 hora en alcohol al 100%-1
 - 1 hora en alcohol al 100%-2
 - 1 hora en alcohol-xilol (1:1)
 - 1 hora en xilol 1
 - 1 hora en xilol 2
 - 1 hora en parafina 1 (en baño maría a 50 – 55 °C)
 - 1 hora en parafina 2 (en baño maría a 50 – 55 °C)
 - 1 hora en parafina 3 (en baño maría a 50 – 55 °C)
 - Inclusión con paraplast

Anexo 16. Tinción de Hematoxilina-Eosina

Fundamento:

Esta técnica utiliza dos colorantes: en primer lugar, los cortes se someten a la acción de la hematoxilina, colorante básico, que se une a cualquier sustancia que tenga grupos ácidos, tales como los grupos fosfato del ADN y a las proteínas nucleares que poseen carga negativa. A continuación, los cortes se someten a la acción de la eosina, colorante débilmente ácido, que colorea a las estructuras básicas. Aquellas estructuras con un pH intermedio se teñirán con ambos colorantes. Esencialmente la hematoxilina tiñe los núcleos de color azul negruzco, con buen detalle intracelular, mientras que la eosina tiñe el citoplasma celular y la mayoría de las fibras del tejido conectivo con distintas tonalidades de rosa, naranja y rojo.

Procedimiento

1. Proceso de hidratación:
 - Xilol 1: 15 minutos
 - Xilol 2: 10 minutos
 - Xilol-álcohol (1:1): 15 baños
 - Etanol absoluto 1: 15 baños
 - Etanol absoluto 2: 15 baños
 - Etanol 96% 1: 15 baños
 - Etanol 96% 2: 15 baños
 - PBS 1X: 15 baños
2. Hematoxilina de Harris durante 15 minutos.
3. Enjuagar con agua corriente.
4. Pasar por alcohol ácido (alcohol al 70% con 1% de HCl concentrado).
5. Enjuagar con agua corriente.
6. Realizar el vire de la hematoxilina en una solución de carbonato de litio (1%: 0.5 g en 50 mL de agua destilada).
7. Enjuagar con agua corriente.
8. Hacer la contra tinción con eosina amarillenta durante 10 segundos y enjuagar.
9. Realizar el proceso de deshidratación:
 - Etanol 96% 2: 15 baños
 - Etanol 96% 1: 15 baños
 - Etanol absoluto 2: 15 baños
 - Etanol absoluto 1: 15 baños
 - Xilol-álcohol (1:1): 15 baños
 - Xilol 2: 5 minutos
 - Xilol 1: 5 minutos
10. Montar con resina y dejar secar toda la noche.

Anexo 17. Naranja de Acridina

Fundamento:

El NA tiene propiedades metacromáticas y, tras la excitación con luz azul, (~ 488 nm) emite fluorescencia verde cuando está en forma de monómero y fluorescencia naranja cuando está en forma de dímero. En las células vivas, el NA se difunde a través de la membrana citoplasmática y se retiene en los compartimentos celulares con un pH bajo, lo que produce una fluorescencia naranja brillante de los lisosomas cuando se excita con una luz azul. También se intercala con las moléculas de ARN citoplasmático y nuclear y da como resultado una fluorescencia verde difusa dentro de todas las células. El NA no se intercala con el ADN de las células vivas intactas y no se acumula en otros orgánulos no ácidos, como las mitocondrias, el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi.

Tanto en las células permeabilizadas fijas como en las que sufren apoptosis, se pierde la compartimentación del pH. Por lo tanto, el NA se libera de los lisosomas ácidos y se une difusamente a las moléculas de ARN y ADN, lo que produce fluorescencia amarillo-naranja en toda la célula. Basado en las distinciones espectrales únicas y la tinción diferencial de las moléculas de ARN y ADN, el NA puede usarse para distinguir etapas de apoptosis y necroptosis. Durante la apoptosis, las células teñidas con NA demuestran contracción nuclear, fragmentación celular y pérdida de demarcación nuclear, apareciendo, por lo tanto, como glóbulos rojos. Finalmente, el ARN celular y la emisión roja del NA se pierden mientras permanece el núcleo verde fragmentado. En contraste, durante la necrosis o necroptosis, la señal lisosómica naranja se pierde debido a su disrupción y a la pérdida de ARN celular, mientras que la señal verde de los núcleos lisos y encogidos permanece.

1. Proceso de hidratación:

- Xilol 1: 15 minutos
- Xilol 2: 10 minutos
- Xilol-álcohol (1:1): 15 baños
- Etanol absoluto 1: 15 baños
- Etanol absoluto 2: 15 baños
- Etanol 96% 1: 15 baños
- Etanol 96% 2: 15 baños
- PBS 1X: 15 baños

2. Agregar 50 μ L de una solución de naranja de acridina en un buffer de TKM durante 5 minutos.
3. Retirar el NA y lavar 5 veces con PBS-T.
4. Dejar secar los tejidos y agregar 25 μ L de Vectashield, colocar un cubreobjetos, dejar secar y sellar con barniz de uñas transparente.

Anexo 18. Inmunohistoquímica

Fundamento:

La inmunohistoquímica (IHC) es un método para detectar la localización de las proteínas y otros antígenos en secciones de tejido usando anticuerpos. En general, los datos IHC proporcionan una perspectiva valiosa que puede ayudar a interpretar los datos obtenidos mediante otros métodos. La clave para la tinción inmunohistoquímica de alta calidad es la especificidad del anticuerpo utilizado. Un anticuerpo altamente específico se unirá sólo a la proteína de interés en la sección de tejido. La interacción antígeno-anticuerpo se visualiza usando la detección ya sea cromógeno o fluorescente. En la detección cromogénico, el anticuerpo se conjuga a una enzima que escinde un sustrato para producir un precipitado coloreado en la ubicación de la proteína. En la detección fluorescente, el anticuerpo está conjugado con un fluoróforo que se puede visualizar mediante microscopía de fluorescencia.

Procedimiento

Las laminillas con tejidos se rotulan adecuadamente y se lleva a cabo el proceso de hidratación, que consiste en colocar los tejidos en xilol durante 15 minutos con la finalidad de quitar la parafina, enseguida se realizan 15 baños en otra solución de Xilol, luego en una solución de Alcohol-Xilol en una relación 1:1, de la misma manera 15 baños. Posteriormente en una solución de alcohol absoluto 1, alcohol absoluto 2, alcohol 96% 1 y alcohol 96% 2, realizando 15 baños en cada una de ella y finalmente se lavan con agua destilada tres veces y se mantienen en buffer de fosfatos (PBS). Después, se realiza la recuperación antigénica utilizando una solución Diva Decloaker de la marca comercial BioCare en una dilución 1:10 durante 40 minutos a 60 °C. Culminado el tiempo, las laminillas se dejan enfriar hasta llegar a una temperatura ambiente y se prosigue con el bloqueo; el cual se realiza con una solución de albumina libre de inmunoglobulinas al 1.0% en solución salina isotónica durante 2 horas, luego se realizan tres lavados con PBS 1X y se coloca el anticuerpo primario con la dilución y tiempo de incubación que se muestran a continuación:

Anticuerpo Primario	Dilución	Tiempo de Incubación	Anticuerpo Secundario	Dilución	Tiempo de incubación
<i>Anti-ARO producido en conejo</i>	<i>1:100</i>	<i>40 h</i>	<i>FITC</i>	<i>1:200</i>	<i>4 h</i>
<i>Anti-POR producido en conejo</i>	<i>1:100</i>	<i>40 h</i>	<i>FITC</i>	<i>1:200</i>	<i>4 h</i>
<i>anti-rFSH producido en conejo</i>	<i>1:100</i>	<i>40 h</i>	<i>FITC</i>	<i>1:200</i>	<i>4 h</i>
<i>anti-rEa producido en conejo</i>	<i>1:200</i>	<i>40 h</i>	<i>FITC</i>	<i>1:200</i>	<i>4 h</i>
<i>anti-rEβ producido en conejo</i>	<i>1:150</i>	<i>18 h</i>	<i>RODAMINA</i>	<i>1:150</i>	<i>2 h</i>
<i>anti-rA producido en conejo</i>	<i>1:70</i>	<i>18 h</i>	<i>RODAMINA</i>	<i>1:100</i>	<i>2 h</i>

Transcurrido el tiempo de incubación se realizan 5 lavados con PBS 1X y se adiciona el anticuerpo secundario conjugado con Rodamina y FITC en condiciones de obscuridad todo el tiempo (ver tabla con las condiciones de cada anticuerpo). Finalmente, se utiliza el medio de montaje Vectashield con DAPI para inhibir el foto-blanqueo de los conjugados fluorescentes y para teñir los núcleos celulares respectivamente.

