BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“**Efecto del clonazepam sobre la calidad espermática en ratones bajo una condición de estrés crónico**”

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO (A) EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
MIGUEL ÁNGEL BENÍTEZ LUNA

DIRECTOR (A):
D.C JUAN CARLOS FLORES ALONSO

Entrega: Octubre 2020

Agradecimientos

A) **Facultad de Biología, licenciatura en Biotecnología:** Donde adquirí mi formación académica como licenciado en Biotecnología.
B) **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP):** Por haberme permitido realizar y finalizar mis estudios de licenciatura en Biotecnología.
C) **Centro de investigación Biomedicina de Oriente (CIBIOR):** Por su apoyo para la realización de esta investigación científica, en particular al laboratorio de biología celular. Como también, en el financiamiento de este proyecto.
D) **Dr. Juan Carlos Flores Alonso:** Le agradecer su apoyo por haberme conducido en esa idea que se nos ocurrió en su clase, la cual recuerdo como una de las asignaturas que más disfrute y aproveche en mi formación como biotecnólogo. Le agradezco por su paciencia y confianza por haberme esperado en mi intercambio y finalizar mi investigación. Además, haberme comprendido en estos últimos meses por el fallecimiento de un familiar. Finalmente, haberme conducido correctamente en esta investigación.
E) **MC Pablo López de Jesús:** Por haberme asesorado en técnicas de laboratorio, lo que permitió parte del desarrollo experimental en esta investigación.
F) **MC Germán León:** Por haberme aconsejado en términos relacionados con la biología de la reproducción.
G) **Dr. Carlos Carabarin Lima:** Por todos los conocimientos que adquirí en sus clases y por haberme motivado para irme de intercambio.
H) **Dra. Cristina Lara Ochoa:** Por haber sido una excelente docente y haberme compartido sus amplios conocimientos en biología molecular y apoyarme en mi proceso de intercambio.

Dedicatoria

María Lorena Luna Guevara (Mi mamá): Le dedico esta tesis por enseñarme a no rendirme y siempre haber escuchado mis ocurrencias. Además, por haberme aconsejado a lo largo de mi educación y guiarme en todas las etapas de mi vida. Como también, siempre apoyarme en superarme personalmente día con día, para ello, demostrarme que "éxito" es sinónimo de esfuerzo. Finalmente, me gustaría recalcar, que siempre ha sido una excelente madre y que soy muy afortunado en venir a este mundo acompañado por ella. *Te amo mucho Mami*

Julio Benítez Fuentes (Mi papá): Le dedico esta tesis por ser un ejemplo de esfuerzo y haberme apoyado en este proceso educativo. Además, escucharme aun sabiendo que comprendería una parte acerca de este proyecto. Asimismo, poder realizar este proyecto y mi educación de manera tranquila, apoyándome en todo momento económicamente. Finalmente, le quiero agradecer por enseñarme que cualquier sueño, se puede hacer realidad, si te lo propones. *Te amo mucho Papá*

María Rosa Guevara Núñez (Mi abuela): Le dedico esta tesis por haberme enseñado que nunca nos debemos darnos por vencido y que todo proyecto o sueño que se inicia se debe de finalizar. Además, aunque no estés conmigo en este momento tan importante, lo estuviste en toda mi formación y mucho de lo que soy ahora te lo debo a ti. Finalmente, sé que aunque no estés aquí me vas a seguir cuidándome y con mucho cariño te dedico este proyecto. *Te amo mucho Rosita*

José Alberto Luna (Mi abuelo): Le dedico esta tesis, por haberme despertado desde tan pequeño, el amor por la ciencia, mediante regalos y enseñanzas. Cabe mencionar, él me regaló mi primer microscopio y mi primer libro de ciencia. Además, siempre me ha escuchado mis ideas y ha mostrado iniciativa en cada una de ellas. Asimismo, él es una de las personas que más ha creído en mi capacidad y me ha enseñado que no soy menor a nadie. Finalmente, le agradezco por sacarme una risa o una sonrisa en todo momento que nos vemos. *Te amo mucho Don Luna*

Juan José Luna (Mi tío): Le dedico esta tesis por siempre escucharme desde una platica de cinco minutos hasta platicas de 1 o 2 horas. Asimismo, por haberme hecho madurar y enseñarme como ser un buen ser humano y siempre ver hacía adelante sin importar las circunstancias ni el problema. *Te amo mucho tío*

Fernanda Daniela Delgadillo Díaz (Mi novia): Le dedico esta tesis a una persona que siempre estuvo conmigo a lo largo de mi carrera. Cabe mencionar, que ella me apoyó en todo momento en este proyecto, quedándose horas conmigo en el laboratorio y aconsejándome durante el proyecto. Además, ella me apoyó y me dio ánimos, los cuales fueron muy importantes para la finalización. Finalmente, te quiero agradecer por haberme apoyado aquí y en el extranjero, por ser mi compañera en las veinticuatro horas del día y ser la oyente de mis ideas. *Te amo mucho chatita*

Susana Fuentes (Mi abuela): Le dedico esta tesis por apoyarme en todo momento y enseñarme que todo es posible, siempre y cuando exista mucho esfuerzo y fe. *Te amo mucho Susie*

Los animales involucrados en el laboratorio: Quiero agradecer a los 35 roedores que dieron su vida para poder realizar este proyecto.

Índice

Resumen……6

Abstract……8

Introducción……9

Justificación……55

Hipotesis……56

Objetivo General……56

Objetivos Específicos……56

Metodología……..56

Resultados……66

Discusión……..74

Conclusiones……80

Perspectivas……80

Bibliografía……80

Abreviaturas……90

Índice de Figuras

Figura 1: . Promedios del número de cruces ± DS con respecto al tiempo en cada uno de los grupos estudiados en la “Prueba de Campo Abierto”.

Figura 2: Promedios del número de espermatozoides en una muestra ± DS con respecto a cada uno de los grupos estudiados.

Figura 3: Comparación de porcentajes sobre la motilidad espermática ±DS con respecto a los diferentes grupos estudiados en el testículo derecho.

Figura 4: Comparación de porcentajes sobre la motilidad de espermática ±DS con respecto a los grupos estudiados en el testículo izquierdo.

Figura 5: Porcentajes del número de células vivas ±DS con respecto al número de grupo en el testículo derecho.

Figura 6: Porcentajes de células vivas ± DS con respecto al número de grupos estudiados en el testículo izquierdo.

Figura 7: Porcentajes de fragmentación de ADN en los espermatozoides ±DS con respecto al número de grupos estudiados.

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1: Representación gráfica de las etapas de respuesta al estrés propuesto por Selye en el Síndrome General de Adaptación.

Ilustración 2: La respuesta al estrés y el desarrollo de la carga alóstatica.

Ilustración 3: La transición del estrés agudo al crónico, basado en la activación del eje HHA.

Ilustración 4: La tendencia de 50 años desde el descubrimiento de los ansiolíticos.

Ilustración 5: Receptor ácido gama-aminobutírico (GABA) con sitios de anclaje.

Ilustración 6: Grafico de barras de medicamentos con mayor frecuencia de interacción.

Ilustración 7. Corte sagital del aparato reproductor femenino.

Ilustración 8. Diagrama esquemático mostrando el impacto del estrés sobre el aparato reproductor femenino.

Ilustración 9. Fases de la espermatogénesis.

Ilustración 10: Partes del espermatozoide humano.

Ilustración 11: Corte sagital del aparato reproductor masculino.

Ilustración 12: El modelo propuesto por Peng y colaboradores esquematizando el deterioro de la espermatogénesis inducido por estrés psicológico.

Ilustración 13: Crías de la cepa CD-1 con 5 días de edad.

Ilustración 14: . La prueba de estrés “Inclinación de caja".

Ilustración 15: Comparación de muestras pertenecientes a los grupos “Control” (figura A) y “Ansiolítico”(figura B) analizadas con un microscopio de epifluorescencia.

Índice de Tablas

Tabla 1: Porcentajes basados en las recetas emitidas en la farmacia ambulatoria del Hospital Carlos Lanfranco la Hoz.

Tabla 2: Registro de base de datos de las recetas emitidas en la farmacia ambulatoria del Hospital Carlos Lanfranco la Hoz.

Tabla 3: Nombres de medicamentos usados inapropiadamente en 208 pacientes.

Tabla 4: Cronograma de trabajo semanal

RESUMEN

El estrés, por un periodo prolongado, es considerado un factor de riesgo para el desarrollo enfermedades crónico-degenerativas, las cuales son consideradas, un problema de salud pública. La asociación entre estrés fisiológico y alteraciones metabólicas es conocida, sin embargo, aún no se ha identificado específicamente la causa. En estudios previos, se han demostrado que el estrés crónico afecta la fertilidad masculina, pero se desconocen los efectos del tratamiento con ansiolíticos sobre el mismo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del ansiolítico sobre la calidad espermática y sobre la fragmentación de ADN ocasionada por un estrés crónico. Ratones macho de la cepa CD-1 (1 mes de edad) fueron divididos en 3 grupos: “Control”, “Ansiolítico” y “Estrés”. Los ratones fueron sometidos a un modelo de estrés crónico intenso diario durante 30 días. Para poder evaluar el efecto del estrés y del ansiolítico sobre la conducta, se evaluaron los roedores cada 6° día mediante una “Prueba de Campo abierto”, en donde, se contaron los cruces realizados en el campo. Después de haber inducido el estrés, se administró de manera diaria clonazepam (5g/kg) durante 15 días. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se obtuvieron los epidídimos para obtener los espermatozoides a los que se les analizó la calidad espermática a través de espermatobioscopia completa (motilidad, vitalidad y conteo espermático). Finalmente, a través de prueba cometa, se determinó el efecto sobre la fragmentación de ADN en los distintos grupos. En lo que respecta a las pruebas conductuales, los individuos en los primeros días presentaron un comportamiento temeroso y presentaban ansiedad, hasta el día 20 del experimento. La administración del ansiolítico redujo el número de cruces en el campo abierto en comparación al grupo “Control”. Sin embargo, el grupo

“Estrés” tuvo un incremento constante en el número de cruces hasta finalizar el experimento.

Por otra parte, en la espermatobioscopia se observó que la vitalidad celular se redujo de manera significativa en el grupo “Ansiolítico” a comparación del grupo “Estrés” y “Control”. Sin embargo, la motilidad celular y el número espermatozoides se vieron recuperados en el grupo “Ansiolítico”, en comparación con el grupo estrés en donde se observaron en su mayoría espermatozoides sin movimiento. Cabe mencionar que los resultados fueron diferentes entre los testículos derecho e izquierdo de un mismo sujeto. Finalmente, se observó que el tratamiento con ansiolítico redujo el porcentaje de células con fragmentación de ADN en el grupo con respecto al grupo “Estrés”.

Los resultados sugieren que el uso de ansiolíticos, como tratamiento para aliviar el estrés, perjudica la vitalidad, pero mejora la motilidad celular y la concentración de espermatozoides. Además, reduce la fragmentación de ADN en los espermatozoides.

ABSTRACT

Long-term psychological stress is considered a risk factor for the development of chronic degenerative diseases, which are considered a public health problem. The relation between physiological stress and metabolic alterations is known, however, it has not identified the main cause, yet. In previous studies, they have proved that chronic stress affects masculine fertility, but, it is un-known anxiolytic treatment on it. Therefore, the aim of this work was to evaluate the anxiolytic effect on the spermatic quality and on DNA fragmentation caused by chronic stress. Male CD-1 mice (one month old) were divide into 3 groups: “Control”, “Anxiolytic” and “Stress”. The mice were subjected to a diary intense chronic stress model for 30 days. In order to evaluate stress and anxiolytic effect on behavior, the rodents were evaluated every 6th by “Open Field Test”, where counted crosses realized on this field. Afterward, it was administrated clonazepam (5g/kg) daily to the "Anxiolytic" group for 15 days. Later, the mice were sacrificed by cervical dislocation and obtained epididymis for the spermatozoa recollection, which were analyzed for their spermatic quality through a complete spermatobioscopy (motility, vitality and spermatic count). Finally, we determined the effect on DNA fragmentation in cells of different groups through comet assay. Regarding behavior tests, in the first days the individuals displayed fearful behavior and anxiety until 20th day experiment. The anxiolytic treatment reduced crosses on “Open Field” comparing with “Control” group. However, “Stress” group had a constant increase on crosses until the end of the experiment. In other hand, after the behavior tests, the cellular vitality in “Anxiolytic” group was lower significantly than the other groups. Nevertheless, “Anxiolytic” group recovers its cellular motility and the cell number comparing to “Stress” group, which its spermatozoa do not have movement. It needs to be mentioned that the results were different between right and left testicles. Finally, we observed that the anxiolytic treatment reduced the percentage of cells with DNA fragmented belonging to Anxiolytic group comparing with “Stress” group.

INTRODUCCIÓN

El estrés crónico es un trastorno en la sociedad, el cual se está convirtiendo en un problema de salud pública (Stravoula, Griffiths, & Cox, 2004) Esto es ocasionado por diferentes motivos como: ambientales, sociales, problemas en el área laboral, etc., (Domínguez , Collares, Ormaecha, & Tamoslunas, 2016). Por lo que se han buscado alternativas o tratamientos para poder aliviar los síntomas y, que la vida cotidiana de los pacientes no tenga repercusiones. Esto último se ha hecho a través de tratamientos psicológicos, farmacológicos, actividades recreativas, etc. (Pruti, 2019).

En lo que respecta a los tratamientos farmacológicos, normalmente se utilizan ansiolíticos como los benzodiacepinas, las cuales a partir de los años 90s, fueron de los fármacos más recetados a nivel global, debido a su eficacia y teniendo los menores efectos adversos posibles (Bhuiyan, 2017).

Actualmente, se conoce que el estrés prolongado es causante de diversas enfermedades crónico-degenerativas, como: cáncer, enfermedades coronarias, diabetes, epilepsia, esclerosis múltiple, derrame cerebral, enfermedad Alzheimer, infertilidad masculina, etc. (Boudreau, Johnson, & Herman, 2011). Respecto a la fertilidad masculina, se ha demostrado que el estrés emocional puede afectar el número de espermatozoides y su movimiento (Saki & Rahim, 2009) . Sengupta et al. (2013) mencionan que las actividades de relajación, como el “Yoga”, aumenta la concentración de espermatozoides y puede deberse a la reducción de ansiedad del paciente. Sin embargo, las jornadas laborales prolongadas que se ejercen en nuestro país, no permite a ciertos pacientes poder realizar actividades recreativas (Latina), 2018).

Hasta el momento, hay poca información del efecto del estrés y los tratamientos con ansiolíticos sobre la calidad espermática en jóvenes. Debido a esto último, el presente trabajo está enfocado en el estudio del efecto ansiolítico durante un tratamiento para aliviar el estrés crónico sobre la calidad espermática.

El estrés ha sido denominado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Stravoula, Griffiths, & Cox, 2004), como la “Epidemia del siglo XXI”. Un ejemplo de su relevancia en la sociedad, son sus afectaciones económicas en Estados Unidos de América que han rebasado los 300 millones de dólares por año en su tratamiento (Fink, 2017). En el mismo país, se realizó un estudio demográfico, en el cual se demostró que de 1983 a 2017 se ha incrementado el nivel de estrés de un 10% a un 59%. Esto es debido a una mayor exigencia laboral y desigualdad económica que provoca un estilo de vida complicado; a su vez, acompañada de mala alimentación, sedentarismo, adicciones, etc. (Weiser, 2016). Además, dicho desajuste, a largo plazo, es causante de enfermedades crónico degenerativas, alteraciones cerebrales, susceptibilidad genética a estrés, problemas neuroendocrinos, entre otros (Weiser, 2016).

Las afectaciones mencionadas causadas por el estrés están conectadas entre sí e involucran diferentes sistemas en el organismo. Sin embargo, en este trabajo se basará principalmente en las implicaciones del sistema neuroendocrino. Él sistema neuroendocrino, está compuesto por el sistema nervioso y endocrino, los cuales trabajan de manera coordinada permitiendo que el cuerpo desarrolle una conducta adaptiva produciendo respuestas fisiológicas esenciales para poder adaptarse al ambiente, mediante el mantenimiento de la homeostasis en el organismo (Mendieta-Rada, 2018). Cabe recalcar que el sistema endocrino es muy complejo y al desequilibrarse, afecta diversos procesos en las células produciendo daños en la mayoría de los sistemas de los seres vivos.

Definición de estrés

La palabra estrés, en la vida cotidiana, se utiliza de diferentes maneras y por ende tiene diversos significados. La primera y la más común definición fue propuesta por Hans Selye (el cual es considerado el padre en el estudio del estrés): “Es la respuesta no específica del cuerpo ante cualquier exigencia”. Además, se clasifica de acuerdo a su intensidad, duración y naturaleza (Martínez, y otros, 2006). Al mismo tiempo, definió a estresor como “*Toda circunstancia o factor que se perciba*

de manera consciente o inconsciente como una amenaza, el cual puede provenir del ambiente o de las emociones" (Monroe & Slavich, 2009). Por otra parte, Seyle argumentaba que no es necesario que un ser vivo tenga sistema nervioso para poder sufrir estrés, como es el caso de las bacterias o plantas (Duke, y otros, 2018). Con el paso del tiempo se ha ocupado estrés en diferentes ramas de la ciencia, por ejemplo:

- En las ciencias conductuales, estrés es considerado como la "percepción de amenaza, como resultante de ansiedad, tensión emocional y dificultad en adaptarse" (Fink, 2017).
- En la rama de la neuroendocrinología se definió como *"Cualquier estimulo que provoque la producción de ACTH y glucocorticoides adrenales"* (Yates, 1987).

Años anteriores a Seyle, el investigador Claude Bernard tenía la noción de que *"las células y los tejidos de organismos multicelulares, responden a estímulos, para mantener un balance en el medio interno, para conservar la sobrevivencia"* (Lavitini, 2002). Posteriormente, Walter Cannon propuso el termino de "homeostasis", para referirse a *"los procesos fisiológicos y biológicos que se mantienen constantes, para mantener el equilibrio con el medio intracelular, a pesar de, los cambios que ocurren fuera de la célula"* (UNAM, 2010).

Basado en lo que propusieron Bernard y Cannon, nuevamente, Seyle planteó que el estrés se compone por 3 fases:

- La fase 1 es conocida como "fase de alarma" o "Shock", la cual es inmediata a la percepción del estímulo estresante. Normalmente se caracteriza por inmovilidad, acetificación cortical (liberación de noradrenalina) y manifestaciones faciales.

  Fase 2 o conocida como "fase de resistencia", en donde el individuo mantiene una activación fisiológica máxima, tratando de superar la amenaza. Si se prolonga por mucho tiempo, se considera como estrés crónico. Por otro lado, en esta fase el organismo puede retomar a un estado basal.

- Fase 3 o “Fase de Colapso”, se produce solamente cuando el estímulo estresante persiste, lo que impide que el organismo se adapte a la situación. Como consecuencia, aparecerán enfermedades crónico degenerativas.

Sin embargo, cabe recalcar que no todo el estrés es malo; Seyle propuso que existen 2 tipos de estrés:

Eutrés: Se considera como el “estrés bueno”, él cual es necesario, debido a que es la cantidad óptima de estrés en la vida de un ser vivo. De esta manera, el sujeto puede adaptarse y sobrevivir (Camargo, 2015).

Distrés: Se considera al “estrés dañino o patológico”, debido a que puede producir afectaciones irreversibles en el sistema nervioso central. Cabe señalar que es posible que exista afectaciones en etapas prenatales de los individuos (Martínez, y otros, 2006).

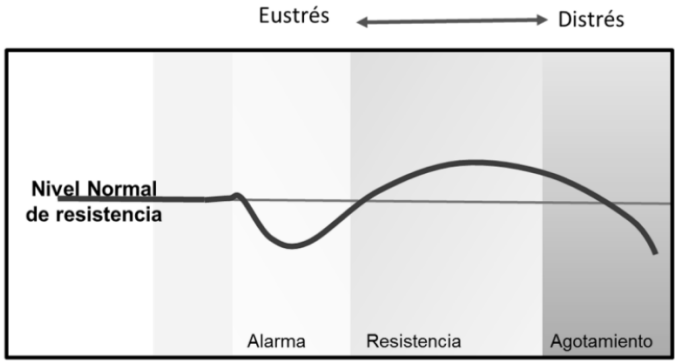


Ilustración 1 Representación gráfica de las etapas de respuesta al estrés propuesto por Selye en el Síndrome General de Adaptación (López-López, 2016).

Más adelante, (McEwen, 2004) propuso los términos “Alostasis” y “carga alóstatica”, en el proceso de habituación. La alostasis se define: “la capacidad que tiene el organismo para mantener la homeostasis frente a un estresor”. Por lo tanto, la carga alóstatica, se define, como, “la capacidad del organismo de tolerar el cambio o alteración causada por el estresor, por un periodo de tiempo” (McEwen, 2004). La activación de la respuesta fisiológica, ante un estresor, depende de varios factores como: naturaleza del estresor, experiencia y genética del receptor (McEwen, 2004). Además, los factores

estresantes desencadenan diferentes tipos de respuestas del individuo, como: lucha, huida o enfrentamiento (Ospina-Stepanian, 2016).

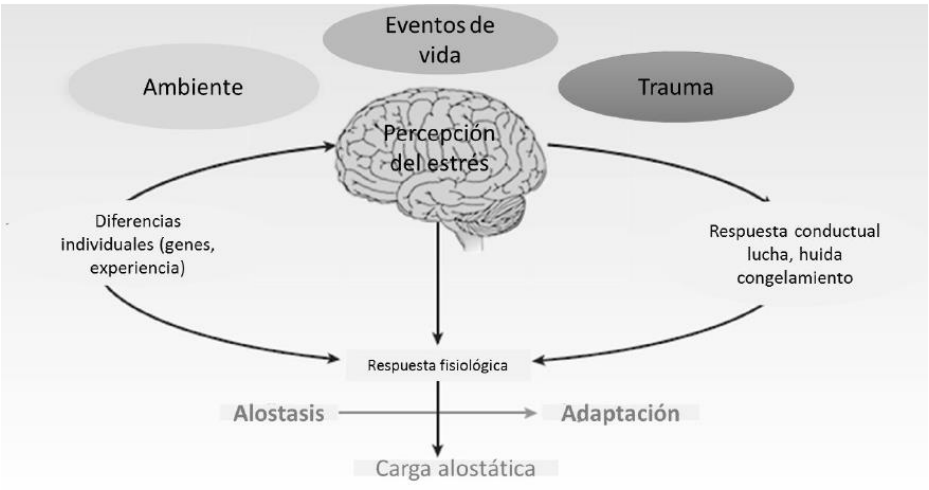


Ilustración 2. Ilustración 2 La respuesta al estrés y el desarrollo de la carga alóstatica. La respuesta al estrés, difiere en cada individuo debido a factores externos como: la edad, la experiencia y la carga genética. Los cuales influyen, en la manera en que se perciben y manejan, los estímulos considerados estresantes (Varela-Pinedo, 2005).

Una de las maneras de como dividir el estrés psicológico, es de acuerdo a su duración, el cual se puede dividir en estrés agudo y estrés crónico (Litz, Hundert, & Jordan, 2017).

Estrés Agudo

El estrés agudo “es un desorden relacionado con un trauma y un estresor, caracterizado por memorias intrusas, humor negativo, disociación y/o escape durante el primer mes, después de un evento potencialmente traumático” (Litz, Hundert, & Jordan, 2017). El rango de padecer un estrés agudo, va depender del estresor o el evento que causó dicho trauma, por ejemplo, el evento traumático de un crimen violento o abuso sexual. Además, otras causas del estrés son: género y edad de la víctima, estatus socioeconómico, problemas de salud e interrupción de sueño por largos periodos de tiempo (López-López, 2016).

Estrés crónico

(Ewen, 2002) define al estrés crónico como, “una exposición continua a factores estresantes externos o condiciones prolongadas de la respuesta al estrés”. El tiempo de que un paciente padezca estrés crónico puede ser desde horas, semanas e incluso hasta años (Camargo, 2015). Sí el individuo, es incapaz de adaptarse al medio, el sistema sufrirá enfermedades graves, por ejemplo: trastornos gastrointestinales, colitis nerviosa, hipertensión arterial, ansiedad, frustración, insomnio, migraña, problemas de infertilidad, etc. (Boudreau, Johnson, & Herman, 2011). El cuerpo entre más pronto y de manera eficiente pueda adaptarse al medio, podrá más rápido recuperar el equilibrio (Mariotti, 2015). Independientemente del tipo de estrés, la respuesta se ejecuta a través del sistema hipotalámico-hipofisario-adrenales (HHA).

Fisiología del estrés

El organismo responde al estrés con procesos aleostaticos de autorregulación, destinados a volver los sistemas esenciales del organismo, en donde asegure la supervivencia (Joseph & Whirledge, 2017). Los procesos de autorregulación incluyen componentes conductuales y fisiológicos, con lo que respecta a los mamíferos, la respuesta al estrés ocurre mediante la activación del eje HHA (Fink, 2017). El mecanismo de respuesta del eje HHA inicia, cuando, las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), liberan 2 tipos de neurohormonas cuyo sitio blanco es la hipófisis: el factor liberador de corticotropina (CRF) y la arginina-vasopresina (AVP) (Chutuape-Stephens & Wand, 2018). Posteriormente, la hipófisis anterior una vez estimulada, secreta la hormona adrenocorticótropa (ACTH) a la circulación sanguínea e induce la síntesis de 2 clases de corticoesteroides: mineralocorticoides y glucocorticoides (Hannibal & Bishop, 2014). La activación hipotalámica del eje HHA es regulada en el cerebro por una variedad de sistemas de retroalimentación (Buske-Kirschbaum, 2009). Algunos de estos sistemas tienen efectos inhibitorios a través de la liberación de neurotransmisores como el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y opioides, mientras que otros tienen efectos excitatorios como la norepinefrina y la serotonina, ambos ocurren en el NPV (Tasker

& Herman, 2012). Además, los corticoesteroides regulan su propia activación mediante receptores dentro de la hipófisis, NPV y el hipocampo, los cuales regulan la producción de neurohormonas como CRF, AVP y ACTH (Tasker & Herman, 2012).

Glucocorticoides

Dentro del grupo de los glucocorticoides, se encuentra el cortisol, el cual es una molécula lipídica que consta de acciones fisiológicas y metabólicas como: regular la función renal y el transporte de iones, incrementar la actividad del sistema cardiovascular, mantenimiento del tono y permeabilidad vascular, excitar o suprimir el sistema inmunológico y regular el sistema nervioso central (Guerrero, 2016). Además su actividad en el cerebro está mediada en gran parte por la interacción de sus receptores con los mineralocorticoides, lo que induce un aumento en la sensibilidad de la serotonina en las neuronas del hipocampo y una emoción de euforia (Ramamoorthy & Cidlowski, 2015).

Mineralocorticoides

Su nombre proviene de su principal función, la cual es regular el balance hidrosalino del organismo (Nora, 2014). Los mineralocorticoides más importantes son la aldosterona y la DOC, los cuales son producidos por el hígado y transportados mediante proteínas CBG o unidos débilmente a la albumina, finalmente son excretados por la orina (Melmed, Polonsky, Larsen, & Kronenberg, 2011).

El mecanismo de acción de los mineralocorticoides comienza uniéndose a sus respectivos receptores, los receptores de mineralocorticoides (MR), que están situados en el citoplasma de células de diferentes partes del organismo (Nora, 2014). De esta manera, la célula es inducida a modificaciones funcionales que afectan la reabsorción de sodio y la excreción de potasio (Funder, 2005). Cabe mencionar que el cortisol, la corticosterona y aldosterona pueden unirse a los MRs,

lo que explica la leve acción del cortisol como mineralocorticoide, pero no presenta ninguna afinidad por cortisona (Hamm, Alpern, & Preisig, 2013).

Regulación de la secreción de cortisol por el eje HHA

La hormona liberadora de Corticotropina (CRH), controlada por el hipotálamo o por la hipófisis, está encargada de controlar la secreción de cortisol mediante dos sistemas de regulación: la medula adrenal y el sistema inmunitario (Gjerstad, Lightman, & Spiga, 2018). Por otro lado, la ACTH regula la secreción de cortisol uniéndose a receptores específicos acoplados a proteínas G para activar la adenilato-ciclasa y aumentar los niveles de AMPc (Chutuape-Stephens & Wand, 2018). Además, ACTH regula la esteroidogénesis mediante dos vías y dependerá del tipo de estrés: un estrés agudo es regulado el eje en pocos minutos o el estrés crónico requiere horas o días (Chutuape-Stephens & Wand, 2018). Con lo que respecta al estrés crónico, la ACTH acelera la síntesis de las enzimas que regulan la esteroidogénesis y de esta manera se afecta el tamaño y la concentración de las células suprarrenales (Chutuape-Stephens & Wand, 2018).

Finalmente, el cortisol es capaz de ejercer una retroalimentación negativa sobre la síntesis y secreción de las hormonas involucradas en el eje HHA (Juruena, Cleare, & Parlante, 2004).

Respuesta a estrés agudo.

En la etapa inicial del estrés agudo, la torre encefálica libera catecolaminas adrenérgicas simpáticas: norepinefrina y epinefrina. Estas últimas tienen efectos cortos que promueven la sobrevivencia del organismo mediante el incremento del ritmo cardiaco, aumento de la presión sanguínea y respiración acelerada. Además, de una respuesta proinflamatoria en contra de antígenos, patógenos o invasores foráneos (Litz, 2017).

Respuesta del eje HHA en el estrés crónico.

Los científicos diferencian al estrés crónico del estrés agudo cuando el proceso de adaptación del individuo en una situación estresante es fallido. El estrés crónico es causado por: cogniciones negativas recurrentes o exageradas, preocupación y falta de ayuda en situaciones de ansiedad; durante periodos prolongados “percibidos” como eternos o interminables (Pozos-Radillo & Serrano, 2017). Esto ocasiona una alteración del sistema neuroendocrino mediante la disfunción de varias hormonas como: la reducción de cortisol, disfunción de CRH, resistencia al receptor glucocorticoide o hipersensibilidad del sistema de retroalimentación (Mogilski, Wysocki, Reeve, & Mitchell, 2019).

Una de las principales características del estrés crónico es la continua secreción de cortisol y la activación del sistema inmunológico con procesos proinflamatorios, que interrumpen el mecanismo de retroalimentación negativa en el eje HHA (Mogilski, Wysocki, Reeve, & Mitchell, 2019). Finalmente, el estrés prolongado causa enfermedades crónicas y algunos padecimientos como: descomposición ósea y muscular, fatiga, depresión, dolor, deficiencias en la memoria, desregulación sodio-potasio y daño en el reflejo pupilar de la luz (Mogilski, Wysocki, Reeve, & Mitchell, 2019).

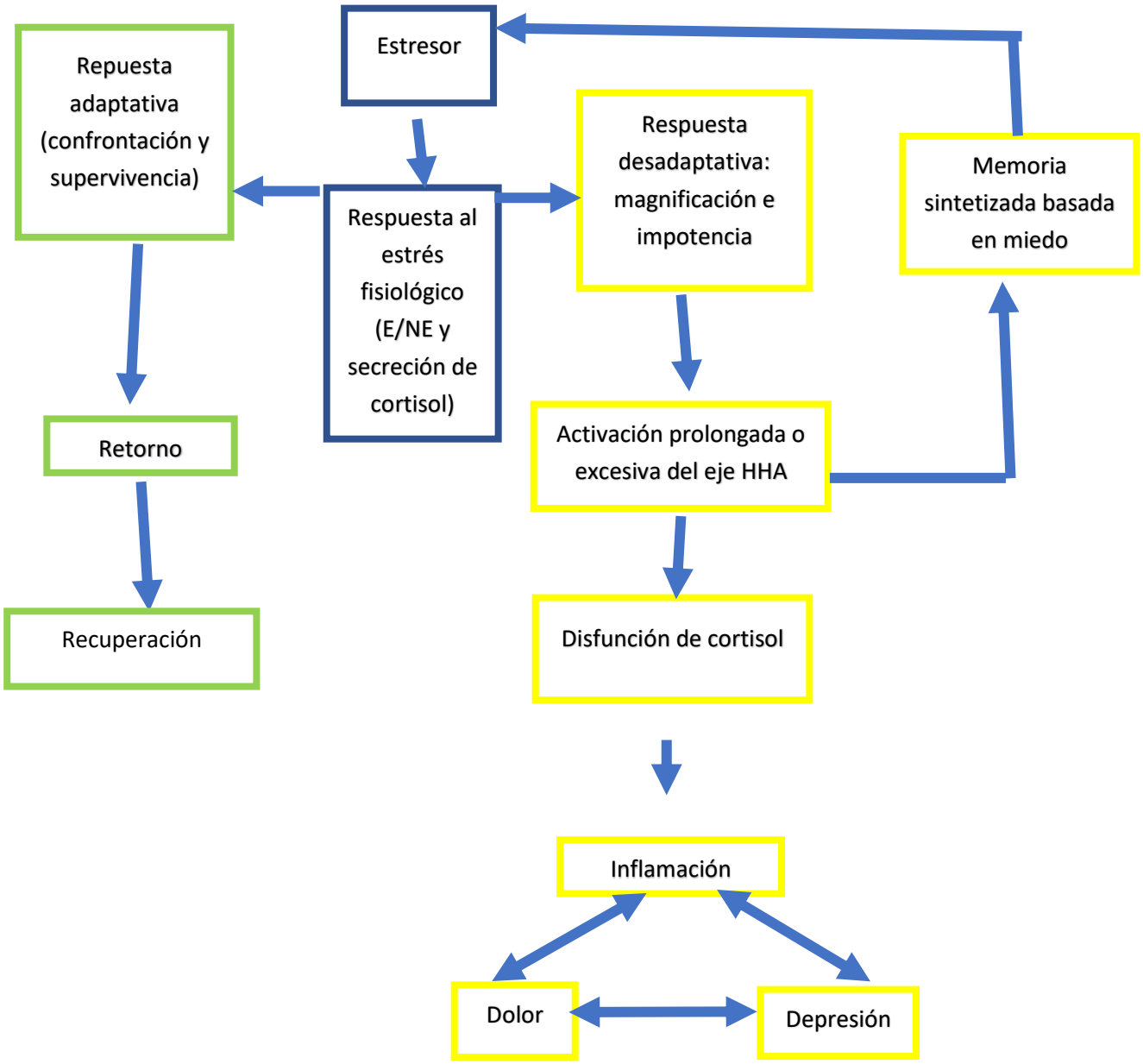


Ilustración 3. La transición del estrés agudo al crónico, basado en la activación del eje HHA. La respuesta del estrés agudo se esquematiza con los recuadros de color verde, donde: el estresor activa una respuesta normal del estrés fisiológico (liberación simpática a corto plazo de epinefrina (E) y norepinefrina (NE), seguido de la secreción de cortisol.) Una respuesta adaptativa de afrontamiento permitiendo los niveles normales de: E/NE y cortisol. El estrés crónico representado con recuadros de color amarillo induce una excreción prolongada y excesiva de cortisol, creando una memoria basada en el miedo del estímulo estresante, que es sintetizada y reactivada mediante futuros estresores.

Además, la disfunción de cortisol es ocasionada debido a la mala adaptación del organismo a la respuesta de estrés agudo y resulta en una inflamación no modulada, depresión, dolor y ansiedad (Mogilski, Wysocki, Reeve, & Mitchell, 2019).

Repercusiones del estrés en el estado de salud general

Vulnerabilidad al estrés

La vulnerabilidad al estrés se refiere a la sensibilidad de una persona a un evento estresante. Por ello, expertos buscan crear modelos para explicar el mecanismo de acción del estrés, como es el modelo diátesis-estrés (García, Barrio, López, & Bedia, 2013). Este modelo menciona que el paciente puede tener cierta vulnerabilidad genética o predisposición (diátesis) al estrés, en el momento que existe una interacción entre el individuo y un suceso vital estresante, por consiguiente, se desencadena un trastorno psicológico (Trucco, 2002). Cuanto mayor sea la vulnerabilidad, menor estrés se necesita para desencadenar una conducta estresante. Por otro lado, cuanto menor sea la contribución genética, será mayor el estresante necesario para producir un resultado particular (Trucco, 2002). Sin embargo, existen individuos que presentan una gran predisposición al estrés y no desarrollan ningún trastorno ante una situación determinada, dado que afrontan o desarrollan estrategias contra el estrés (García, Barrio, López, & Bedia, 2013). Una de esas estrategias es la evaluación cognitiva, la cual es un proceso que permite determinar, sí la situación estresante supone una amenaza real para su bienestar y que la persona tenga los recursos necesarios para enfrentar la situación (Facal, y otros, 2017).

Para poder afrontar el estrés, el paciente deberá realizar esfuerzos cognitivos y conductuales de esta manera adaptarse a la situación (Vega-Valero, Villagrán-Velazco, Nava-Quiroz, & Soria-Trujano, 2013). Para ello, existen dos direcciones de afrontamiento: “centrado en la emoción” o “dirigido al problema” (Vega-Valero, Villagrán-Velazco, Nava-Quiroz, & Soria-Trujano, 2013). El afrontamiento dirigido a

la emoción es cuando la persona se da cuenta que no puede hacer nada ante la situación, y por consiguiente, emplea conductas como evitación, distanciamiento, minimización del problema, etc. (Fernández & De la Torre-Vacas, 2014). Mientras que el afrontamiento dirigido al problema ocurre cuando el individuo emplea estrategias activas para solucionar la situación (Fernández & De la Torre-Vacas, 2014).

De esta manera, (Fernández & De la Torre-Vacas, 2014) concluyó que, aunque un individuo presenté vulnerabilidad hacía el estrés, puede no afectarlo sí utiliza estrategias adecuadas de afrontamiento y una adecuada evaluación cognitiva ante la situación.

Conocer las características de los estímulos estresantes son fundamentales para dar un tratamiento adecuado por parte de los psicólogos y algunas de ellas son: la intensidad, duración, grado de previsibilidad y control por parte del individuo (Sandín, 2003).

Los psicólogos aconsejan ciertas conductas a sus pacientes que pueden prevenir el estrés psicológico, los más importantes son (Brun, 2013):

Autoeficacia: El grado de modificación o determinación por parte de las personas ante las demandas de su entorno. Los niveles altos en autoeficacia generan niveles más bajos de malestar psicológico y la persona es capaz de contrarrestar las adversidades y permiten al paciente tener mayor confianza en sí mismo.

Estilo atribucional: La reflexión por parte del individuo respecto a las acciones realizadas en una situación determinada.

Apoyo social: La asistencia social por parte de tres o más personas que recibe la persona, con el objetivo de reducir el malestar psicológico.

Locus control: La autocrítica del control de las conductas por parte del paciente.

Optimismo-pesimismo: La perspectiva positiva o negativa del individuo ante las circunstancias de la situación. Asimismo, se puede tener un carácter optimista

(considerar las metas y estar orientado hacia el futuro) o pesimista (propenso a la depresión y experimentar mayor nivel de estrés).

Autoestima: La alta autoestima permite al paciente reducir los niveles de cortisol, debido a la reducción de situaciones estresantes.

El estudio de estos factores ha permitido reformular el modelo de “diátesis-estrés” a “diátesis-estrés-factores protectores”, con el objetivo de reducir la vulnerabilidad al estrés mediante el desarrollo de estrategias de protección (Fernández & De la Torre-Vacas, 2014). Además, este modelo permite que los psiquiatras conozcan mejor a su paciente y de qué manera ayudarlo ante esta situación (Fernández & De la Torre-Vacas, 2014).

Afectaciones en la salud ocasionado por el estrés.

Como se mencionó anteriormente, una respuesta desadaptativa por un periodo largo hacía el estrés con lleva a un deterioro en la salud, causando enfermedades psicosomáticas o desregulación del sistema inmune y trastornos psicológicos (Schneiderman, Ironson, & Siegel, 2005). Las cuales se describirán brevemente en el siguiente apartado.

Enfermedades psicosomáticas

Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades coronarias son consideradas enfermedades psicosomáticas debido a sus causas psicosociales (Esch, Stefano, Fricchione, & Benson, 2002). En situaciones de estrés, el sistema nervioso libera catecolaminas y afectan de diferente manera al sistema circulatorio, como: el incremento de respiraciones, aceleración del ritmo cardíaco y la presión arterial. Estos síntomas causan enfermedades cardiovasculares graves o accidentes cerebrovasculares (Esch, Stefano, Fricchione, & Benson, 2002). Además, el paciente es susceptible de padecer enfermedades crónicas como: arritmias, isquemia miocárdica, infarto de

miocardio, desregulación de los factores de coagulación, desarrollar arterosclerosis, hipercoagulabilidad, entre otros (Dimsdale, 2008).

Alteraciones metabólicas

El estrés crónico causa el consumo excesivo de calorías en alimentos apetecibles como azucares o grasas (Tamashiro, Sakai, Shively, & Karatsoreos, 2011). Esto es ocasionado porque los glucocorticoides atraviesan la barrera hematoencefálica e influye en la expresión de péptidos anorexigénicos en el cerebro, los cuales se encuentran implicados en la regulación de la ingesta de alimentos (Tamashiro, Sakai, Shively, & Karatsoreos, 2011). Además, los cambios en los patrones de alimentación ocasionados por la vida laboral afectan directamente en la ganancia de peso y de masa corporal (Yaribeygi, Panahi, Sahraei, Johnston, & Sahebkar, 2017).

De la misma manera, el estrés puede ocasionar diabetes mellitus tipo 2, ocasionado por la resistencia a insulina, y, asimismo, desregular de forma considerable la diabetes infantil (Mitra, 2008).

Desregulación del sistema inmune

Los glucocorticoides frente al estrés agudo tienen propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras en el organismo, lo cual atenúa la producción y liberación de ciertas citocinas. Sin embargo, durante una situación estresante prolongada se desencadena un proceso inflamatorio crónico ocasionado por una actividad constante de las interleucinas y una disrupción en el proceso de retroalimentación negativa en el eje HHA (Segestorm & Miller, 2004).

Como también durante situaciones estresantes, el sistema inmunológico se puede deprimir por una hiperactivación del eje HHA. Éste desajuste es atribuido al

deterioro en la retroalimentación negativa de los glucocorticoides (Segestorm & Miller, 2004).

Desregulación en trastornos psicológicos.

Los expertos sugieren, que el estrés psicológico puede causar trastorno de depresión mayor, basándose los siguientes puntos (Stroud, Davila, & Moyer, 2008):

- Los individuos que sufrieron estrés nocivo son más propensos a desarrollar un trastorno de depresión.
- La sintomatología de la depresión y los cambios hormonales y conductuales derivados por estrés agudo son muy similares.
- La depresión mayor y el estrés crónico se caracterizan por el hipercortisolismo, por consiguiente, una desregulación del eje HHA.

Existen áreas cerebrales que contienen receptores de glucocorticoides como son: el hipocampo, la amígdala y los lóbulos frontales, las cuales están involucradas en procesos de consolidación en la memoria emocional (Sherwood-Brown, 2009). La memoria emocional o “memoria fotográfica” está relacionada con emociones fuertes, como es el miedo o la alegría (Sherwood-Brown, 2009).

Por otro lado, el estrés crónico afecta directamente al hipocampo, ocasionando una menor memoria declarativa (Sherwood-Brown, 2009). Sherwood-Brown (2009) sugiere que los glucocorticoides alteran negativamente a las células encontradas en el hipocampo, algunos de los efectos son: la ruptura en las ramificaciones dendríticas, desregulaciones en el metabolismo de las neuronas y muerte celular.

Tratamientos para estrés

(Schneiderman, Ironson, & Siegel, 2005) menciona que existen dos vertientes para contrarrestar el estrés. Puede ser psicológico o médico, los cuales se describirán a continuación:

Tratamiento psicológico

La psicología aporta técnicas para reducir la carga alóstatica y prevenir el padecimiento o agravamiento de las enfermedades crónicas mencionadas. Los métodos más eficaces, son los siguientes (Schneiderman, Ironson, & Siegel, 2005):

Relajación y entrenamiento autógeno: La relajación progresiva es un estado de alivio, mediante la distensión de los músculos que se contraen durante el estrés, mientras que, el entrenamiento autógeno permite al individuo relajarse mediante la autosugestión y quitando sensaciones corporales, como pesadez o calor.

Mindfulness: Un programa que enseña técnicas al individuo, con el objetivo poder enfrentar al estrés de manera más efectiva y consciente mediante la aceptación de la situación sin prejuicios del momento. Cabe mencionar, el seguimiento de este programa reduce malestares ocasionados por el estrés, como: el dolor prolongado, la depresión, la desregulación del sistema inmune, etc.

Control de la respiración: Técnicas de respiración, que permiten al individuo reducir y controlar síntomas fisiológicos como sudoración, palpitaciones, respiración agitada, etc.

Reestructuración cognitiva: La modificación de pensamientos o creencias distorsionadas, que pueden ocasionar trastornos emocionales. Los expertos recomiendan ciertas terapias, como: la terapia racional-emotiva de Ellis O la terapia cognitiva de Beck.

Inoculación del estrés: Un programa que emplea diferentes técnicas en conjunto, como: relajación, respiración y reestructuración cognitiva, con el objetivo de reducir la vulnerabilidad ante el estrés.

Tratamiento médico

A veces las técnicas del tratamiento psicológico, no son suficientes y deben de ir acompañadas con actuaciones médicas las cuales se describirán a continuación:

Hábitos higiénicos del sueño: Los expertos recomiendan mantener un ritmo regular en los horarios del sueño, mediante: la reducción de situaciones estresantes previas al sueño y evitar bebidas energizantes (Jacobson & Monaghan, 2015).

La reducción de estrés mediante una dieta equilibrada: Los nutriólogos sugieren diseñar una dieta con las siguientes características: 35% de las calorías en proteínas, 35% en frutas y verduras con bajo contenido de almidón y 30% de grasa (20% en aceites monoinsaturados y 10% de grasas animales) (Gonzalez & Miranda-Massari, 2014). Además, la ingesta de alimentos ricos en vitamina C refuerzan el sistema inmune debilitado por el estrés psicológico (Gonzalez & Miranda-Massari, 2014). Finalmente, el aporte de vitaminas del complejo B alivia varios síntomas causados por el estrés (Gonzalez & Miranda-Massari, 2014). Por otro lado, en situaciones de estrés se deben de retirar ciertos alimentos (alcohol y la cafeína), con el objetivo de no desregularizar el ciclo vigilia-sueño (Jacobson & Monaghan, 2015).

Medicamentos

Los antidepresivos son medicamento que se han utilizado como un refuerzo del estado de ánimo, debido a su baja incidencia de efectos adversos, no obstante, se han descrito causantes de distintos malestares, como son: casos de insomnio, falta de apetito, sedación, cefalea y alteración de la función sexual (Thielen, Nygaard, Rugulies, & Diderichsen, 2010).

Otro grupo de medicamentos prescritos son los benzodiacepinas, debido a su uso dentro de la metodología, se explicará con más detalle el mecanismo de acción, farmacocinética, farmacodinamia y su frecuencia de prescripción por los especialistas.

Benzodiacepinas

Impacto e importancia de los benzodiacepinas

La vida laboral en nuestro país, no permite a los trabajadores poder practicar disciplinas recreativas, debido a que México es de los países con las jornadas más extensas del mundo, según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) (Latina), 2018). Por dicha razón, los mexicanos buscan ayuda en los centros de salud para poder aliviar una situación estresante multifactorial. Los benzodiacepinas actúan sobre el sistema prototipo de ansiedad asociado al acido gama-aminobutírico (GABA) y a partir de su descubrimiento a mediados de los 50´s han tenido un crecimiento exponencial en las prescripciones (Nothdurfter, Rupprecht, & Rammes, 2012), como se muestra en la siguiente gráfica:

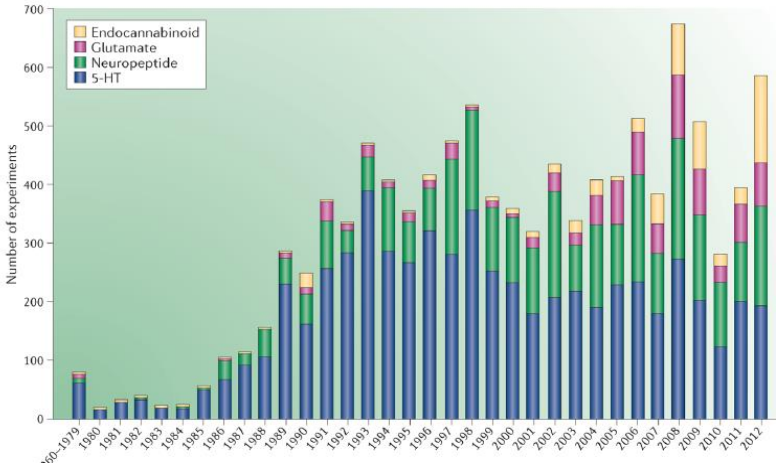


Ilustración 4. La tendencia de 50 años desde el descubrimiento de los ansiolíticos (Griebel & Holmes, 2014). El eje de la "Y" representa el número de experimentos (un fármaco probado en un ensayo o modelo) asociados a la investigación del trastorno de ansiedad, mientras que el eje "X" presenta el transcurso de los años de 1960 a 2012. Con respecto a las barras, señalan los fármacos ejemplificados, como: 5- hidroxitriptamina (5-HT; también conocida como serotonina), neuropéptidos, glutamato y endocannabinoides) La grafica muestra, que el número de investigaciones crece de manera constante a partir de 1980, llegando a su punto máximo en 1998 y permaneció constante hasta la culminación del

estudio. Cabe recalcar, que más de la mitad de los experimentos se enfocan en el sistema 5-HT y neuropéptidos. Mientras que, los sistemas de glutamato y endocannabinoides, tuvieron un crecimiento constante (Griebel & Holmes, 2014).

La principal diferencia entre los benzodiacepinas y los barbitúricos es la reducción de efectos secundarios, como la depresión respiratoria (Wick, 2013). Por esta razón, profesionales del área de la salud aceptaron de manera entusiasta a los fármacos, incrementando la prescripción. Al poco tiempo, se convirtieron en la familia farmacológica por excelencia en el tratamiento de trastornos de ansiedad e iniciaba "La saga de los benzodiacepinas" (López-Muñoz, Álamo, & García-García, 2011).

Los benzodiacepinas son compuestos usados para controlar ciertos trastornos, como: trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de ansiedad social, hipnóticos, anticonvulsionantes y relajantes musculares (Baldwin, y otros, 2013). Sin embargo, las limitaciones terapéuticas y los efectos secundarios de los benzodiacepinas como ansiolíticos, permite investigar más a fondo (Griebel & Holmes, 2014).

Mecanismo de los benzodiacepinas

En el sistema nervioso central existen neurotransmisores que regulan la actividad cerebral mediante el incremento o disminución de la excitabilidad en las neuronas (Lasarge & Danzer, 2020). Uno de ellos es GABA, que tiene 2 funciones principales en el sistema nervioso central, como son: ser un neurotransmisor inhibitorio y la segunda es potenciar la función de las BZDs (Hinton & Johnston, 2018). Los receptores GABA-A son proteínas complejas pertenecientes a la familia de receptores asociados a los canales iónicos, por consiguiente, tienen una alta selectividad por el ion cloro (Cl-) (Huang, Gonzales, & Dillon, 2006). Además, constan de 2 tipos de unión a GABA y un sitio de unión para los benzodiacepinas. En su interior se encuentra subdividido en 5 unidades de glicoproteína (dos alfas, dos betas, una gama y un delta) y alrededor una estructura central de cloro (Batlle, Lizano, Viñas, & Pujol, 2018). Cada subunidad contiene múltiples isoformas: 6 subtipos de alfa (α1,2,3,4,5,6), 4 beta (β1,2,3,4), 3 gamma (γ1,2,3) y uno de delta (δ) (Besson, y otros, 2015).

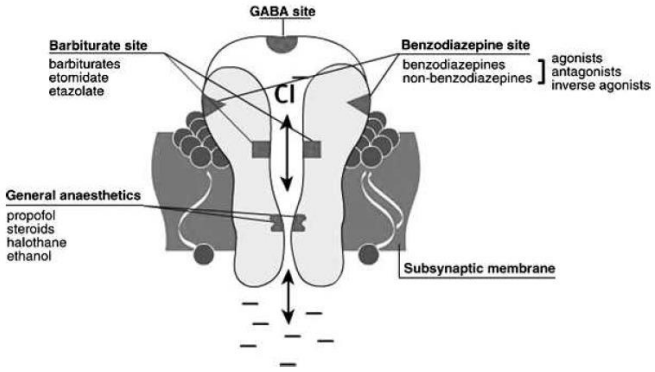
Los subtipos 1,2,3 y 5 de la subunidad alfa tienen una gran afinidad con los benzodiacepinas, debido a sus residuos de histidina. Por esta razón, fueron renombradas como: H101, H102, H126 y H105, respectivamente (Kelly, y otros, 2010).

Los subtipos actúan como un modulador positivo alostérico, permitiendo la unión del ansiolítico al receptor sin alterar la unión de GABA. Lo que permite la hiperpolarización de las neuronas, por consiguiente, una atenuación en su actividad neuronal (Cortes-Romero, Galindo, Galicia-Isasmendi, & Flores, 2011).

Receptores específicos de BZD

Los expertos clasifican a los receptores de benzodiacepinas de acuerdo a sus efectos como ansiolítico, algunos de ellos son (Rosas-Gutierrez, Simón-Arceo, & Mercado, 2013):

- El receptor BZ_1 contiene el isotipo α1 y se sitúa en el córtex, tálamo, el cerebelo y el hipotálamo (es principal responsable de los efectos sedantes) (Griffin, Kaye, Rivera-Bueno, & Kaye, 2013).
- EL receptor Bz_2 es inespecífico y contiene la isoforma α2, el cual tiene un efecto miorrelajante y está localizado dentro de la medula espinal. Mientras que, el receptor Bz_3 contiene la isoforma α3 y es el responsable del efecto ansiolítico (Najam, 2011).



.

Ilustración 5. Receptor ácido gama-aminobutírico (GABA) con sitios de anclaje (Najam, 2011).

Farmacocinética y farmacodinamia de los benzodiacepinas

La farmacocinética describe la absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco. Por otro lado, la farmacodinamia describe la sensibilidad de los receptores al fármaco y el mecanismo de acción (Besson, y otros, 2015). Cabe recalcar, la farmacocinética y/o la farmacodinamia varía de acuerdo al metabolismo de los pacientes (Bandelow, Michaelis, & Wedekind, 2010).

Los benzodiacepinas pueden ser administradas, por: vía intramuscular, intravenosa, oral, sublingual, intranasal o rectal. Normalmente, los médicos las prescriben, en presentación oral o intramuscular (Nelson & Chouinard, 1999). Con respecto a la administración oral es absorbida mediante el tracto gastrointestinal. Mientras que, la administración intravenosa, se distribuye con mayor facilidad por el sistema nervioso central (DeRuiter, 2014). La actividad de las BZDs se redistribuye de manera similar a los barbitúricos solubles en lípidos (DeRuiter, 2014).

Clasificación de las Benzodiacepinas

Los investigadores han clasificado de 2 maneras los benzodiacepinas, de acuerdo a su potencia relativa y su vida media (Battle-Rocafort, 2018). La primera clasificación, consta de tres subdivisiones: baja, media y alta (Battle-Rocafort, 2018). Los primeros fármacos para combatir la ansiedad y el insomnio, tuvieron un potencial de medio a bajo, como: la clordiacepoxida (con una vida media larga), oxazepam y temazepam (Battle-Rocafort, 2018). Después, surgieron los benzodiacepinas un potencial medio a alto, como: alprazolam, lorazepam y clonazepam (Baldwin, y otros, 2013). Los cuales son usados para controlar ataques de pánico y ataques obsesivo-compulsivo (Baldwin, y otros, 2013).

Actualmente, surgieron las benzodiazepinas de alta potencia y se caracterizan por su eficacia terapéutica, sin embargo, tienen mayor número de efectos adversos que los fármacos de menor potencia (Baldwin, y otros, 2013).

La siguiente clasificación es de acuerdo a su vida media y se subdividen de la siguiente manera (Walley, 2012):

- Acción corta: La eliminación de vida media consta de menos de 5 horas y son usadas como hipnóticos. Sin embargo, tienen varios efectos residuales cuando son usadas por un periodo prolongado, como: insomnio, amnesia y problemas de dependencia. Ejemplo: midazolam y triazolam.
- Acción intermedia: La eliminación de vida media es de 5-24 horas, usualmente, son usados como ansiolíticos e hipnóticos. Ejemplo: Alprazolam, Lorazepam y lormetazepam.
- Acción prolongada: La eliminación de vida media es mayor a 24 horas. Este grupo se caracteriza, por su alto riesgo en adultos mayores o pacientes con alguna enfermedad metabólica. Ejemplo: diazepam.

  Actualmente, existen 35 fármacos y solamente 21 disponibles para uso clínico (Batlle-Rocafort, 2018).

Clonazepam

De todos los derivados mencionados de los benzodiacepinas, se eligió el clonazepam debido a su preferencia por los especialistas dentro de Latinoamérica y en especial en México.

Respecto a Latinoamérica, se tomó como ejemplo un estudio que se realizó de los principales ansiolíticos en 280 recetas médicas durante el periodo de septiembre a noviembre en 2019 en el hospital psiquiátrico “Carlos Lanfranco la Hoz”, ubicado en Lima Perú (Novera-Tataje, 2019) . Donde se efectuaron muestreos probabilísticos aleatorios con el conteo de receta y se calcularlos en porcentajes. Los cuales, se representaron en la siguiente gráfica y tabla (Novera-Tataje, 2019):

Tabla 1. Porcentajes basados en las recetas emitidas en la farmacia ambulatoria del Hospital Carlos Lanfranco la Hoz, periodo setiembre – noviembre 2018 (Novera-Tataje, 2019)).

Producto	%
Sulpirida, Sulpirida, Mirtazapina, Amitriptilina, Flufenazina decanoato, Flufenazina, Trifluoperazina, Levomepromazina	0%
Pregabalina, Topiramato, Tramadol, Clozapina, Clomipramina, Escitalopram	1%
Clorpromazina, Ketoprofeno, Quetiapina	2%
Haloperidol	3%
Biperideno	5%
Carbamazepina	6%
Fluoxetina	7%
Acido Valproico	9%
Risperidona	17%
Clonazepam, Sertralina	19%

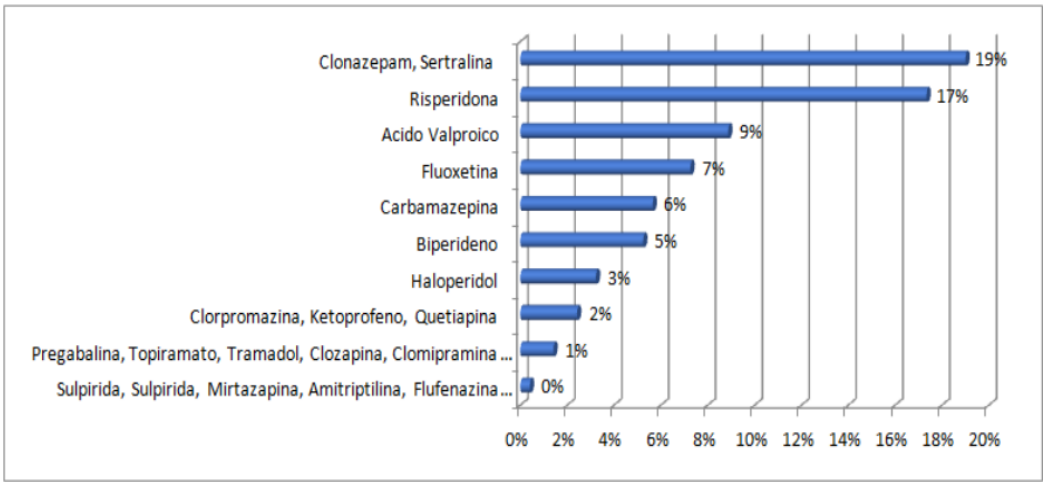


Ilustración 6. Grafico de barras de medicamentos con mayor frecuencia de interacción. (Novera-Tataje, 2019).

Como se puede observar en las ilustraciones 5 y 6, los ansiolíticos con mayor frecuencia son el Clonazepam (19%) y la Sertralina (19%), seguido de la Risperidona (17%); por otro lado: la Sulpirida, Mirtazapina, Amitriptilina, Flufenazina, que representa el 0% (Novera-Tataje, 2019).

A su vez, en el mismo trabajo, se realizaron muestreos probabilísticos acerca de la prescripción conjunta de ansiolíticos con otros fármacos. Los cuales se muestran en la siguiente tabla (Novera-Tataje, 2019):

Tabla 2. Registro de base de datos de las recetas emitidas en la farmacia ambulatoria del Hospital Carlos Lanfranco la Hoz, periodo septiembre – noviembre 2018 (Novera, 2019)

Farmaco 1	Farmaco2	Cantidad Veces	Procentaje
Sertralina	Clonazepam	50	20%
Risperidona	Fluoxetina	25	10%
Risperidona	Clonazepam	16	6%
Sertralina	Risperidona	15	6%
Acido Valproico	Clonazepam	14	6%
Risperidona	Biperideno	13	5%
Acido valproico	Carbamazepina	11	4%
Sertralina	Ketoprofeno	9	4%
Carbamazepina	Risperidona	8	3%
Risperidona	Acido Valproico	6	2%
Biperideno	Carbamazepina	6	2%
Haloperidol	Fluoxetina	5	2%
Clorpromazina	Biperideno	4	2%
Sertralina	Topiramato	4	2%
Sertralina	Pregabalina	4	2%
Acido Valproico	Sertralina	4	2%
Clonazepam	Fluoxetina	3	1%
Acido Valproico	Fluoxetina	3	1%

En la tabla 2, se observó un total de 248 interacciones medicamentosas en las prescripciones, los fármacos que más interactuaron fueron: 50 (20.16%) sertralina-clonazepam, 25 (10.8%) Risperidona-Fluoxetina, 16 (6.5%) Risperidona-Clonazepam (Novera-Tataje, 2019).

Se concluyó en este trabajo, clonazepam es uno de los medicamentos más recetados (con un 19% del total de prescripciones) y es recetado con otros medicamentos en tratamientos un poco más extensos (Novera-Tataje, 2019).

Con lo que respecta a México, en 2014, se realizó un estudio acerca de la prescripción de medicamentos inapropiados en adultos mayores hospitalizados por enfermedades cardiacas (Martínez-Arroyo, Gómez-García, & Sauceda-Martínez, 2014). Él cual fue realizado en el Servicio de Geriatría y Cardiología de la UMAE Hospital de Cardiología n.o 34 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en Monterrey (Nuevo León, México) (Martínez-Arroyo, Gómez-García, & Sauceda-Martínez, 2014).. Se compararon porcentajes basándose en las pruebas realizados por (Novera-Tataje, 2019). Los resultados fueron los siguientes (Martínez-Arroyo, Gómez-García, & Sauceda-Martínez, 2014).:

Tabla 3. Nombres de medicamentos usados inapropiadamente en 208 pacientes en el Hospital de Cardiología n.o 34 del IMSS, con sus respectivos porcentajes (Martínez-Arroyo, Gómez-García, & Sauceda-Martínez, 2014).

Nombre del medicamento	Número de pacientes	Porcentaje
esquema de insulina rápida subcutánea con base en glucosa capilar prepandial	**86**	**39.4%**
Ranitidina	**56**	**25.6%**
Clonazepam	**32**	**14.6%**
Ketorolaco	**29**	**13.3%**
Espironolactona	**14**	**6.4%**
Hipoglucemias orales (metformina-glibenclamida)	**10**	**4.5%**
Prazosina	**7**	**3.2%**
Cinarizina	**6**	**2.7%**

Clonazepam, no solamente es uno de los ansiolíticos más utilizados en el área de psiquiatría, sino que también, es el 3° fármaco empleado en el área cardiológica (Martínez-Arroyo, Gómez-García, & Sauceda-Martínez, 2014).

Farmacodinamia y Farmacocinética

El mecanismo de acción del Clonazepam, como anticonvulsivo y antipánico, aún no se conoce, sin embargo, se infiere un mecanismo de acción similar a los pertenecientes de la familia de los benzodiacepinas (Drover, 2014).

Con lo que respecta a la farmacocinética, la administración oral es absorbida casi en su totalidad y la biodisponibilidad es casi absoluta (alrededor de un 90%) (Wagner & O´Hara, 1997). Las concentraciones plasmáticas máximas son de 1 a 4 horas después de la administración, posteriormente se une un 85% a proteínas plasmáticas (DrugBank, 2010). Además, es metabolizado fácilmente y su biotransformación ocurre principalmente por la reducción del grupo 7-nitro al derivado 4-am, mediante el citocromo P-450 (CYP3A). Normalmente, es excretado el restante por la orina (DrugBank, 2010).

Dosis y administración

Clonazepam se encuentra disponible en tabletas. Las tabletas deben de ser administradas con agua, para ser ingerido en su totalidad y ser utilizadas como ansiolítico y para prevenir convulsiones (FDA, 2013). Sin embargo, en este trabajo, se centrará solamente en la dosis y administración de acuerdo al tratamiento como ansiolítico. El departamento de fármacos de la FDA sugirió un tratamiento para la etapa adulta, el cual inicia con una dosis de es 0.25mg (dos veces al día) (FDA, 2013). En el 3° día de tratamiento, se puede incrementar la dosis a 1 mg/día y se concluyó dicho tratamiento basado en resultados de estudios anteriores (DrugBank, 2010). La dosis más alta sugerida es de 3 mg, sin embargo, los científicos han demostrado menor índice de efectividad y mayor el número de efectos secundarios (FDA, 2013). La continuación del tratamiento dependerá de la reducción de las crisis o la intensidad de los efectos secundarios. Para poder concluir el tratamiento si un síndrome de abstinencia, se debe de reducir la dosis (0.125mg) cada tercer día, hasta que el fármaco esté completamente retirado (FDA, 2013).

EFECTO DEL ESTRÉS SOBRE REPRODUCCIÓN

Múltiples pueden ser los efectos del estrés sobre la fisiología de los organismos, sin embargo, una de funciones más afectadas ha sido la reproducción. Las afectaciones pueden ser a niveles anatomofuncionales y pueden ser diferentes en cada sexo. Por lo tanto, en la presente sección haremos una breve descripción del aparato reproductor femenino y masculino y como pueden ser afectados por estrés.

Aparato reproductor femenino

Primero, se describirá brevemente la fisiología y anatomía del aparato reproductor femenino.

Ovario

Los ovarios se encargan de producir las células sexuales femeninas (óvulos), también tienen una función endocrina que es síntesis de las hormonas sexuales femeninas, como: estrógenos y progesterona (Ramírez-Gonzalez, 2012) . Los ovarios tienen una consistencia dura en forma de almendra y una superficie lisa antes de la pubertad, sin embargo, cuando inicia la menstruación, se van deformando con el transcurso del tiempo (Sirtokin, 2011).

La reserva de óvulos es finita, la mujer nace con alrededor de 1 millón de células, y disminuye progresivamente hasta el periodo de la pubertad (Ramírez-Gonzalez, 2012). En la pubertad tiene un promedio de 300,000 mil óvulos y la hipófisis empieza a producir las hormonas gonadotrópicas, como la foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), las cuales se encargan de la maduración de los folículos, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Ramírez-Gonzalez, 2012). Cada ciclo empieza con la maduración de varios folículos y sólo uno de ellos madurará y dará salida al ovulo (Ramírez-Gonzalez, 2012).

Tubas uterinas

Las tubas son los conductos que acarrean a los óvulos desde el ovario hasta el útero. Llegan a medir 12 centímetros y se dividen en: pabellón, ampolla, istmo y porción intramural (Sirtokin, 2011). Mientras que, su estructura interna está formada por tres capas: mucosa, muscular y serosa, separadas de manera heterogénea (Sirtokin, 2011).

Las funciones de las tubas uterinas son: arrastrar al óvulo en una corriente liquida, retrasar al ovulo mediante la mucosa y las células secretoras tubáricas nutran al ovulo (Findlay, Kerr, Britt, & Hii-Liew, 2009). Finalmente, las tubas se encargan de trasladar al óvulo fecundado y sin fecundar, mediante contracciones musculares (Briceag, 2015).

Útero

El útero es un órgano móvil y se encuentra en medio de la vejiga y el recto, debajo del intestino y encima de la vagina (Findlay, Kerr, Britt, & Hii-Liew, 2009). En la mitad del órgano se sitúa un estrechamiento y es dividido en dos partes (Findlay, Kerr, Britt, & Hii-Liew, 2009).

La estructura interna se divide en 3 capas: la mucosa donde se encuentran vasos y glándulas tubulares simples, miometrio se subdivide en 3 capas: capa interna, capa media y capa externa; finalmente la serosa (Ramírez-Gonzalez, 2012).

Las funciones del útero son mantener al embrión durante el embarazo y expulsar al feto cuando llega el término (Sirtokin, 2011). El desalojo del feto necesita de la contracción de fibras musculares uterinas y hormonas (oxitocina, estrógenos y prostaglandinas) (Sirtokin, 2011).

Vagina

La vagina es un conducto de 10cm que abarca desde el cuello del útero a la vulva y está situada entre la vejiga y el recto . Su estructura es elástica, lo que permite la salida del feto en el parto (d'Amati, Tiziana-di-Gioia, & Proietti, 2003). Respecto a la estructura interna consta de la mucosa, la cual cambia en el ciclo menstrual, la capa muscular y la adventicia, donde están contenidos nervios y vasos sanguíneos (Sirtokin, 2011).

La vagina es encargada de recibir al pene y contribuye en la lubricación sexual durante el coito (d'Amati, Tiziana-di-Gioia, & Proietti, 2003). Además, en el parto, la elasticidad es crucial para que el feto pase por ella hacia el exterior (d'Amati, Tiziana-di-Gioia, & Proietti, 2003).

Genitales externos

La vulva es el conjunto de órganos genitales externos, la cual está limitada por los labios mayores y por dentro de los labios menores, que definen la apertura de la vagina y de la uretra (Thibodeau, 2015). En la parte de atrás de los labios, se

encuentra el clítoris, el cual es el órgano eréctil de la mujer y está compuesto a partir de 2 cuerpos cavernosos (Thibodeau, 2015). Finalmente, la uretra femenina está en estrecha relación con el órgano genital, dado que desemboca en el vestíbulo vulvar (Thibodeau, 2015).

Las funciones de la vulva son la dilatación del orificio vaginal para permitir el paso del feto, producir una secreción lubricante que facilita la penetración y la uretra que interviene en la eliminación urinaria (Sirtokin, 2011).

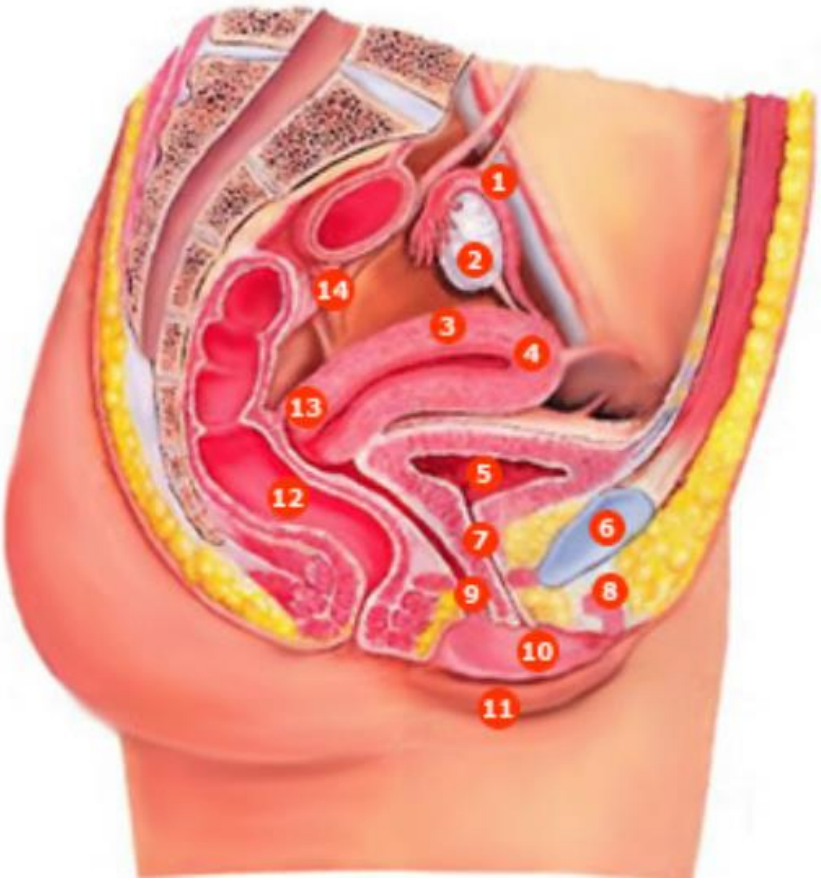


Ilustración 7. Corte sagital del aparato reproductor femenino. Para su esquematización fueron enumeradas las partes de la siguiente manera: 1) ***Trompa uterina****; 2)* ***Ovario****; 3)* ***Cuerpo del útero****; 4)* ***Fondo del útero;*** *5)* ***Vejiga urinaria****; 6)* ***Sínfisis del pubis****; 7)* ***Uretra;*** *8)* ***Clítoris****; 9)* ***Vagina****; 10)* ***Labio mayor****; 11)* ***Labio menor****; 12)* ***Recto****; 13)* ***Cuello****; 14)* ***Uréter*** *(Thibodeau, 2015).*

Los efectos del estrés psicológico sobre la fertilidad femenina

La relación entre una respuesta desadaptativa prolongada por parte de la mujer y el efecto en su fertilidad, ha sido estudiada y cuestionada a lo largo de los años. Se ha demostrado, en modelos animales y en humanos, que el cortisol secretado por un periodo largo, puede ocasionar efectos adversos prolongados en el sistema neuroendocrino. Uno de ellos se realizó en monos hembras que fueron expuestas a estrés psicológico y se observó un incremento importante de la actividad en la zona adrenal, la cual está significativamente relacionada con la disfunción reproductiva por estrés inducido (Nargund, 2015). Como también se demostró que altas concentraciones de glucocorticoides en la sangre, afectan directamente al hipotálamo (Whirledge, 2013). De esta manera, es alterada la liberación fisiológica de la hormona gonadotropina (GnRH), lo que genera una reducción de estrógenos y la hormona luteinizante (LH) (Whirledge, 2013). Éste desajuste causa un retraso en la maduración folicular y ovulación (Whirledge, 2013).

En otro estudio en ovejas, demostraron una relación directa entre la producción de la hormona inhibidora de gonadotropina con el estrés crónico, lo que abstiene la liberación de LH por parte de la hipófisis . Se conoce actualmente que las anomalías en las secreciones de LH tiene un efecto directo sobre la secreción y la síntesis de esteroides sexuales dentro del ovario (Kumar & Sharma, 2014).

Finalmente, se demostró mediante modelos murinos que el estrés puede reducir la receptividad endometrial, aun administrado suplementos hormonales (Whirledge, 2013).

A partir de los cambios en los procesos neuroendocrinos, por consiguiente, sabemos que se afectan eventos fisiológicos relacionados con la fertilidad, como: la ovulación, la fertilización, reducción en las tasas de concepción, ciclos de menstruación prolongados (mayores a 35 días) y reducción de la reserva ovárica (Palomba, y otros, 2018). Finalmente Palomba et al. (2018) publicó una revisión, en donde recopiló información acerca de los efectos que tiene el estrés sobre diferentes partes del cuerpo. En el subtema relacionado con el aparato reproductor femenino, realizó el siguiente esquema explicando dos vías de afectación; la primera mediante una desregulación hormonal explicada previamente y la segunda basada en la

producción de especies reactivas de oxígeno causadas por cambios en el estilo de vida, lo que conlleva una respuesta apoptótica por parte de las células granulares, el resultado de ambias vías es la apoptosis ovárica (Palomba, y otros, 2018).

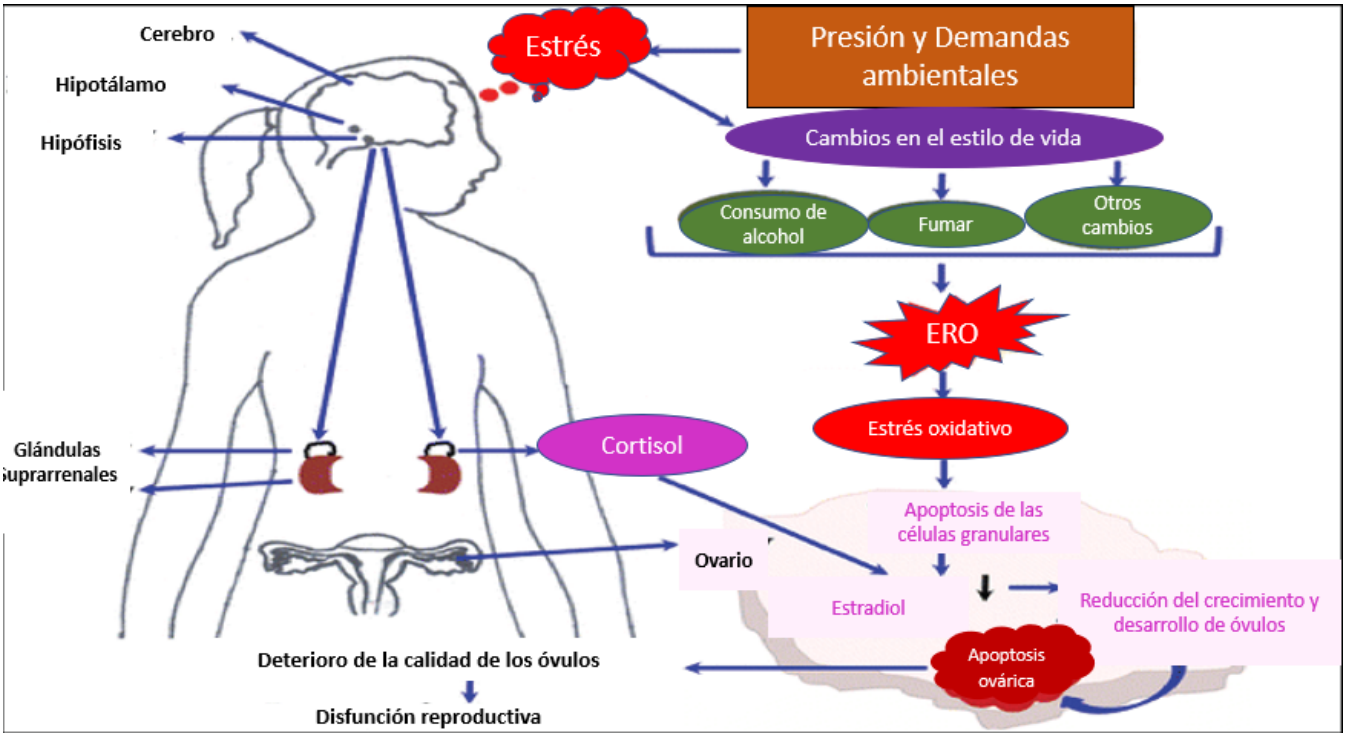


Ilustración 8. Diagrama esquemático mostrando el impacto del estrés sobre el aparato reproductor femenino (Palomba, y otros, 2018).

Sistema Reproductor masculino

El sistema reproductor masculino consta de los testículos, los cuales tienen funciones endocrinas, la formación y maduración de espermatozoides, que serán trasladados a través de las vías espermáticas hasta la uretra con la ayuda de las contracciones musculares de la próstata, finalmente los espermatozoides desembocan en el exterior a través del pene (Cordova, 2003).

Testículos

Los testículos son 2 órganos situados en el exterior de la cavidad abdominal y se alojan junto al epidídimo dentro de las bolsas escrotales, las cuales tienen como función mantener los testículos a una temperatura inferior a la temperatura corporal (King-Stransiger & Di Lorenzo, 2008)

El testículo se conecta con la cabeza del epidídimo en la parte superior, mientras que el cuerpo y la cola del epidídimo descienden unidos a la cara posterior del testículo (King-Stransiger & Di Lorenzo, 2008).

Con lo respecta a la estructura interna, el testículo está envuelto por una capsula fibrosa y en la parte posterior se encuentra el cuerpo de Highmore (King-Stransiger & Di Lorenzo, 2008). En el cuerpo de Highmore emergen los lóbulos del testículo que dividen al testículo en 300 compartimentos (King-Stransiger & Di Lorenzo, 2008). Dentro de cada lóbulo, se encuentran los tubos seminíferos, en donde se forman los espermatozoides (Rodríguez, González-Santos, Vargas-Ibarra, & Herrera-Barragán, 2018). En el hombre durante la pubertad aumenta el número de mitosis que realizan las espermatogonia. En el proceso de espermatogénesis, las células de Sertoli tienen diferentes funciones, como: aportan nutrientes a los espermatozoides, segregan hormonas, estimulan a las células de Leydig, forman una barrera hemato-espermática (la cual impide la entrada de células sanguíneas pero sí el paso de oxígeno), determinan el sexo masculino del progenitor, etc; por otro lado, se encuentran las células de Leydig o células intersticiales, las cuales producen testosterona y la vierten en los capilares (Rodríguez, González-Santos, Vargas-Ibarra, & Herrera-Barragán, 2018).

Espermatogénesis

Fase meiótica de la espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso continuo, en donde están involucrados cambios celulares y genéticos controlados, de esta manera, el ADN de los espermatozoides maduros, no presenta alteraciones y se encuentra empaquetado

correctamente por las histonas y las protaminas (Navarro-López, 2018). Éste proceso es dividido en tres fases: fase mitótica, fase meiótica y espermiogénesis. La mitosis inicia cuando las células germinales primordiales entran a la gónada y forman espermatogonias, las cuales se dividen de forma continua (espermatogonias de tipo A) o algunas de ellas, no se dividirán más (espermatogonias de tipo B) y formaran espermatocitos primarios (Navarro-López, 2018). Posteriormente comienza la meiosis, en donde las espermatogonias de tipo B tienen dos fases meióticas; con lo que respecta a la 1° fase meiótica o meiosis I, se formarán los espermatocitos secundarios, los cuales son haploides y de menor tamaño que su antecesor (Salazar, 2011). Cabe mencionar que durante la profase I de la meiosis, la proteina Spo11 corta al ADN de doble cadena, estos cortes son necesarios para que ocurra la recombinación homóloga (Keeney, Lange, & Mohibullah, 2014). Una vez finalizada la recombinación, la proteina serina/treonina quinasa mutada (ATM) repara las terminaciones libres y preveniene otra ruptura de ADN (Cooper, Wardell, Garcia, & Neale, 2014). Consecutivamente, sucede la 2° fase meiótica o meiosis II y se forman cuatro espermátidas haploides, las cuales contienen un núcleo alargado con ADN y un flagelo que les permiten moverse al centro del túbulo seminífero; sin embargo, carecen de una morfología celular para una adecuada fecundación (Salazar, 2011).

Espermiogénesis

Las células de Sertoli inducen el proceso de espermiogénesis o metamorfosis, el cual es el conjunto de diferenciaciones que sufren las espermátidas hasta convertirse en espermatozoides maduros. Se reconocen cuatro fases características: la fase de Golgi, la fase de capuchón, acrosomal y maduración (Navarro-López, 2018): En primer lugar, el aparato de Golgi se desplaza al núcleo y se fusionan sus vesículas para convertirse en la vesícula acrosomal que se localiza en la parte apical del núcleo. Esta unión permite que los centriolos en forma de T migren hacía lo que se convertirá en la base del núcleo. Mientras que, a partir del centriolo distal crece el axonema, el cual está compuesto de nueve microtúbulos

y abarca desde el cuello del espermatozoide hasta la tercera parte distal del flagelo (Salazar, 2011). Posteriormente, la vesícula acrosomal se aplana formando una capucha sobre el núcleo, esta etapa se conoce como “fase acrosomal” (Salazar, 2011). La cromatina del núcleo aumenta su condensación, debido a que ocurre un intercambio de histonas por protaminas, las cuales se unen para formar estructuras toroides, de esta manera, poder compactar al ADN, por consiguiente no puede haber ni replicación ni transcripción (Salazar, 2011). Consecutivamente, las estructuras toroidales con el ADN se ensamblan a la matriz nuclear en las regiones de unión a la matriz (“MAR regions” por sus siglas en ingles) (Ward, 2010). El alto grado de compactación del ADN con las protaminas, le dan la capacidad al espermatozoide maduro transportar el material genetico masculino, sin ninguna alteración, hasta llegar al ovulo y formar el cigoto (Barnes, Zubair, John, Poirier, & Martin, 2018). Durante la fase acrosomal, el acrosoma queda en dirección de la membrana basal en donde se depositan los gránulos; mientras que el citoplasma se traslada hacia la base de la cabeza (Barnes, Zubair, John, Poirier,. Por otro lado, la mitocondria migra y rodea a la parte proximal del axonema flagelar y a las fibras densas (Navarro-López, 2018). Éste conjunto de compartimentos formaran la pieza intermedia del espermatozoide maduro (Navarro-López, 2018). Finalmente, durante la fase de maduración, los espermatozoides tienen su morfología final: la cabeza ovalada y plana cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma, la mitocondria se encuentra en la pieza media y la cola dividida en tres piezas (media, principal y terminal) (Navarro-López, 2018). En esta fase se origina la gota citoplasmática, dado que el citoplasma se desplaza hacia la pieza terminal de la cola (Navarro-López, 2018).

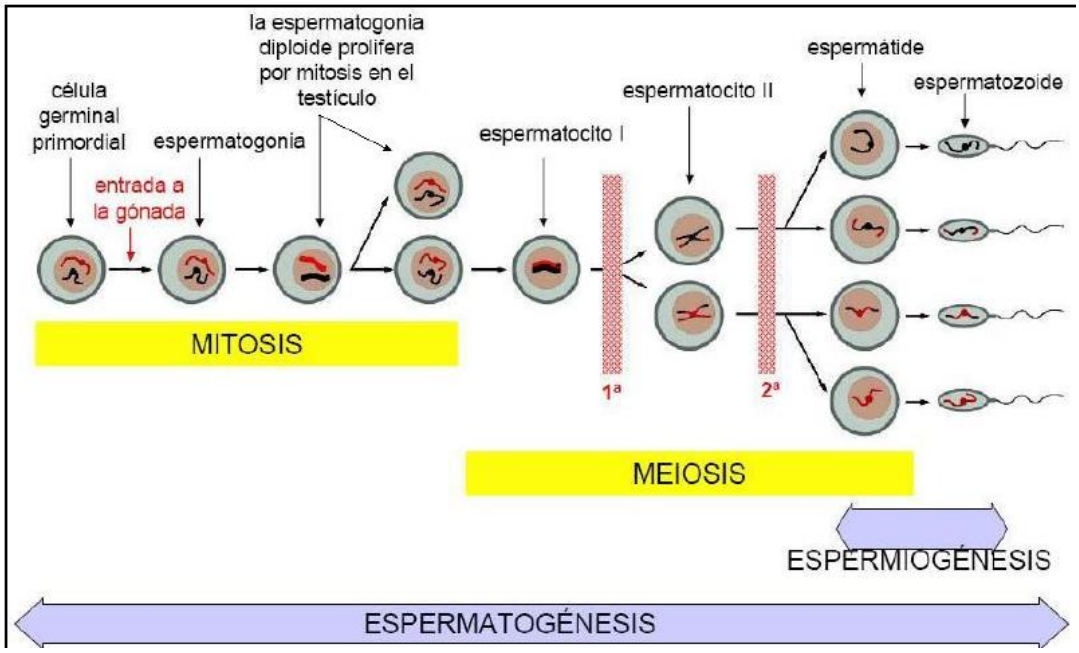


Ilustración 9.. Fases de la espermatogénesis. La espermatogénesis se divide en tres fases: fases mitótica, fase meiótica y espermiogénesis (Navarro-López, 2018).

Espermiación

La fase de maduración culmina con la espermación, la cual consta en la liberación mediante movimientos peristalticos de los espermatozoides a la cola del epididmo en donde son almacenados.

Espermatozoide maduro

El espermatozoide está compuesto por cuatro partes: la cabeza, el cuello, la pieza media y la cola (King-Stransiger & Di Lorenzo, 2008). A partir de esta base, los expertos concuerdan que la morfología de un espermatozoide normal es la siguiente: la cabeza tiene una estructura ovalada y mide de 3 a 5 µm de largo y 2 a 3 µm de ancho (King-Stransiger & Di Lorenzo, 2008). La mayor parte de la cabeza es abarcada por el acrosoma, el cual contiene enzimas esenciales en el proceso de fertilización y cubre 2 tercios del núcleo espermático (King-Stransiger & Di Lorenzo, 2008). La pieza media tiene que ser esbelta y está rodeada por una vaina mitocondrial que produce la energía requerida para la movilidad de la cola (King-

Stransiger & Di Lorenzo, 2008). Finalmente, la cola es uniforme y más delgada que la pieza media (King-Stransiger & Di Lorenzo, 2008).

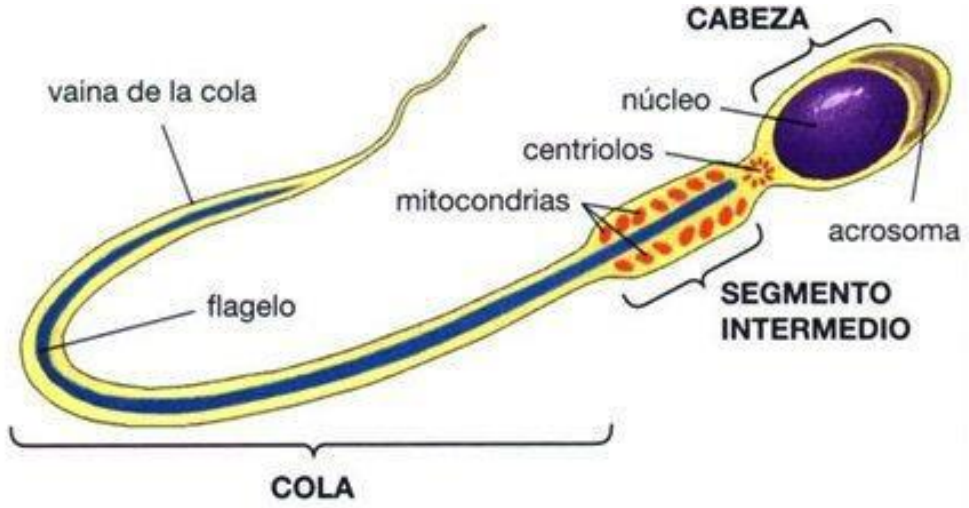


Ilustración 10. Partes del espermatozoide humano. (Parada-Puig, s.f.).

Los espermatozoides humanos necesitan tres procesos fisiologicos para poder feritilizar: maduración epidimaria, capacitación y reacción acrosomal (Rodríguez, González-Santos, Vargas-Ibarra, & Herrera-Barragán, 2018). La maduración del espermatozoide va transcuriendo mientras transita a lo largo del epididimo y son considerados maduros y fertiles (Rodríguez, González-Santos, Vargas-Ibarra, & Herrera-Barragán, 2018). Con lo que respecta a la capacitación y reacción acrosomal ocurren dentro del aparato reproductor de la hembra (Rodríguez, 2018).

Calidad espermática

La calidad espermatica de un paciente puede ser evaluada mediante el espermiograma, él cual se basa en parametros macroscopicos y microscopicos (Toro-Montoya, 2009). Los parametros macroscopicos el analisis del semen, que incluyen: la evaluación de la apariencia, la licuefacción, la viscosidad o consistencia, el volumen de la muestra y el pH(Toro-Montoya, 2009. Mientras que los parametros microscopicos analizan las caracteristicas de los espermatozoides maduros, como son: la motilidad, la vitalidad, el recuento de células, la morfología de los espermatoides y examen citobacteriólogico sobre el semen (Toro-Montoya, 2009).

Cabe mencionar, que en los ultimos años, se han demostrado diferentes anomalidades en los espermatozoides causadas por defectos genéticos.

Las vías espermáticas

Las vías espermáticas incluyen: los tubos seminíferos, los tubos rectos, la red de Haller, los conductos eferentes, epidídimo, conducto deferente, vesículas seminales y conductos eyaculadores (Jameson, 2013).

Las vesículas seminales son encargadas de secretar el líquido seminal en la eyaculación y están situadas entre la vejiga y el recto, por encima de la próstata (Jameson, 2013). . Finalmente, el conducto eyaculador es un tubo corto que atraviesa la próstata y termina en la uretra prostática (Jameson, 2013).

En la estructura interna, se encuentran los conductos eferentes, los cuales constan de células ciliadas y células con micro vellosidades (Jameson, 2013). Estas vellosidades facilitan la progresión de los espermatozoides hacia el conducto epididimario (Jameson, 2013).

Se puede concluir, las principales funciones de las vías espermáticas (Jameson, 2013):

- Ayudar a los espermatozoides mediante contracciones hacía el exterior en el momento de la eyaculación.
- Las células de algunas vías espermáticas producen una secreción mucosa que nutre a los espermatozoides y los protege en el trayecto.

Próstata

La próstata es una glándula de secreción exocrina que se sitúa debajo de la vejiga y por la parte posterior se localiza el recto (Robles-Rodriguez, Garibay-Huarte, Acosta-Arreguín, & Morales-López, 2019). Respecto a la estructura interna, existen diversas vías espermáticas que dividen a la próstata en cuatro lóbulos: uno medio

otro anterior y dos laterales (Robles-Rodriguez, Garibay-Huarte, Acosta-Arreguín, & Morales-López, 2019).

El líquido prostático es blanquecino y se une a las secreciones espermáticas para constituir el semen, con el objetivo de neutralizar la acidez de los demás componentes del semen (Robles-Rodriguez, Garibay-Huarte, Acosta-Arreguín, & Morales-López, 2019). Finalmente, durante la eyaculación, la próstata se contrae para expulsar su liquido hacía la uretra (Robles-Rodriguez, Garibay-Huarte, Acosta-Arreguín, & Morales-López, 2019).

Pene

El pene es un órgano cilíndrico y está formado por tres elementos que permiten la erección: dos cuerpos cavernosos y un cuerpo esponjoso (Walton, 2017). Además, el pene está recubierto por varias capas: la fibroelástica, la fascia peneana, la fascia superficial del escroto y perineo (Walton, 2017).

El pene tiene 2 funciones: interviene en la micción y permite la copula en el acto sexual (Fritz & Speroff, 2011). Por estimulaciones nerviosas, los cuerpos cavernosos y esponjosos se irrigan, lo que permite que el pene aumente de tamaño y se endurezca para la realización del coito (Fritz & Speroff, 2011). Durante el coito, se observan varios cambios fisiológicos y se pueden dividir en 3 fases: excitación, orgasmo y resolución (Fritz & Speroff, 2011). Sin embargo, este proceso puede ser inhibido por estímulos psíquicos, como el temor (Fritz & Speroff, 2011).

Uretra masculina

Desde la vejiga urinaria, la uretra desciende atravesando la próstata y es nombrada como uretra prostática (Mulţescu, 2016). En el sector, donde, la uretra atraviesa el musculo del perineo, es nombrada como uretra membranosa (Mulţescu, 2016). Finalmente, la uretra pasa por debajo del musculo del perineo y entra en el bulbo

esponjoso, a partir del bulbo hacía el exterior, se conoce como uretra esponjosa (Mulţescu, 2016).

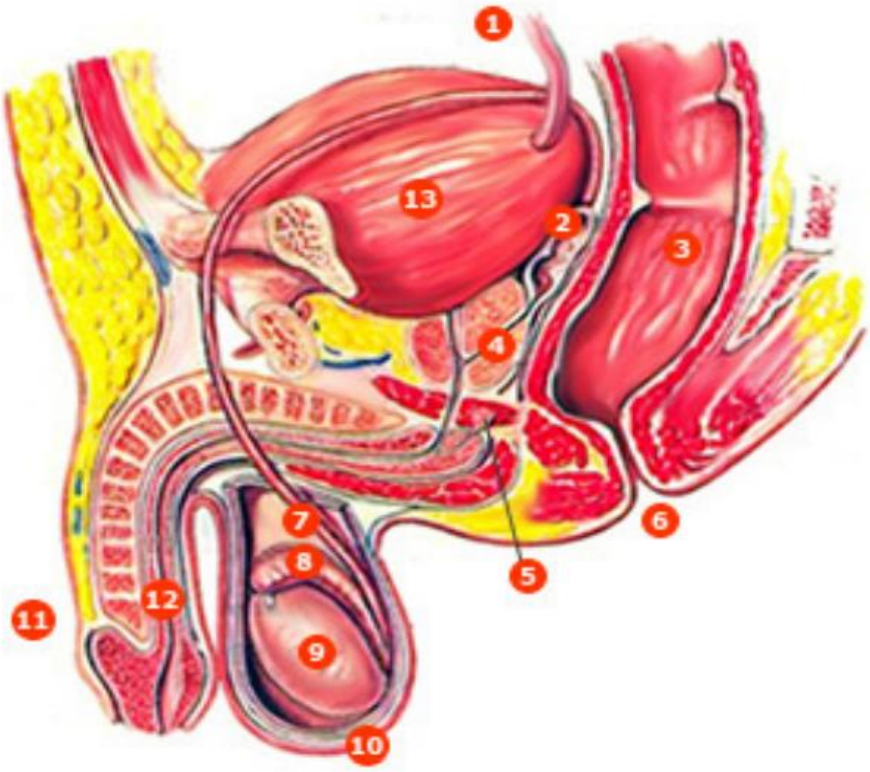


Ilustración 11. Corte sagital del aparato reproductor masculino. Para su esquematización fueron enumeradas las partes de la siguiente manera: 1) ***Uréter****; 2)* ***Vesícula seminal****; 3)* ***Recto****; 4)* ***Glándula prostática;*** *5)* ***Glándula de Cowper****; 6)* ***Ano****; 7)* ***Conducto deferente;*** *8)* ***Epidídimo****; 9)* ***Testículo****; 10)* ***Escroto****; 11)* ***Pene****; 12)* ***Uretra****; 13)* ***Vejiga urinaria*** *(Mulţescu, 2016).*

Efecto del estrés psicológico sobre la espermatogénesis

En los últimos años, estudios epidemiológicos han encontrado que existe una relación entre el estrés psicológico y la infertilidad masculina. Uno de ellos fue realizado en murinos, donde se demostró que glucocorticoides secretados por el estrés psicológico pueden afectar negativamente a las células de Leydig, por consiguiente, una reducción en la síntesis de testosterona (Nargund, 2015).

Posteriormente, se realizó un estudio en ratas, donde se buscaba demostrar el efecto que tiene el estrés psicológico sobre la espermatogénesis. Peng et al. (2019) buscaron explicar el desequilibrio en el proceso de la espermatogénesis ocasionado por el estrés, mediante el diseño de un posible mecanismo molecular de dos pasos, el cual es el siguiente: en primer lugar, el estrés crónico detiene el ciclo celular de las espermatogonias en la fase G_0/G_1, por consiguiente, el número de espermátidas y espermatozoides maduros se reduce drásticamente (Peng, y otros, 2019). Asimismo, se propone un incremento en el número de espermátidas apoptóticas, de esta manera, se reduce el número de espermátidas en cada túbulo seminífero. El segundo enunciado se atribuye, que el proceso de apoptosis es ocasionado por estrés oxidativo. Peng et al. (2019) para poder explicar los enunciados mencionados, esquematizó el siguiente mecanismo:

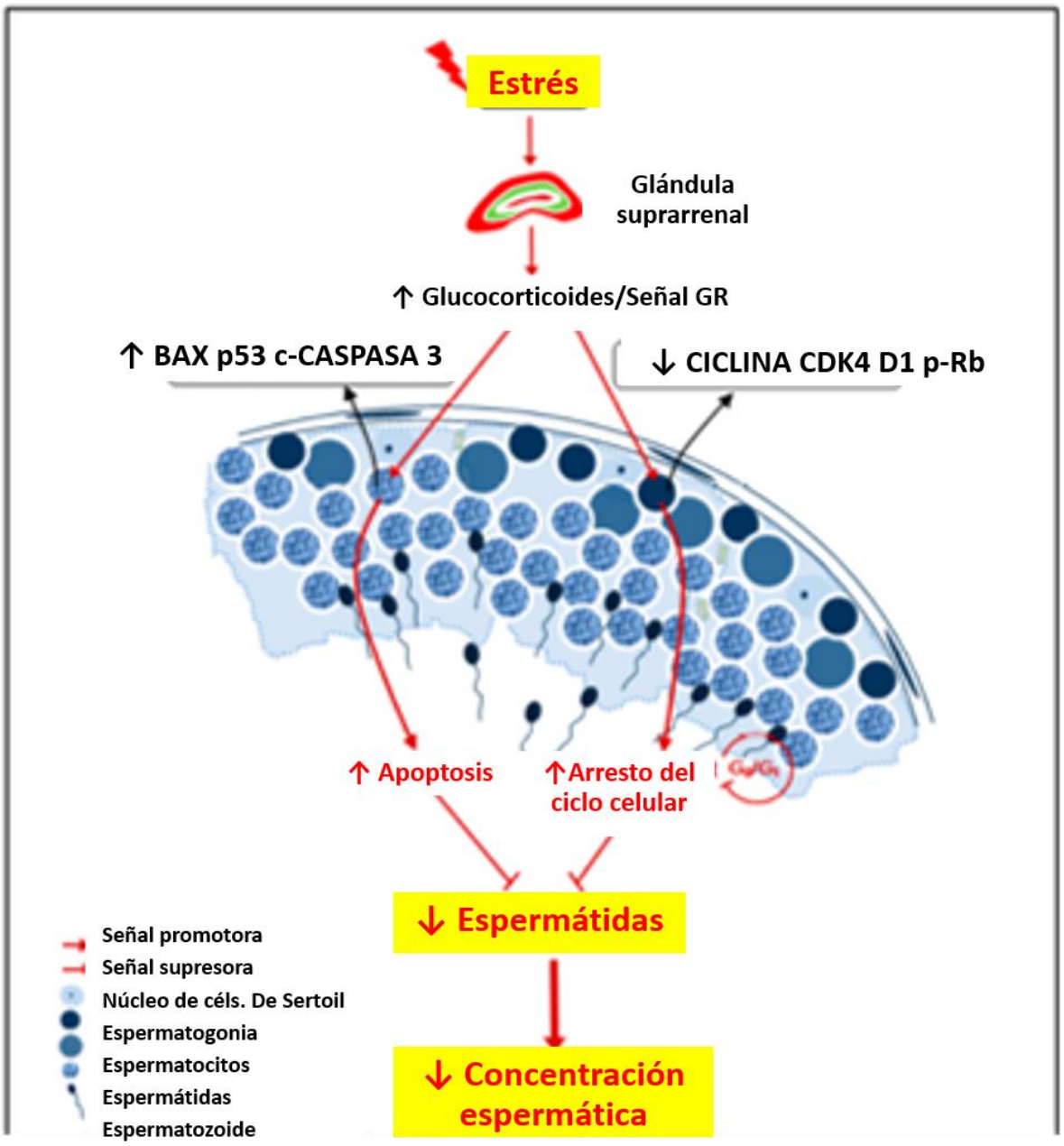


Ilustración 12. El modelo propuesto por Peng y colaboradores esquematizando el deterioro de la espermatogénesis inducido por estrés psicológico. El mecanismo molecular propuesto se divide en dos partes: 1) la producción de glucocorticoides activa la señalización de los receptores de glucocorticoides (GR), los cuales estimulan apoptosis en las espermátidas a través de la activación de BAX, p53 y CASPASA 3. 2) El estrés inhibe la progresión celular de las espermatogonias en la fase G0/G1 mediante la desregulación de CDK4, Ciclina D1 y p-RB. En ambos aspectos se puede visualizar la reducción de espermátidas, lo que conlleva a una reducción de la concentración de espermatozoides maduros (Peng, y otros, 2019).

Además, el estrés psicologico puede reducir la producción de testoterona. La ausencia de testosterona desplaza prematuramente a las células germinales de las

células de Sertoli, por consiguiente, no se continua el proceso de meiosis y se reduce el número de espermatozoides (Afrisham, y otros, 2016).

Efecto del estrés sobre la función hormonal masculina

Los tratamientos de fertilidad pueden ser frustrantes para el paciente, debido a los esfuerzos prolongados en toma de medicamentos y los costos en el transcurso del tratamiento (Rooney & Domar, 2018). Por ello, se ha investigado acerca de las causas del mal funcionamiento del sistema reproductor masculino que conlleva a la infertilidad.

Una de las posibles causas es el desajuste hormonal en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HPG), el cual está relacionado estrechamente con el eje HHA (Rooney & Domar, 2018). El eje HPG maneja la función reproductiva en ambos sexos, de la siguiente manera: En primer lugar, la hormona liberadora de gonadotropina es secretada por el hipotálamo, posteriormente estimula a la hipófisis para la liberación de las gonadotropinas hormona folicular estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), así poder regular la función testicular (Dwyer & Quinton, 2019). El eje HHA inhibe al eje HPG mediante la inhibición de producción de GnRH por la alta producción de glucocorticoides.

Los glucocorticoides afectan la función testicular en diferentes niveles del eje HPG a través de los receptores en las neuronas hipotalámicas, en la hipófisis y en los testículos (Rooney & Domar, 2018).

A nivel hipotalámico, los receptores de glucocorticoides contribuyen a la inhibición de GnRH y reducir la liberación de LH y FSH de la hipófisis (Rooney & Domar, 2018). A nivel hipofisiario, los glucocorticoides regulan el gen receptor GnRH, el cual está encargado de regular las gonadotropinas (Rooney & Domar, 2018).

Los receptores de glucocorticoides están localizados en varias células testiculares como: las células de Leydig, macrófagos, fibroblastos, células de musculo liso y células endoteliales de vasos sanguíneos (Rooney & Domar, 2018). Cabe mencionar que se han encontrado células de Leydig con receptores de

glucocorticoides en otros órganos del aparato reproductor masculino, sin embargo, no se conoce aún su función (Rooney & Domar, 2018).

Efecto del estrés sobre la calidad espermática

La fertilidad masculina depende de múltiples factores bioquímicos, como por ejemplo, la participación de oxígeno en los procesos que afectan al espermatozoide: espermatogénesis, capacitación espermática, hiperactivación, motilidad, reacción del acrosoma y fertilización de los ovocitos (Collodel, y otros, 2008). Sin embargo, el oxígeno puede afectar las funciones de las células, mediante las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Atiken, Gibb, Baker, Drevet, & Gharagozloo, 2016). Una de las principales causas del desencadenamiento de las ERO es el estrés psicológico, el cual es capaz de desregular la producción de gonadotropina, por consiguiente, disminuir las concentraciones de LH y FSH (Sundararajan, y otros, 2018).

Existe una correlación de ERO con el bajo porcentaje de células y presencia de anomalías en los espermatozoides, como: cabezas amorfas, deformidades en el acrosoma, defectos en la pieza media y flagelo. A su vez, espermatozoides amorfos son los principales productores de ERO dentro de la eyaculación humana

Con respecto a las afectaciones en la motilidad, como se mencionó, el organelo encargado de la provisión de energía en las células es la mitocondria, la cual es afectada por las especies reactivas de oxígeno (Tremellen, 2008).. Una de las principales funciones de la mitocondria en los espermatozoides es la fosforilación de las proteínas del axonema, al verse inhibida esta relación entre la pieza media y el axonema, se imposibilita el movimiento del espermatozoide (Tremellen, 2008).

Finalmente, el estrés puede dañar al ADN espermático de diferentes maneras. Se conoce actualmente que la ruptura de ADN induce una respuesta a las células somáticas, las cuales activan una maquinaria de reparación, apoptosis o transformación celular (Tremellen, 2008).. Sin embargo, sí este proceso, no se concreta, el espermatozoide maduro tendrá daños moleculares, como rupturas

dentro del cromosoma, translocaciones y fragmentación de ADN (Tremellen, 2008).. Con fines prácticos y apegándose realizado por la metodología, se profundizará acerca de la fragmentación de ADN espermático.

Fragmentación de ADN

La fragmentación del ADN espermático son las rupturas en la doble hélice del material genético del espermatozoide. Estas alteraciones son inducidas por modificaciones en la estructura de la bases nitrogenadas o formación de aductos en la estructura (Blanes & Domínguez, 2017). Cabe mencionar, que los espermatozoides con ADN dañado pueden fertilizar a los ovocitos, no obstante, el embrión puede sufrir alteraciones durante su desarrollo y/o compromete su viabilidad (Blanes & Domínguez, 2017). Asimismo, cuando no se realiza un estudio previo del ADN de los espermatozoides y se fecunda con un ovocito mediante reproducción asistida, se incrementa la posibilidad del aumento de anomalías cromosómicas, pequeños defectos de nacimiento o que el descendiente padezca cáncer infantil (Yang, Li, Jin, Guo, & Sun, 2019).

Por lo tanto, se ha propuesto el análisis de la integridad del ADN espermático como un parámetro y una herramienta eficaz en los laboratorios de andrología para proporcionar una valoración al paciente de su potencial fértil.

Causas de fragmentación de ADN espermático nuclear

La fragmentación de ADN es causada por diferentes factores, uno de ellos es la apoptosis incompleta (Atiken, Gibb, Baker, Drevet, & Gharagozloo, 2016). En el proceso de apoptosis espermático incompleto, se activan las nucleasas espermáticas de manera errónea, por lo que dañan la integridad del ADN o interrumpen el proceso de maduración en la espermatogénesis, provocando un empaquetamiento deficiente del ADN por parte de las protaminas y siendo susceptible al estrés (Atiken, Gibb, Baker, Drevet, & Gharagozloo, 2016). Estás alteraciones en el empaquetamiento puede deberse de manera indirecta a factores

externos, como el estrés psicológico (Atiken, Gibb, Baker, Drevet, & Gharagozloo, 2016).

Estrés oxidativo sobre el ADN espermático

Una de las principales causas de la fragmentación del ADN es la sobreproducción de ERO . Cabe mencionar que las ERO, en condiciones normales, son esenciales para que se produzca la capacitación y reacción acrosomal (Sabeti, Pourmasumi, Rahiminia, Akyash, & Reza-Talebi, 2016). El problema inicia cuando se produce un desequilibrio a favor de los agentes oxidantes, lo que compromete la integridad del ADN en las células afectadas (Sabeti, Pourmasumi, Rahiminia, Akyash, & Reza-Talebi, 2016).

El estrés oxidativo causa diferentes tipos de daños en el ADN, como: modificaciones de bases, la perdida de una base y rupturas en la estructura (Rooney & Domar, 2018). La manera más eficaz de saberlo es mediante marcadores sensibles inducidos por el estrés oxidativo, como es la 8-hidroxilación de la guanina (8-OHdG) (Rooney & Domar, 2018). Las elevadas concentraciones de 8-OHdG están relacionadas con infertilidad masculina (Rooney & Domar, 2018).

Anteriormente, se mencionó el efecto del estrés sobre la reducción de testosterona y el aumento células Leydig apoptóticas, causando un gran número de espermatozoides inmaduros, los cuales son los principales productores de ERO causantes de la fragmentación de ADN espermático (Xiong, y otros, 2019). Además, la producción de FSH es afectada, lo que va reducir el número de células de Sertoli. Una de las funciones de las células de Sertoli es fagocitar espermatozoides apoptóticos que expresan el marcador FasL (Wang & Su, 2018). La “hipótesis abortiva” menciona que la concentración de células de Sertoli no es suficiente para fagocitar los espermatozoides apoptóticos, por consiguiente, se concentraran espermatozoides incompletos en los tubos seminíferos (Zini & Agarwal, 2011).

JUSTIFICACIÓN

El estrés ocurre cuando un ser vivo busca adaptarse a un medio, en el cual no se encuentra cómodo y busca sobrevivir (Yong-Tang & Yip, 2018). Sin embargo, el humano al encontrase viviendo en una sociedad compleja, se encuentra envuelto en estrés gran parte de su vida (Domínguez , Collares, Ormaecha, & Tamoslunas, 2016).

México pertenece a la lista de los países más estresados del mundo, debido a las jornadas laborales extensas y los bajos salarios (Latina), 2018), lo cual imposibilita que el paciente se tranquilicé. Además, los niños y los jóvenes también están teniendo padecimientos inducidos por el estrés crónico (Martínez-Otero Pérez, 2015). En la actualidad, existe información que demuestra que el estrés crónico reduce la calidad espermática y produce alteraciones sobre el ADN espermático, por consiguiente, se reducen las posibilidades de tener descendencia (Saki & Rahim, 2009).

Existen diferentes maneras de como tratar el estrés, las cuales permiten al individuo poder aliviarlo, una de ellas es mediante la distracción de la vida laboral. No obstante, los médicos utilizan tratamientos farmacológicos para poder aliviar ciertos síntomas del estrés, como es el uso de benzodiacepinas. Estos fármacos actúan como sedantes o hipnóticos y tienen una gran afinidad por los receptores GABA, los cuales se encuentran distribuidos en gran parte del sistema nervioso central (Domínguez , Collares, Ormaecha, & Tamoslunas, 2016).

Por lo tanto será importante investigar cual es el efecto de las benzodiacepinas sobre la calidad espermática de ratones sometidos a estrés crónico.

HIPOTESIS

La administración de clonazepam contribuirá en la mejora sobre la calidad espermática afectada y el ADN dañado causado por estrés crónico.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto del clonazepam sobre la calidad espermática en ratones inducidos a estrés crónico.

Objetivos específicos

- Inducir estrés crónico en ratones machos de la cepa CD-1.
- Evaluar el efecto del tratamiento con ansiolíticos sobre la calidad espermática en ratones inducidos a estrés crónico.
- Analizar el efecto del tratamiento con ansiolíticos sobre la integridad del ADN espermático en muestras de ratones sometidos a estrés crónico.

METODOLOGÍA

Microambientación y macroambientación.

El lugar donde se resguardaron los individuos, se adecuó mediante la división del medio por zonas: microambientación y macroambientación, con el objetivo de poder controlarlo con mayor facilidad. Las adecuaciones fueron basadas en la información expuesta por (Cabezas-Sánchez, 2008).

El microambiente se preparó de la siguiente manera:

I. Caja de acrílico con una tapa de acero inoxidable.
II. El alimento era manipulado y almacenado en instalaciones limpias, de esta manera, se redujo la concentración de contaminantes (patógenos o plagas). Respecto al agua era

potable y suministrada sin restricciones en frascos de vidrio o de policarbonato.

Por otro lado, el macroambiente es la sala de alojamiento y se tomaron las siguientes medidas:

a) La ventilación exclusiva del bioterio era un factor importante para mantener la zona limpia, dado que, reducía la entrada de contaminantes.
b) Se procuraba mantener la temperatura en un rango de 20- 25°C dentro del bioterio.
c) El bioterio se mantenía iluminado durante 12 horas, en ciclo de luz invertida (encendido a las 7:00 pm). La iluminación era suficiente para poder realizar prácticas de mantenimiento, inspección y permitía el bienestar de los animales.
d) Se evitó realizar ruidos ajenos dentro del bioterio, que pudieran estresar a los animales.

Crianza de animales.

Se seleccionaron cinco ratones de la cepa CD-1 (4 hembras y 1 macho), los cuales fueron criados en el bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR). Los roedores se confinaron en una misma caja, para su posible reproducción, mediante el efecto de Whitten, el cual atribuye la sincronización del ciclo astral en las hembras al estar en contacto por tiempo prolongado con un macho, de esta manera, las hembras estuvieron receptivas al tercer día (Benavides, 2010).

Los ratones se encontraban en una supervisión diaria, con el objetivo, de poder de cubrir sus necesidades básicas e identificar las ratonas preñadas y separarlas de manera individual.

Durante la gestación (20 días), se cubrieron sus necesidades y se colocó papel higiénico dentro de la caja, con el objetivo de que pudieran realizar su nido.

El promedio de crías fue de 6 – 8 ratones por ratona. Tres semanas posteriores del parto, se identificó el sexo de los ratones, lo que permitió hacer un conteo de los machos que estarían involucrados en la parte experimental.

Ilustración 13. Crías de la cepa CD-1 con 5 días de edad.

Los roedores machos preseleccionados con un mes de edad fueron divididos en grupos de cinco, cada grupo fue confinado en una caja.

Para que los individuos iniciarán la inducción a estrés eran pesados diariamente, hasta alcanzar un peso de 30 gramos.

Se dividieron los grupos de animales en tres secciones (diez ratones en cada sección) de acuerdo al tratamiento al que fueron inducidos, los cuales son los siguientes: “Control” (sin estrés), “Estrés” (los roedores fueron inducidos a un estrés crónico por treinta días) y “Ansiolítico” (estrés crónico por treinta días con un tratamiento de ansiolítico (clonazepam) por dos semanas.

Inducción a estrés

Los individuos pertenecientes a las secciones “Ansiolítico” y “Estrés” fueron estresados durante tres horas diarias en el transcurso de un mes. Este método experimental se basó en lo sugerido por (Frisbee, Brooks, d´Audiffret, & Shyla, 2015). A continuación, se mencionan las pruebas utilizadas:

a. Humedecer la cama de 300- 550 mL.

b. Remover el encamado al individuo durante 4 horas.
c. Inclinar las cajas aproximadamente 45° (sin encamado) por 3 horas.
d. Colocar al animal en la casa vecina durante 3 horas (sin limpiarla previamente). Las camas se fueron alternando, con el objetivo, el ratón no se pudiera adaptar al olor.
e. Remover el encamado de cada caja y añadir agua hasta una profundidad 0.7 cm por 3 horas. Usar agua cálida (aproximadamente 30°C) para minimizar hipotermia. Finalmente secar los animales con una toalla suave antes de regresarlo en su caja limpia.

Ilustración 14. Lla prueba de estrés "Inclinación de caja". Los animales se colocaron en una inclinación de 45° durante tres horas.

f. Estas pruebas fueron alternadas diariamente de manera azarosa, con el objetivo de que el animal no se adaptará al experimento. El cronograma semanal de estrés fue el siguiente:

Tabla 4 Cronograma de trabajo semanal

Experimento	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
Sin encamado							
Caja inclinada							
Estrés social							
Llenado de la caja con profundidad de 0.7cm							
Humedecimiento de la cama.							

Tratamiento farmacológico

El grupo "Ansiolítico recibió el tratamiento farmacológico a la segunda semana de haber iniciado la inducción de estrés. El fármaco fue administrado diariamente por via oral como a continuación se describe.

3.1 La dosis fue seleccionada de acuerdo a la metodología descrita por (Ellmesallamy, Abass, Ahmed-Refat, & Atta, 2011) con algunas modificaciones. Se administró clonazepam (5g/ kg) a los ratones durante por dos semanas.

3.2 Se calculó la dosis de pastilla diaria, que debía ser administrada a cada animal. Las operaciones fueron las siguientes:

$$P = peso\ del\ ratón$$

$$Dcl = Dosis\ de\ clonazepam = \frac{5g}{kg}$$

$$Da = Dosis\ por\ animal$$

$$Rn = número\ de\ ratón$$

3.3 **Dosis de clonazepam por animal**

$$5g \times P = \frac{Resultado}{1000g} = Dosis\ por\ animal$$ Ec.1

Las unidades de masa en la dosis encontrada se convirtieron de kilogramos a gramos.

3.4 Dosis de clonazepam total: La dosis total diaria de clonazepam es la sumatoria de las dosis de los roedores.

$$Dosis\ de\ clonazepam\ total = Da_{R1} + Da_{R2} + Da_{R3} \ldots . Da_{R10} \ldots$$ Ec2.

Clonazepam fue obtenido de Sanofi Medley, Ciudad de México, México, en presentación tabletas (vía oral), el cual contiene 2 mg de componente activo. Por consiguiente, se realizó la ecuación 3, en donde, se conocía la porción de pastilla que se debía de utilizar.

$$Porción\ de\ pastilla\ diaria = \frac{Dosis\ clonazepam\ total \times peso\ de\ la\ pastilla}{componente\ activo\ de\ Clonazepam}$$ ..... Ec3.

3.5 Para que fuera posible la administración, se trituró la pastilla y se diluyó en agua potable, la cual fue la misma cantidad, de dosis de clonazepam total.

3.6 Se utilizó una micropipeta con puntas (10-100µL) para la administración oral, de esta manera, no se lastimaba el esófago del animal y era absorbido en su totalidad.

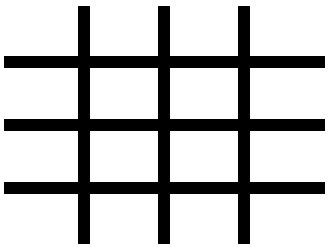
Evaluación conductual

En el transcurso de inducción a estrés, se realizaron pruebas de “Campo abierto” cada sexto día a todos los individuos. Esta evaluación es una de las más utilizadas en el campo de la psicología y valora la respuesta conductual o fisiológica ante estímulos estresantes o nuevos.

Preparación del modelo “Campo abierto”:

La creación de este modelo, se basó en lo descrito por (Saibenhener & Wooten, 2015), y consistió en lo siguiente:

1. Se construyó un corral cuadrado, cada pared midió $50\ cm\ largo \times 50\ cm\ ancho \times 38\ cm\ alto$ y era de un material no poroso y liso, lo que permitía una deambulación sin complicaciones y evitaba un escalamiento por parte de los individuos. Con lo que respecta al área donde eran realizadas las evaluaciones, tenía suficiente iluminación y se evitaba el ruido durante la prueba, para no perturbar a los animales y evitar resultados erróneos.
2. Se dibujó un cuadrante (4 X 4) en la parte inferior de la caja y en la bitácora, para poder contabilizar el movimiento. El cuadrante fue trazado de la siguiente manera:



3. El área se limpiaba antes y después de cada prueba con etanol al 95%, de esta manera, se eliminaba cualquier olor dentro de la caja.
4. Se dejaba evaporar el etanol durante cinco minutos antes de colocar al siguiente roedor.

4.2 La evaluación de cada animal duró 10 minutos.

4.3 Las pruebas fueron grabadas para su posterior análisis, mediante una videocámara (Full HD 1080p MP), la cual se situaba a 80 cm arriba de la caja.

4.3.1 Los videos fueron guardados en una computadora, para poder visualizarlos y estudiarlos con mayor facilidad. Posteriormente, en la bitácora del movimiento del roedor y se contabilizaron el número de cruces que hizo en los cuadrantes. Esto refleja un movimiento

constante por parte del individuo durante la prueba. Esta conducta puede ser un indicio de estrés.

4.3.2 Se calcularon los promedios de acuerdo a la suma de cruces total de cada sección entre el número de sus participantes.

4.3.3 El cotejo de los promedios se realizó mediante la “Prueba ANOVA”, la cual demuestra, si existe una diferencia significativa.

4.3.4 Se realizó una prueba de Turkey, la cual compara los promedios individuales derivados de ANOVA sometidos a tratamientos distintos. Asimismo, se añadieron barras de error que confirman la discrepancia entre los grupos.

Evaluación de la calidad espermática

Una vez concluidos los periodos de inducción de estrés y tratamiento farmacológico, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se diseccionaron y se obtuvieron los epidídimos, los cuales fueron mantenidos en solución salina hasta la extracción de los espermatozoides. Las células mencionadas se extrajeron por perfusión. Para ello, se realizó una incisión en la región caudal del epidídimo, que permitió recuperar a los espermatozoides, con ayuda de una jeringa (aguja 27G), se infundió solución de Storey a través del conducto deferente y fueron resuspendidos con la misma solución. Finalmente, se mantuvieron a 37°C las células hasta realizar el análisis espermatobioscópico.

a. Concentración espermática.

Una alícuota de la muestra se diluyó en una proporción 1:20, la cual fue colocada en una cámara de Neubauer para poder contar los espermatozoides. El conteo se realizó de 10 cuadrantes en ambas cámaras y el total fue dividido en dos. Como se describe en la siguiente formula:

$$\frac{Conteo\ de\ espermatozoides}{2} = No.\ de\ espermatozoides \ldots\ldots\ldots \text{Ec.4}$$

El resultado fue considerado como: número de espermatozoides/ml, y obtener el número total de espermatozoides, solo fue multiplicado por el volumen en que fue resuspendida la muestra. Como se describe en la siguiente ecuación:

$$\frac{No.de\ espermatozoides \times 10^6}{1mL} = Concentración\ espermatica \ldots\ldots \text{Ec.5}$$

b. Motilidad espermática

La evaluar la motilidad espermática, una alícuota de 10µL se colocó en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Se contaron un máximo de 200 células por muestra y se hizo una clasificación de acuerdo a los siguientes parámetros:

Parámetros	Descripción
Motilidad A o motilidad progresiva (MP)	Espermatozoides con motilidad progresiva
Motilidad B o motilidad *in situ* (MI)	Células con motilidad progresiva lenta o in situ
Motilidad C o inmovilidad (INM)	Espermatozoides inmóviles

Posteriormente, el porcentaje de espermatozoides motiles fue obtenido de la suma de los grupos A y B, se utilizando la siguiente formula:

$$\frac{número\ de\ espermatozoides\ móviles}{número\ de\ espermatozoides\ totales} \times 100 \ldots\ldots \text{ Ec.6}$$

c. Vitalidad Celular

Para evaluar el porcentaje de vitalidad de las muestras se utilizó el kit Live/Dead Sperm Viability Kit (Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una alícuota (100mL) tomada de cada muestra fue colocada en un tubo al cual se le agregaron 10mL de SYBR14 y 10mL de ioduro de propidio. Posteriormente, la mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una alícuota se

colocó en un portaobjeto y se observó bajo microscopia de fluorescencia. Los espermatozoides con fluorescencia verde fueron considerados como espermatozoides vivos, mientras que los espermatozoides con fluorescencia roja fueron considerados como muertos. Se calcularon los porcentajes de células vivas entre el número total de células presentes en los campos. Como se describe en la siguiente ecuación:

$$\frac{Células\ vivas}{células\ vivas + células\ muertas} \text{..... Ec.7}$$

Las pruebas mencionadas se compararon mediante la prueba de “Kruskal-Willis”, la cual coteja grupos con diferentes números de integrantes.

Análisis de fragmentación de ADN espermático por electroforesis de célula única (Prueba cometa).

En un portaobjetos, se colocaron 200 mL del gel de agarosa de punto de fusión normal a 4% e inmediatamente su cubrió con un cubreobjetos y se dejó gelificando en refrigeración. Por separado, los espermatozoides disueltos en medio Storey se incluyeron en gel de agarosa con bajo punto de fusión a una temperatura de 37°C. De esta solución, se depositaron 200 mL en el portaobjetos con el gel de agarosa ya gelificado y se selló la muestra con un cubreobjetos. Nuevamente, las muestras se dejaron gelificar en refrigeración, para poder retirar los cubreobjetos y colocarlos dentro de cajas Petri. Consecutivamente, las laminillas fueron bañadas con buffer de lisis alcalino y se mantuvieron por 45 minutos a temperatura ambiente; al finalizar el secado, se lavaron 3 veces con buffer TRIS. Después, las laminillas se colocaron de manera horizontal dentro de la cámara de electroforesis (TAE 1X) y se hizo un corrimiento electroforético bajo condiciones de 50V/300mA por 10min. Al terminar, las laminillas se lavaron de nuevo con buffer TRIS y se tiñeron por 5 minutos con la solución de “Anaranjado de acridina”. Finalmente, se realizaron 3 lavados con buffer (TAE 1X) y se les colocó un cubreobjetos. Bajo microscopia de fluorescencia, utilizando filtro de excitación entre 460 y 490 nm y un filtro de emisión menor 515 nm, y bajo un objetivo 40X, se analizaron 200 células.

Se consideraron los resultados de acuerdo a los siguientes parámetros:

Parámetros	Descripción
Espermatozoides con fragmentación en ADN.	Células con desplazamiento de ADN y adoptando forma de cometa.
Espermatozoides sin fragmentación de ADN.	Células con núcleo espermático condensado

Se calculó el porcentaje de células no fragmentadas, con la siguiente ecuación:

$$\frac{Células\ fragmentadas}{el\ número\ total\ de\ células} \times 100 = porcentaje\ de\ células\ fragmentadas \ldots \text{ Ec8.}$$

Con los resultados obtenidos de la ecuación, se realizó un análisis estadístico mediante la prueba de “Kruskal-Willis.

RESULTADOS

Inducción de estrés psicológico

El modelo utilizado para la inducción de estrés psicológico generó cambios sustanciales en el comportamiento de los sujetos de estudio.

Los resultados obtenidos en la fase experimental se compararon mediante pruebas estadísticas, como ANOVA y Turkey. Después de haber inducido estrés diario a los grupos “Estrés” y “Ansiolítico” durante 4 semanas, los individuos del grupo “Estrés” tuvieron mayor movilidad durante más tiempo durante la evaluación conductual, comparándolo con los demás grupos (casi todos los valores de $p<0.005$, excepto el día 2). Por otra parte, los ratones del grupo “Ansiolítico” inicialmente presentaron menor movilidad, en comparación con los demás grupos; sin embargo, el grupo a partir del día dieciocho (administración del fármaco) se redujo drásticamente el número de intersecciones comparándolo con el grupo “Control” ($p<0.001$). Estos resultados demuestran que el modelo para inducir estrés crónico se estableció con

éxito y que la dosis del ansiolítico redujo el movilidad de los individuos, lo cual puede traducirse como el efecto ansiolítico del fármaco.

El análisis estadístico proveniente de ANOVA, de los resultados observados, fueron comparadas entre sí para demostrar si existía una diferencia significativa en los movimientos entre los grupos durante cada evaluación conductual. La primera evaluación de estrés mediante “la Prueba de Campo Abierto” (sexto día de inducción de estrés a los ratones) a los grupos “Control” y “Estrés” se comportaron de una manera muy similar, esto puede deberse a que los roedores del grupo “Control” sintieron con sus extremidades, por primera vez, un material diferente al aserrín. Durante el día 12, todos los grupos tuvieron una conducta similar, pero a partir del día 18, la movilidad de los grupos “Control y “Ansiolítico” comenzaron a reducirse debido a una adaptación por parte del grupo “Control” a la evaluación y el tratamiento del fármaco empezó a reducir la ansiedad de los roedores pertenecientes al grupo “Ansiolítico”; asimismo, a partir del día 18 hubo una diferencia significativa en la conducta de todos los grupos.

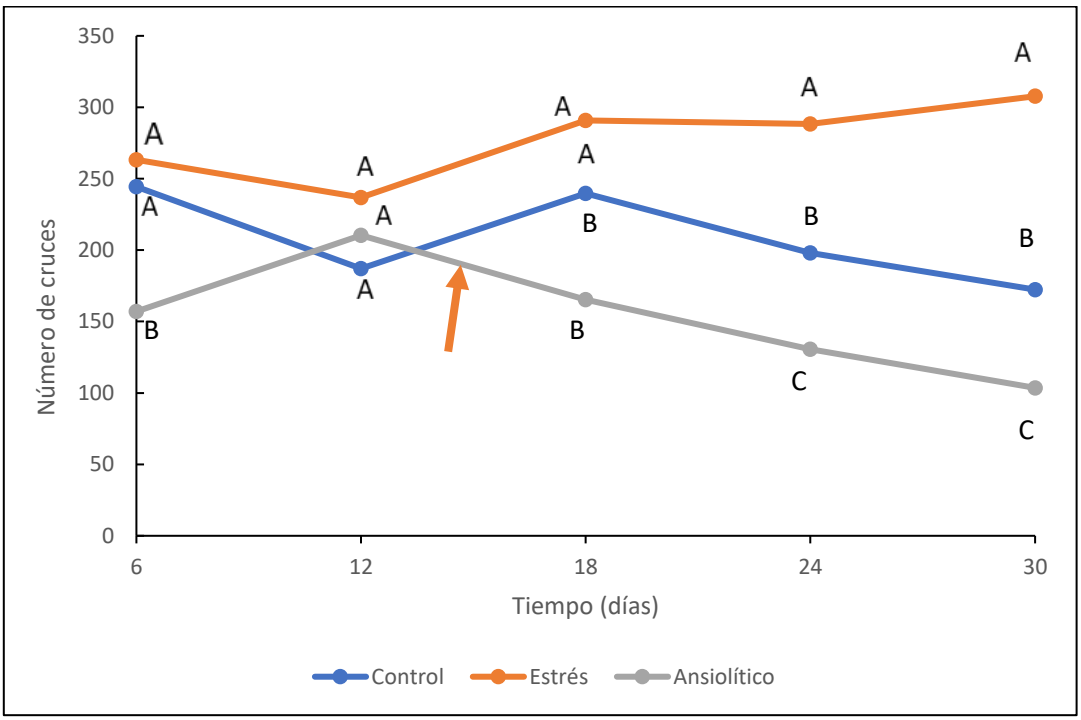


Figura 1. Promedios del número de cruces ± DS con respecto al tiempo en cada uno de los grupos estudiados en la “Prueba de Campo Abierto”. Para las pruebas de los grupos “Ansiolítico” y “Estrés” fueron previamente inducidos a estrés el cual se, demostró mediante las intersecciones. Los datos fueron analizados mediante ANOVA (Análisis de

varianza) y prueba de comparación de medias Turkey, en la cual letras mayúsculas iguales (A, B y C) confirmaron que no existe diferencia significativa entre grupos (P≥0.05)).

Efecto del ansiolítico sobre la concentración espermática.

Con respecto a la concentración espermática, el grupo "Estrés" tuvo la menor concentración espermática (63.8×10^6) comparada con los grupos "Ansiolítico" y "Control" (79.3×10^6 y 108.1875×10^6, respectivamente). Además, se observa una leve recuperación del número de espermatozoides a los animales que se les administró el ansiolítico.

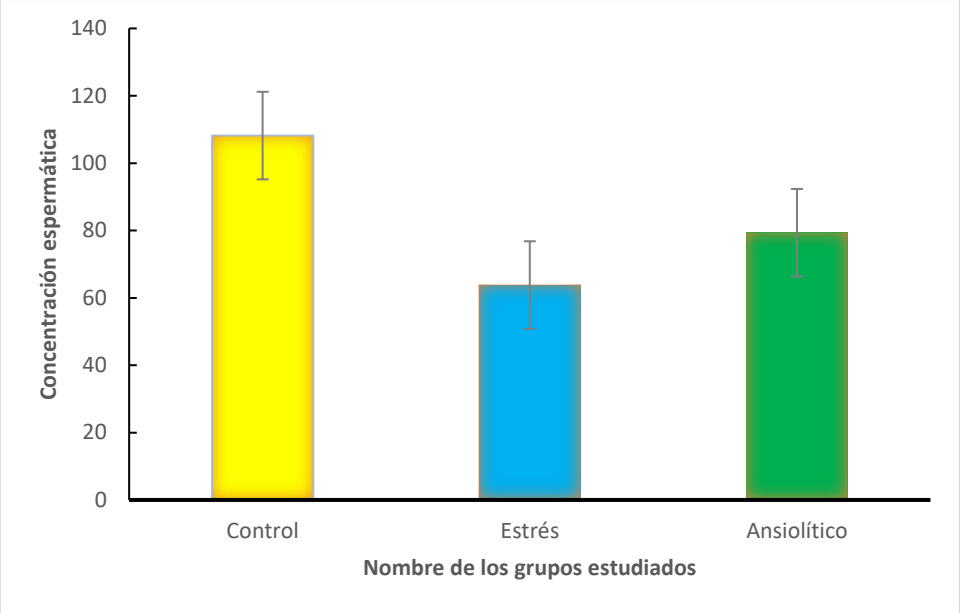


Figura 2. Promedios del número de espermatozoides en una muestra ± DS con respecto a cada uno de los grupos estudiados. Las muestras analizadas fueron diluidas en una proporción 1:20 y se contaron las células mediante una cámara de Neubauer. Posteriormente, la concentración espermática obtenida fue analizada mediante la prueba estadística de Kruskal- Wallis.

Efecto ansiolítico sobre la motilidad espermática

La evaluación de la motilidad espermática es un característica importante de la fertilidad masculina. La motilidad total es la sumatoria de los valores obtenidos de la motilidad tipo A (motilidad progresiva) y motilidad tipo B (motilidad *in situ*). En cuanto a los porcentajes de la motilidad total en las células en el testículo derecho, fue de: "Control" (65.11%), "Estrés"(46.82%) y "Ansiolítico" (51%). A su vez, la motilidad A en el grupo "Control" fue significativamente mayor (20.91%) comparado

con los otros grupos “Estrés” (0.46%) y “Ansiolítico” (1%) ($p<0.05$). Mientras que en la motilidad B, el grupo “Ansiolítico” (50%) tuvo un mayor porcentaje comparado con “Estrés” (46.36%). Sin embargo, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células inmóviles (Motilidad C) en los animales pertenecientes a los grupos “Estrés” (53.12%) y “Ansiolítico” (49%) en comparación al grupo el “Control” (34.75%).

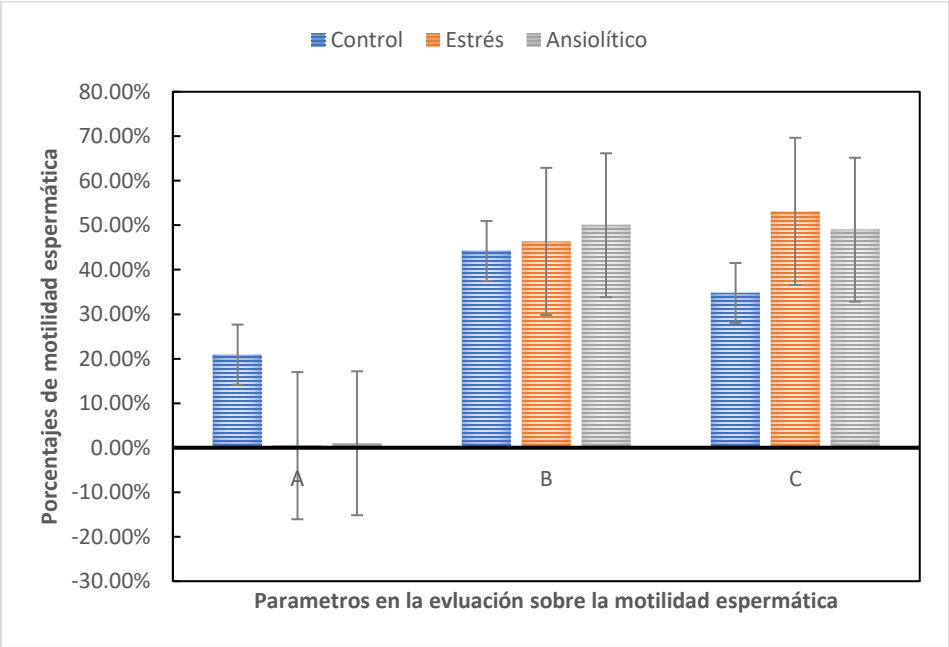


*Figura 3. Comparación de porcentajes sobre la motilidad espermática ±DS con respecto a los diferentes grupos estudiados en el testículo derecho. El segundo análisis observado en la espermatobioscopia fue la motilidad, en la cual se tomaron en cuenta tres rubros: Motilidad progresiva (MP), Motilidad Intermedia (MI) e inmóviles (INM). Los porcentajes obtenidos fueron comparados mediante la prueba de Kruskal-Wallis; **P<0.05; (A) motilidad progresiva; (B) motilidad intermedia; (C) células sin movimiento**.*

Por otro lado, se observó que la motilidad total en las células del testículo izquierdo fueron 53.34%, 38.76% y 44% para los grupos “Control”, “Estrés” y “Ansiolítico”, respectivamente. Respecto al tipo de motilidad tipo A, en el grupo “Control” (26.4%) fue significativamente mayor que los porcentajes de “Estrés” (1.08%) y “Ansiolítico” (0%). En cuanto a la Motilidad B, no se observó una gran diferencia entre los porcentajes de “Estrés” (37.66%) y “Ansiolítico” (44%), no obstante “Ansiolítico” continua siendo ligeramente mayor que “Estrés”.

El porcentaje de células inmóviles en los individuos pertenecientes al grupo “Estrés” (61.25%) fue mayor que “Ansiolítico” (56%) y “Control” (46.51%).

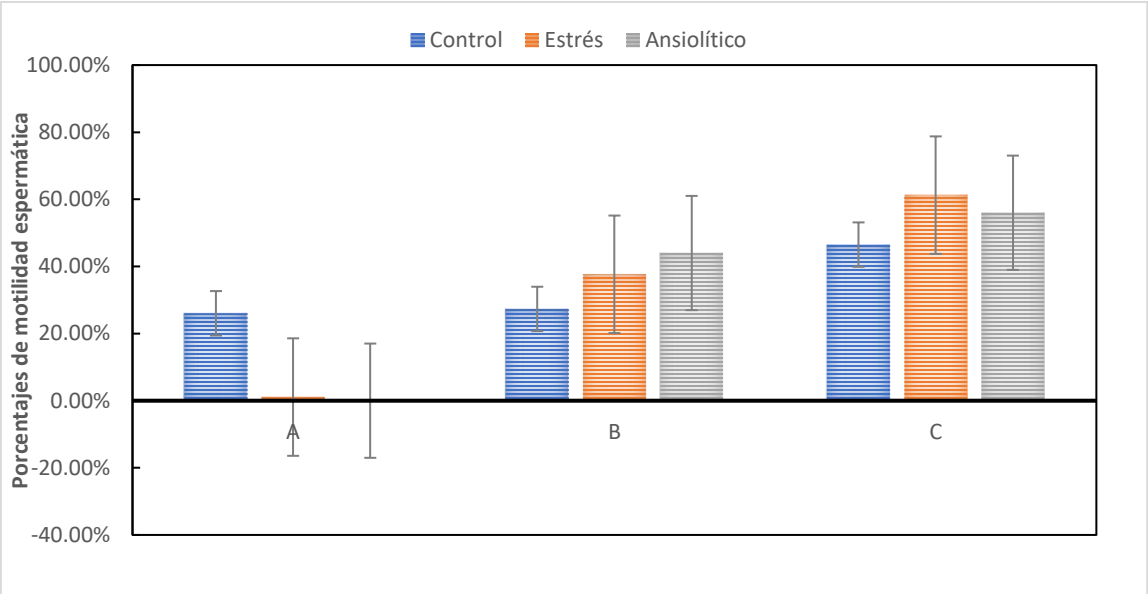


Figura 4. Comparación de porcentajes sobre la motilidad de espermática ±DS con respecto a los grupos estudiados en el testículo izquierdo. Los rubros que se tomaron en cuenta para esta observación fueron: : Motilidad progresiva (MP), Motilidad Intermedia (MI) e inmóviles (INM), posteriormente fueron comparados mediante la prueba estadística de Kruskal-Wallis; ***P<0.05; (A) motilidad progresiva; (B) motilidad intermedia; (C) células sin movimiento****.*

Efecto del ansiolítico sobre la vitalidad de los espermatozoides

Con respecto a la vitalidad espermática, en el testículo derecho, se observó que el grupo “Ansiolítico” tuvo una reducción significativa comparándolo con el grupo “Control” y “Estrés” (10% vs. 55.9%, 34.83%, respectivamente). Cabe resaltar que el tratamiento con ansiolíticos tuvo un efecto negativo sobre la vitalidad espermática.

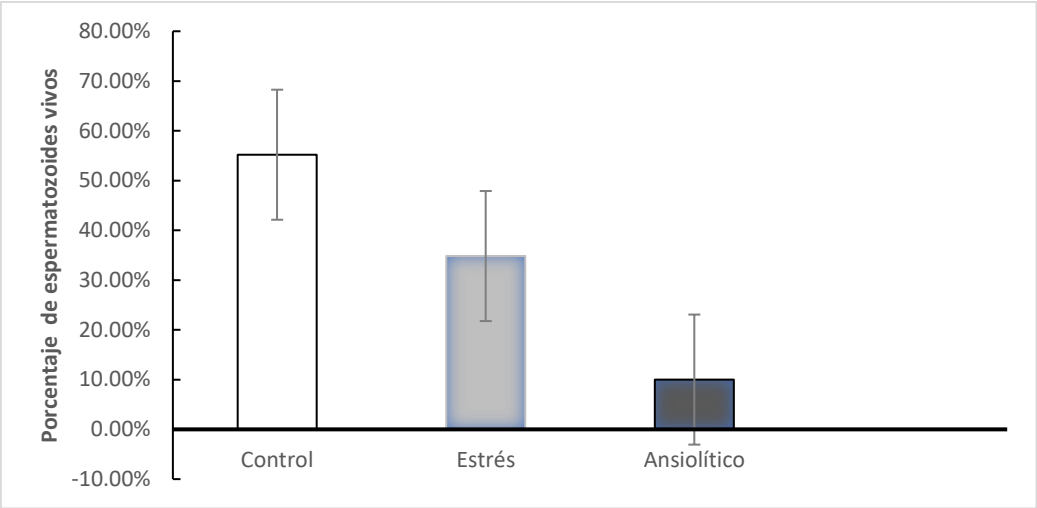


Figura 5. Porcentajes del número de células vivas ±DS con respecto al número de grupo en el testículo derecho. En esta evaluación se siguieron las instrucciones del kit Live/Dead Sperm Viability Kit (Molecular Probes), este kit tiñó a los espermatozoides, para poder ser analizados con un microscopio de epifluorescencia y se visualizó a los espermatozoides vivos de un color verde y los muertos de un color rojo. Posteriormente se calcularon los porcentajes de células y fueron comparados los datos mediante la prueba de Kruskal-Wallis (P<0.05).

En el testículo izquierdo, se observó que la vitalidad espermática del grupo "Control" (39%) fue significativamente mayor en comparación a los demás grupos ($p<0.05$). Además, al igual que en el testículo derecho, en el grupo "Estrés" tuvo mayor porcentaje de células vivas que el grupo de "Ansiolítico" (32.46% vs. 29%, respectivamente). Sin embargo, la diferencia de porcentajes entre "Estrés" y "Ansiolítico" no fue tan notoria como en el testículo derecho.

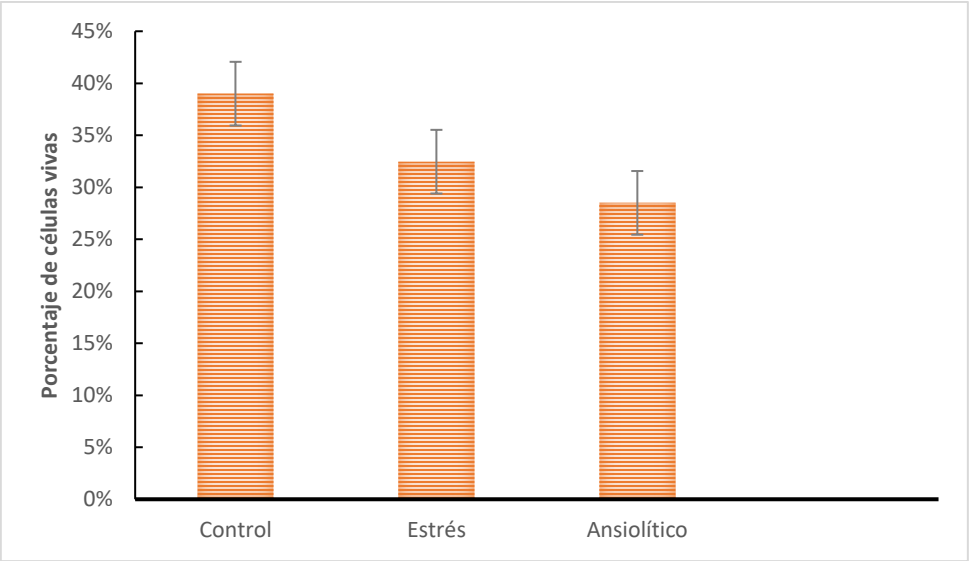


Figura 6. Porcentajes de células vivas ± DS con respecto al número de grupos estudiados en el testículo izquierdo. En esta evaluación se siguieron las mismas instrucciones que con el testículo derecho y los resultados obtenidos fueron comparados con la prueba de Kruskal-Wallis; P<0.05.

Efecto del estrés y ansiolítico sobre la integridad del ADN en los espermatozoides.

La prueba Cometa es una técnica utilizada para evaluar la fragmentación de ADN en una célula que está incluida en un gel de agarosa y que posteriormente es sometido a un campo eléctrico. El análisis de las muestras se realizó por microscopia de epifluorescencia y se observó un barrido parecido a la forma de un cometa en los espermatozoides con un ADN nuclear fragmentado, mientras que el núcleo de una célula con ADN integro se observó altamente condensado. Los resultados obtenidos de los grupos estudiados, fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba de “Kruskal-Wallis”, para determinar, si existe diferencia significativa en los porcentajes de los grupos.

En el testículo derecho de los sujetos del grupo “Estrés”, se encontró un porcentaje alto de células con fragmentación de ADN en los espermatozoides (más del 90%). Sin embargo, el porcentaje de fragmentación perteneciente al grupo “Ansiolítico” disminuyo un 20% en ambos testículos comparándolo con el grupo ”Estrés” (Figura 6).

Finalmente, como era de esperarse, el grupo “Control” mostro un bajo porcentaje (testículo derecho (42%) y testículo izquierdo (45%)) de células con fragmentación de ADN ($p<0.05$) en relación con los otros grupos.

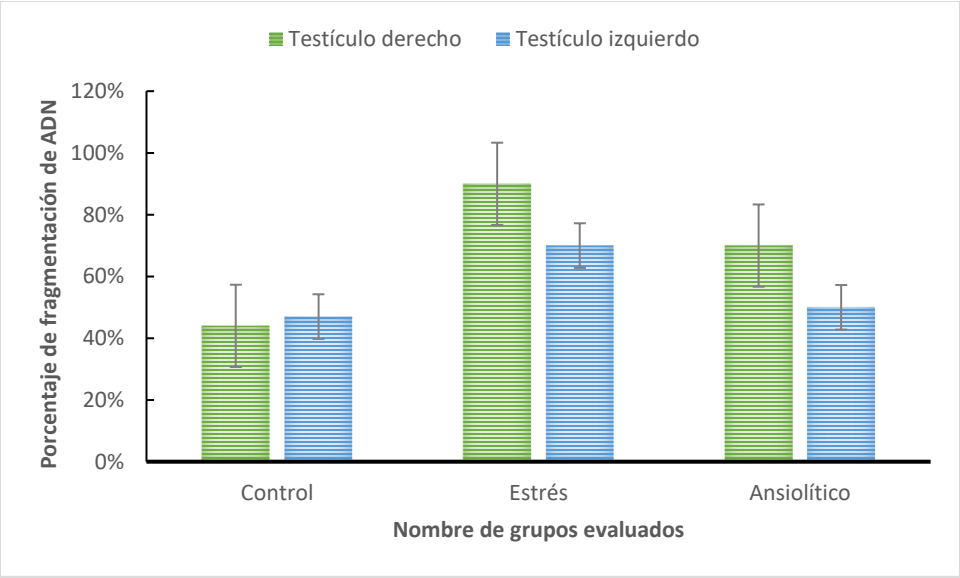


Figura 6. Porcentajes de fragmentación de ADN en los espermatozoides ±DS con respecto al número de grupos estudiados. Se realizó la prueba “Cometa”, la cual mediante la tinción de Anaranjado de Acridina permite observar mediante microscopía de fluorescencia la fragmentación de ADN en las células. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis. $p<0.05$.

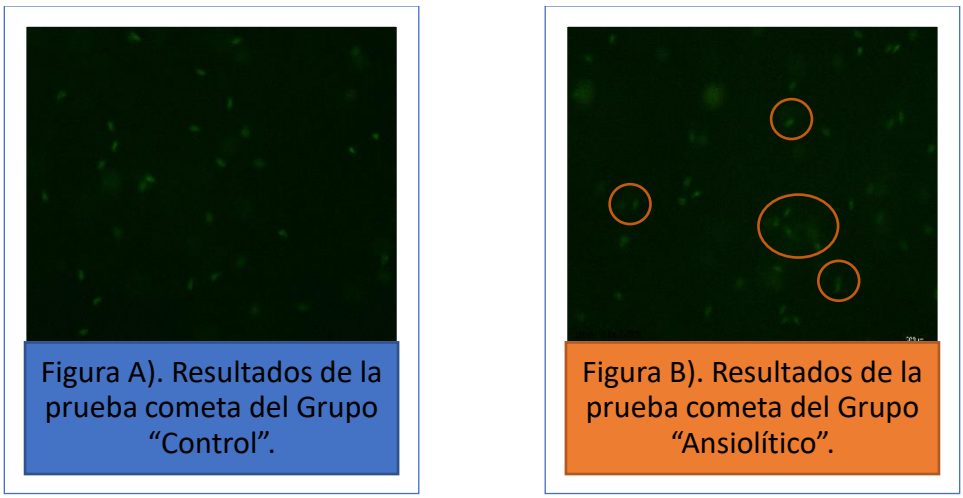


Ilustración 15. Comparación de muestras pertenecientes a los grupos “Control” (figura A) y “Ansiolítico”(figura B) analizadas con un microscopio de epifluorescencia. Cabe mencionar, en la figura B se destacan con un aro naranja los espermatozoides que fueron positivos en la prueba “Cometa”, por consiguiente, sufrieron algún tipo de daño en su ADN.

En la ilustración 15 se observa el resultado de la prueba cometa de los espermatozoides del grupo “Control” y del grupo “Ansiolítico”. Respecto al grupo

“Ansiolítico” presentó algunas células con fragmentación (señaladas con un aro naranja), sin embargo, presentó cierta similitud con el grupo “Control”.

DISCUSIÓN

(Carlsen, Giwerckman, Keiding, & Sakkabaek, 1992) fueron los pioneros en demostrar que la calidad del semen masculino es afectada negativamente por diferentes factores externos o internos. Uno de los factores externos que afecta a calidad espermática, es el estrés psicológico, él cual es considerado una complicación a nivel global y un área de estudio interesante (Durairajanayagam, 2018). Existen reportes en diferentes países que demuestran como la depresión y el estrés ocasionado por el trabajo afectan negativamente la concentración y la motilidad espermática en varones (Meden-Vtrovec, Auger, Velikonja, Kolbezen, & Meden-Vtrovec, 2008).

Inicialmente, en este trabajo se demostró el efecto del estrés y del ansiolítico en los roedores mediante la prueba de “Campo abierto”; tal como fue reportada por (Bailey & Crawley, 2009) quién la utilizó, para evaluar la actividad locomotora general y proveer un panorama inicial acerca de una conducta relacionada con ansiedad en ratones. (Saibenhener & Wooten, 2015) y (Prut & Belzung, 2003) evaluaron mediante ésta prueba conductas locomotoras por parte de roedores en estado de ansiedad y el efecto de los ansiolíticos sobre la conducta en ratones. Los resultados obtenidos en la “Prueba de Campo Abierto” en este experimento son mostrados en la figura 1, en donde se muestra que el protocolo de estrés leve crónico impredecible, aplicado durante un mes, fue el adecuado debido a un aumento notorio de cruces durante las evaluaciones conductuales por parte de los individuos pertenecientes al grupo “Estrés” y fueron incapaces de adaptarse al protocolo azaroso de pruebas de estrés. Por otro lado, los individuos del grupo “Ansiolítico”, que también fueron inducidos al protocolo de estrés durante un mes y que fueron tratados con de clonazepam (5g/kg), se observó una reducción en el número de cruces, resultados similares a los reportados por (Ellmesallamy, Abass, Ahmed-Refat, & Atta, 2011).

Diversos trabajos han sugerido que el estrés puede ser un factor de riesgo para infertilidad masculina. (Collodel, y otros, 2008) sugiere que el estrés causa infertilidad masculina mediante diferentes afectaciones como: espermatozoides amorfos, reducción sobre la motilidad y vitalidad de los espermatozoides, y perturbaciones al ADN del espermatozoide. Por otra parte, (Javenic, y otros, 2014) atribuyen que el estrés laboral afecta negativamente en la calidad espermática de varones. Al conocer éstas aseveraciones en la bibliografía, buscamos conocer si el tratamiento con ansiolítico tiene algún efecto sobre la calidad espermática. Por lo tanto, en este proyecto realizamos una espermatobioscopia y analizamos los siguientes rubros: concentración espermática y el porcentaje de motilidad y vitalidad; a su vez, evaluamos el efecto del fármaco sobre la integridad del ADN en los espermatozoides.

En la figura 2 examinamos que la concentración espermática de los sujetos pertenecientes al grupo “Estrés” tuvieron un bajo porcentaje de espermatozoides comparándolo con los otros dos grupos. Esto pudo deberse a que el ciclo celular fue interrumpido. Cabe mencionar, que existen muy pocos reportes relacionados con éste hallazgo, entre ellos, se encuentran (Peng, y otros, 2019). Ellos reportaron por primera vez el deterioro en la espermatogénesis inducido por altas concentraciones de glucocorticoides durante el estrés crónico, el cual es asociado con apoptosis y una interrupción en la fase G_0/G_1 del ciclo celular en la espermatogonia (progenitora diploide de todos los espermatozoides). En el caso del grupo “Ansiolítico”, el tratamiento con clonazepam normalizó el funcionamiento de espermatogénesis, por consiguiente, permitió una recuperación en la concentración de espermatozoides maduros. Nuestros resultados confirman lo reportado por (Srinivasan, Shariff, & Bartlett, 2013), quienes reportan que la intervención farmacológica con ansiolíticos regulan la señalización de glucocorticoides, los cuales intervienen en la detención del ciclo celular en la fase G_0/G_1 inducida por estrés en las espermatogonias (Peng, y otros, 2019).

(Agarwal, Makker, & Sharma, 2007) mencionan que casi todas las eyaculaciones sanas contienen especies reactivas de oxígeno; sin embargo el estrés psicológico

aumenta las concentraciones de estas moléculas ocasionado por diferentes factores, como: espermátidas inmaduras, procesos incompletos de apoptosis y desregulación en la producción de las hormonas FSH y LH (Ilacqua, Izzo, Emerenziani, Baldari, & Aversa, 2018). Como también, (Homa, Vassey, Pérez-Miranda, Riyait, & Ashok, 2015) atribuyen que altas concentraciones de EROs reducen el número de espermatozoides vivos causando infertilidad masculina.

Las figuras 3 y 4 muestran los resultados obtenidos en la evaluación sobre motilidad espermática. Observamos que el grupo "Estrés" tuvo un gran número de espermatozoides inmóviles o con motilidad *in situ*, esto puede deberse a lo reportado por (Baker, y otros, 2015), quiénes mencionan que las especies reactivas de oxígeno activadas por el estrés crónico, afectan directamente el funcionamiento de la mitocondria en estas células masculinas. Asimismo, (Nowicka-Bauer & Nixon, 2020) y (Tremellen, 2008) atribuyen a este impacto negativo con la reducción en la disponibilidad de ATP dentro de la mitocondria, dicha molécula regula el funcionamiento de las proteínas del axonema, y por consiguiente, se imposibilita el movimiento del espermatozoide. Por otro lado, en las mismas figuras, se aprecia una mejora en la motilidad de los espermatozoides murinos del grupo "Ansiolítico" comparándolo con los pertenecientes del grupo "Estrés". Esto puede deberse a que la fosforilación de tirosina en las proteínas espermáticas con receptores GABA-A del acrosoma mejoran su funcionamiento en un medio enriquecido con GABA, como ha sido descrito por (Kurata, Hiradate, Umezu, Hara, & Tenamura, 2019). Asimismo, estos receptores son encontrados en el cerebro y es donde se unen las benzodiacepinas, lo cual permite disminuir la actividad de las neuronas y reducir el estrés psicológico (Batlle, Lizano, Viñas, & Pujol, 2018).

En la Figuras 5 y 6 , el grupo "Estrés" tuvo un alto porcentaje de células muertas en ambos testículos. Esto puede ser atribuido a lo mencionado por (Forrester, Kikuchi, Hernandes, Xu, & Grendling, 2018), quienes reportan que una alta concentración de ERO en la circulación sanguínea de los animales desregulan el balance prooxidante/antioxidante. Este balance consiste que a cualquier incremento anormal de prooxidantes es atenuado por una respuesta antioxidante (Salim, 2014).

Sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo el balance es alterado ocasionado por una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (prooxidante), por ende, los mecanismos de defensa antioxidante son obsoletos (Agarwal & Said, 2005). Asimismo, el nivel alto de las especies reactivas de oxígeno contribuye a la infertilidad masculina, mediante la reducción de la vitalidad espermática y daño de ADN espermático (Homa, Vessey, Pérez-Miranda, Riyait, & Agarwal, 2015). Por lo que se propone un tratamiento de mayor duración antiestrés y menor dosis, de esta manera, reducir la concentración de ERO.

Por otro lado, en los ratones pertenecientes al grupo “Ansiolítico”, se encontró un alto porcentaje de células muertas. Una posible explicación a este suceso es el siguiente: se conoce que las benzodiacepinas modifican la forma tridimensional del receptor $GABA_A$ iónico potenciando el efecto de apertura de Cl^- , esta propiedad se conoce como modulación alostérica (Rosas-Gutierrez, Simón-Arceo, & Mercado, 2013). La molécula de cloro se encuentra en el semen y es esencial para el movimiento del espermatozoide, capacitación, reacción acrosomal y quimiotaxis del espermatozoide (Shan-Wen, 2017). Sugerimos que dicha modulación permitió una mayor entrada de los iones cloruro a través de los canales cloro. (Ponnaglu & Singh, 2017) reportan que una parte de estas moléculas son absorbidas por proteínas membranales, como los canales iónicos dependientes de voltaje (VDAC, por sus siglas en inglés). Asimismo, (Rajkumar-Maurya & Mahalakshmi, 2016) menciona que estos canales iónicos se encuentran dentro de la célula en la membrana externa mitocondrial y son responsables del mantenimiento de la integridad mitocondrial, regulación en la homeostasis de calcio y potasio, apoptosis, etc. (Messina, Reina, Guarina, & De Pinto, 2012) mencionan que las proteínas VDAC constan de tres isoformas provenientes de tres genes separados (VDAC1, VDAC2 y VDAC3). En particular, VDAC2 como proteína de membrana integral participa en el mantenimiento de la morfología acrosomal a través de la regulación de la homeostasis sobre las concentraciones intracelulares y extracelulares de las concentraciones de calcio y cloro (Bianjiang, Zhang, & Zengjun, 2010). Cabe mencionar, que cambios de las concentraciones de estos iones en el citoplasma y el acrosoma, pueden destruir la integridad del acrosoma mediante una reacción

acrosomal (Bianjiang, Zhang, & Zengjun, 2010). Esta reacción, sin el objetivo de completar el proceso de fecundación, causa apoptosis mediante la activación la caspasa 3 (Grunewald, Guenther, & Springsguth, 2017).

Finalmente, con respecto a la fragmentación de ADN espermático, podemos observar en la figura 6, resultados diferentes en la calidad de ADN entre los grupos “Estrés” y “Ansiolítico”. El alto porcentaje de fragmentación en el grupo “Estrés”, puede ser atribuido a 2 causas. La primera causa, como se mencionó anteriormente, es ocasionado por la desregulación del eje HHA, el cual afecta al eje HPG, eje encargado de la liberación de la hormona leutinizante (LH) (Rooney & Domar, 2018). La desregulación en la secreción de LH afecta la producción de testosterona en las células de Leydig, lo que detiene el ciclo celular en la fase G_0/G_1 de la espermatogénesis (Gao, y otros, 2003). De esta manera, induce la liberación de espermatozoides inmaduros, los cuales son los principales productores de ERO (Peng, y otros, 2019). La segunda causa se le atribuye a que las ERO oxidan la cadena de doble de ADN y se generan derivados como 8-hidroxi-2’-desoxiguanosina(8-OHdG) y 8-Oxo-2’-deoxiguanosina(8-oxodG) (De Luliis, y otros, 2005). No obstante, los espermatozoides cuentan con una enzima de reparación de escisión de base, como es la 8-oxoguanina ADN glicosilasa-1 (OGG1, por sus siglas en inglés) que permite que esta fragmentación sea reversible (Bui, Sharma, Henkel, & Agarwal, 2018). Asimismo, al verse afectado el eje HPG, se afecta la producción de la hormona folículo estimulante (FSH) que favorece la “apoptosis abortiva” (Zini & Agarwal, 2011). La cual menciona que espermatozoides incompletos con daño irreversible en su ADN son enviados a apoptosis. Estos espermatozoides apoptóticos, en condiciones normales, son fagocitados por las células de Sertoli (Wang & Han, 2019). Sin embargo, en situaciones estresantes, la concentración de células de Sertoli es afectada por la desregulación de la producción de FSH, permitiendo que se acumulen los espermatozoides con ADN dañado en los tubos seminíferos (Zini & Agarwal, 2011). Con resultados obtenidos de este proyecto, el estrés crónico afecta negativamente el ADN de los espermatozoides pertenecientes a ratones jóvenes con dos meses de edad.

Por otra parte, el grupo “ Ansiolítico” presentó una reducción en el número de células con fragmentación de ADN comparándolo con el grupo “Estrés” (Figura 6). (Whirledge, 2013) indica que, en situaciones de estrés, las neuronas paraventriculares encontradas en el hipotálamo liberan señales para la secreción de glucocorticoides mediante el eje HHA. Asimismo, (Lapp, Bartlett, & Hunter, 2019) menciona que la constante actividad del eje HHA causa un exceso de glucocorticoides, el cual induce la secreción de especies reactivas de oxígeno en el torrente sanguíneo. (Du, y otros, 2009) y (Guo, Sun, Chen, & Zhang, 2013) reportan que los glucocorticoides inducen directamente estrés oxidativo neuronal a través del incremento en la oxidación mitocondrial, aumento del potencial en la membrana, mayor capacidad en la retención de calcio, regulación a la alza de la enzima NADPH oxidasa (la cual produce las especies reactivas de oxígeno) y la inhibición del sistema de defensa antioxidante. Sin embargo, la secreción de glucocorticoides por parte del eje HHA es regulado por algunos neurotransmisores, como GABA (Melón & Maguire, 2017). Por lo tanto, creemos que la mejoría en la calidad del ADN en los espermatozoides del grupo “Ansiolítico” es debido al efecto antiestrés del fármaco, a través de la reducción de glucocorticoides secretados por el eje HHA y la reducción de concentración de especies reactivas de oxígeno en circulación (Krolow, Arcego, Noschang, Weis, & Dalmaz, 2014). Asimismo, ésta reducción permitió una menor posibilidad de que el ADN espermático sea dañado por las reacciones mencionadas anteriormente (Dutta, Majzoub, & Agarwal, 2019).

Además, comprobamos lo descrito por (Ilgin, 2020), quien reporta que el efecto ansiolítico reguló al funcionamiento del eje HPG, por ende, la secreción de hormona luteinizante se normaliza y permite una correcta espermatogénesis (Sofikitis, Giotitsas, Tsounapi, & Baitogiannis, 2008). Debido a una que espermatogénesis incompleta causa espermatozoides inmaduros dentro del semen, los cuales se caracterizan por la presencia de residuos citoplasmáticos en la zona media (Tremellen, 2008). Estos residuos contienen enzimas, como la NADPH oxidasa, la cual genera especies reactivas de oxígeno (Tremellen, 2008).

CONCLUSIONES

- Las pruebas realizadas en el modelo de inducción a estrés psicológico aplicado a los ratones (Cepa CD-1) durante 30 días fue eficaz.
- El tratamiento del ansiolítico (Clonazepam) administrado por vía oral, a una dosis de 5mg/kg al día, redujo la condición ansiolítica y de estrés.
- La administración de clonazepam mejoró la concentración espermática en los ratones bajo condición de estrés.
- La reducción de estrés, a causa de un tratamiento con benzodiacepinas, beneficia a la motilidad en los espermatozoides.
- La administración de clonazepam reduce la concentración espermática.
- La administración de clonazepam mejora la integridad del ADN espermático en los sujetos bajo condición de estrés.

PERSPECTIVAS

- Sugerimos mayores investigaciones acerca de los canales $GABA_A$ en los espermatozoides.
- Proponemos indagar, en la posible relación de ansiolíticos con los canales VDAC2 en otras células del organismo.

Bibliografía

Agarwal, A., & Said, T. (2005). Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int.*, 503-507.

Agarwal, A., Makker, K., & Sharma, R. (2007). REVIEW ARTICLE: Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2-11.

Bailey, K. R., & Crawley, J. N. (2009). Chapter 5 Anxiety-Related Behaviors in Mice. En B. JJ, *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. 2nd edition.* Boca Raton (Fl): Elselvier.

Baker, M. A., Weinberg, A., Hetherington, L., Villanueva, A. I., Velkov, T., Baell, J., & Gordon, C. P. (2015). Defining the mechanisms by which the reactive

oxygen species by-product, 4-hydroxynonenal, affects human sperm cell function. *Biology of Reproduction*, 1-20.

Baldwin, D. (2013). Benzodiazepines: Risks and benefits. A reconsideration. *Phsycopham*, 967-972.

Baldwin, D. (2013). Benzodiazepines: Risks and benefits. A reconsideration. *Journal of Psycopharmacology*, 967-971.

Batlle, E. (2018). 1,4-Benzodiazepines and New Derivatives: Description, Analysis, and Organic Synthesis. En E. Lizano, *Medical Chemistry* (págs. 61-90). Philadelphia: IntechOpen.

Besson, M. (2015). GABAergic modulation in central sensitization in humans a randomized placebo-controlled pharmacokinetic–pharmacodynamic study comparing clobazam with clonazepam in healthy volunteers. *PAIN*, 397-404.

Bianjiang, L., Zhang, W., & Zengjun, W. (2010). Voltage-dependent anion channel in mammalian spermatozoa. / *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 633-636.

Bladwin, D. (2010). Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder. *Behavior Neuroscience*, 453-467.

Bordreau, M. (2011). Chronic Stress and Performance. *Air Force Research Laboratory*, 1-27.

Briceag, L. (2015). Fallopian tubes – literature review of anatomy and etiology in female infertility. *Journal o Medicine and Life*, 129-139.

Brun, J.-P. (2013). *La prevención del estrés en el trabajo: Lista de puntos de comprobación.* Ginebra: Oficina Internacional del Trabajo.

Bui, A. D., Sharma, R., Henkel, R., & Agarwal, A. (2018). Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male fertility. *Wiley Andrologia*, 1-10.

Camargo, B. d. (2015). Estrés, síndrome General de adaptación o reacción general de alarma. *Medico Científica*, 78-88.

Carlsen, E., Giwerckman, A., Keiding, N., & Sakkabaek, N. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during pas 50 years. *Bmj*, 609-613.

Collodel, G. (2008). Effect of emotional stress on sperm quality. *The Indian Journal of Medical Research*, 254-261.

Cortes-Romero, C. (2011). GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Neurology*, 665-675.

De Luliis, G. N., Thomson, L., Mitchell, L., Finnie, J., Koppers, A., & Hedges, A. (2005). Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury. *Fertility and Sterility*, 637-642.

DeRuiter, J. (2014). GABA Receptor Ligands and the Benzodiazepines . *Principles of Drug Action 2*, 1-28.

Dimsdale, J. (2008). Psychological Stress and Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol*, 1237-1246.

Domínguez, V. (2016). Uso racional de las benzodiacepinas: hacia una mejor prescripción. *Revista uruguaya d medicina interna*, 14-24.

Drover, D. (2014). Comparative Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Short-Acting Hypnosedatives. *Clinical Pharmacokinetics*, 227-238.

DrugBank. (Mayo de 2010). *DrugBank*. Obtenido de https://www.drugbank.ca/drugs/DB01068

Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Bluementhal, R., & Falke, C. (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 3543-3548.

Duke, A. (2018). Evidence That Sedative Effects of Benzodiazepines Involve Unexpected GABAA Receptor Subtypes: Quantitative Observation Studies in Rhesus Monkeys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 145'157.

Durairajanayagam, D. (2018). Lifestyle causes of male infertility. *Arab Journal of Urology*, 10-20.

Dutta, S., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2019). Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab Journal of Urology*, 87-97.

Ellmesallamy, H. (2011). Differential effects of alprazolam and clonazepam on the immune system and blood vessels of non-stressed and stressed adult male mice. *Interdisciplinary toxicology*, 132-143.

Esch, T. (2002). Stress in cardiovascular disease. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 93-101.

Ewen, B. M. (2002). Stress, Adaptation and Disease. *Annals New York Academy of Sciences*, 33-47.

Facal, D. (2017). HERRAMIENTAS DE Herramientas de Evaluación Cognitiva y Neuropscología en Centros Gerontológicos. *Sociedad de Galega de Xerontoloxía e Xeriatría*, 5-30.

FDA. (2013). Klonopin Tablets. *FDA Approved Labeling Text October 2013*, 1-50.

Fernández, R. R. (2014). *Estrés y salud.* Jaén: Universidad de Jaén.

Findlay, J.-K. (2009). Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships. *Animal Reproduction*, 14-19.

Fink, G. (2017). Stress: Definition and history. *Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, 1-9.

Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandes, M. S., Xu, Q., & Grendling, K. K. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.*, 877-902.

Funder, J. (2005). Chapter 12 - Aldosterone and Mineralocorticoids and Mineralcorticoids. En S. Oparil, *Hypertension* (págs. 117-122). Birmingham: Elselvier Saunders.

Gao, H., Tong, M., Hu, Y., Guo, Q., Ge, R., & Hardy, M. (2003). Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Mol. Cell. Endocrinology*, 153-163.

García, J. (2013). Control del estrés. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 429-439.

Gjerstad, J. (2018). Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress*, 403-416.

Gonzalez, M. (2014). Diet and Stress. *Psychiatric Clinics of North America*, 579-589.

Griebel, G. (2014). 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, 667-687.

Griffin, C. (2013). Benzodiazepine Pharmacology and Central Nervous System–Mediated Effects. *The Ochsner Journal*, 214-223.

Grunewald, S., Guenther, F., & Springsguth, C. (2017). Induction of ultra-morphological features of apoptosis in mature and immature sperm. *Asian Journal of Andrology*, 533-537.

Guo, C., Sun, L., Chen, X., & Zhang, D. (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 2033-2014.

Hamm, L. (2013). Chapter 55 - Cellular Mechanisms of Renal Tubular Acidification. En R. Alpern, *Seldin and Giebisch's The Kidney.* Missisipi: Academic Press.

Homa, S. T., Vassey, W., Pérez-Miranda, A., Riyait, T., & Ashok, A. (2015). Reactive Oxygen Species (ROS) in human semen: determination of a reference range. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 757-764.

Homa, S. T., Vessey, W., Pérez-Miranda, A., Riyait, T., & Agarwal, A. (2015). Reactive Oxygen Species (ROS) in human semen: determination of a reference range. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 757-764.

Ilacqua, A., Izzo, G., Emerenziani, G. P., Baldari, C., & Aversa, A. (2018). Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1-11.

Ilgin, S. (2020). The adverse effects of psychotropic drugs as an endocrine disrupting chemicals on the hypothalamic-pituitary regulation in male. *Life Sciences*.

Jacobson, B. (2015). Physical and Psychological Stress and Sleep Efficiency before and after Introducing a New Sleep Surface. *Journal of Sleep Disorders & Therapy*, 1-5.

Javenic, T., Kahn, L. G., Landsbergis , P., Cirillo, P. M., Cohn, B. A., Xinhua, L., & Factor-Litvak, P. (2014). Effects of work and life stress on semen quality. *MENTAL HEALTH, SEXUALITY, AND ETHICS*, 530-540.

Juruena, M.-F. (2004). The Hypothalamic Pituitary Adrenal axis, Glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Bras Psichiatry*, 189-201.

Kelly, M. (2010). Role of the histidine residue at position 105 in the human alpha 5 containing GABA(A) receptor on the affinity and efficacy of benzodiazepine site ligands. *Journal Pharmacology*, 248-256.

Krolow, R., Arcego, D. M., Noschang, C., Weis, S. N., & Dalmaz, C. (2014). Oxidative Imbalance and Anxiety Disorders. *Current Neuropharmacology*, 193-204.

Kurata, S., Hiradate, Y., Umezu, K., Hara, K., & Tenamura, K. (2019). Capacitation of mouse sperm is modulated by gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration. *Journal of Reproduction and Development*, 327-334.

Lapp, H. E., Bartlett, A. A., & Hunter, R. G. (2019). Stress and glucocorticoid receptor regulation of mitochondrial gene expression. *Journal of molecular Endocrinology*, 121-130.

Latina), L. p. (25 de Abril de 2018). *BBC Mundo*. Obtenido de https://www.bbc.com/mundo/institucional-43872427

Lavitini, M. (2002). *El estrés: un abordaje múltiple.* Buenos Aires: Policial.

Litz, B. (2017). Acute stress disorder. En E. Wenzel, *The SAGE encyclopedia of abnormal and clinical psychology* (págs. 23-30). Massachusets: Thousands Oaks.

López-López, A. L. (2016). *El estrés crónico leve impredecible altera el sistema de regulación neuroendocrina del apetito-saciedad, y produce estrés oxidante e inflamación sistémica en rata.* Distrito Federal: Universidad Autonóma de México.

López-Muñoz, F. (2011). The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: Half a century of anxiolytic drugs. *. Journal of Anxiety Disorders*, 554-562.

Mariotti, A. (2015). The effects of chronic stress on health: new insights into the molecular mechanisms of brain-body communication. *Future Science*, 33-41.

Martínez, I. (2016). Alteración de la actividad inflamatoria regulada por TH1-TH2 en asma. *Mediagraphic*, 136-142.

Martínez-Arroyo, J.-L. (2014). Prevalencia de la polifarmacia y la prescripción de medicamentos inapropiados en el adulto mayor hospitalizado por enfermedades cardiovasculares. *Gaceta Médica de México*, 29-38.

McEwen, M. (2004). Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Nature*, 1-7.

Meden-Vtrovec, B., Auger, J., Velikonja, V., Kolbezen, M., & Meden-Vtrovec, H. (2008). Psychological factors in male partners of infertile couples: relationship with semen quality and early miscarriage. *International Journal of Andrology*, 557-564.

Melmed, S. (2011). *Textbook of Endocrinology. 12° ed.* Oxford: Elselvier.

Melón, L. C., & Maguire, J. (2017). GABAergic regulation of the HPA and HPG axes and the impact of stress on reproductive function. *J Stereoid Biochm Molecular Biology*, 196-203.

Mendieta-Rada, A. (Mayo de 2018). Obtenido de http://innotechsi.com/wp-content/uploads/2018/05/TEMA-13-ALEJANDRA-MENDIETA-.pdf

Messina, A., Reina, S., Guarina, F., & De Pinto, V. (2012). VDAC isoforms in mammals. *Biochim Biophys Acta.*, 1466-1476.

Mitra, A. (2008). Diabetes and Stress: A Review. *Studies on Ethno-Medicine*, 131-135.

Mogilski, J. (2019). Stress hormones, physiology, and behavior. *The Oxford Handbook of Evolutionary Psychology and Behavioral Endocrinology*, 1-32.

Monroe. (2009). Psychological Stressors, overview. *Elselvier*, 287-293.

Najam, R. (2011). Comparative study on the effect of zopiclone and flurazepam. *Journal of Chemistry*, 60-72.

Navarro-López, C. (2018). Tema 30: Gematogénesis I: Espermatogénesis. *Mural*, 1-11.

Nelson, J. (2009). Guidelines for the clinical use of benzodiazepines: Pharmacokinetics, dependency, rebound and withdrawal. Canadian Society for Clinical Pharmacology. *The Canadian journal of clinical pharmacology = Journal canadien de pharmacologie clinique* , 700-722.

Nora, B. (2014). Hormonas de la corteza adrenal. En F. d. Medicina, *Catedra de bioquímica* (págs. 2-22). Madrid: UNNE.

Nothdurfter, C. (2012). Recent developments in potential anxiolytic agents targeting GABAA/BzR complex or the translocator protein (18kDa) (TSPO). *Journal of top Medicine*, 360-370.

Novera, M. (2019). *Identificación de interacciones medicamentosas potenciales en recetas médicas atendidas en la farmacia ambulatoria del hospital Carlos Lanfranco la Hoz, periodo septiembre - noviembre 2018.* Lima: Universidad Norbert Wiener.

Nowicka-Bauer, K., & Nixon, B. (2020). Molecular Changes Induced by Oxidative Stress that Impair Human Sperm Motility. *Antioxidants*, 1-22.

Ospina-Stepanian, A. (2016). *Síntomas, niveles de éstres y estrategias de afrontamiento en una muestra de estudiantes masculinos y femeninos.* Bogotá: Universidad Católica de Bogotá.

Parada-Puig, R. (s.f.). *lifeder.com*. Obtenido de https://www.lifeder.com/acrosoma/

Peng, Z. (2019). Mechanisms of Stress-Induced Spermatogenesis Impairment in male Rats Following Unpredictable Chronic Mild Stress (uCMS). *International Journal of Molecular Sciences*, 1-17.

Ponnaglu, D., & Singh, H. (2017). Anion Channels of Mitochondria. *Handbook of Experiments of Pharmacology*, 71-101.

Pozos-Radillo, E. (2017). Chronic Stress and Its Association with Psychological, Behavioral and Physiological Variables of Mexican College Students. *Advances in Applied Sociology*, 299-305.

Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 3-33.

Pruti, S. (29 de Junio de 2019). *Control del éstres*. Obtenido de Mayo Clinic: https://www.mayoclinic.org/es-es/healthy-lifestyle/stress-management/in-depth/stress-relievers/art-20047257

Rahman, M. (2012). Comparative Dissolution Study of Four Different Brands of Clonazepam Tablets (Clonium, Disopan, Rivotril, Epiclone) With Epitra. *East West University*, 12-33.

Rajkumar-Maurya, S., & Mahalakshmi, R. (2016). VDAC-2: Mitochondrial outer membrane regulator masquerading as a channel? *Europe PMC Funders Group*, 1831-1836.

Ramamoorthy, S. (2015). Corticosteroids-Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am*, 15-31.

Ramírez-Gonzalez, J.-A. (2012). Overview of the Female Reproductive System. En A.-C. Hockney, *Hormonal Changes Associated with Physical Activity and Exercise Training* (págs. 19-46). North California: Springer.

Rosas-Gutierrez, I. (2013). Mecanismo celular y molecular de la adicción a benzodiacepinas. *Salud Mental*, 325-329.

Rosas-Gutiérrez, I. (2013). Mecanismo celular y molecular de la adicción a benzodiacepinas. *Salud Mental*, 325-330.

Saibenhener, M. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 1-6.

Saki, G. (2009). Effect of forced swimming stress on count, motility and fertilization capacity of the sperm in adult rats. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 72-75.

Salazar, M. (2011). Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas. *Revista Iberoamericana de la fertilidad*, 213-225.

Salim, S. (2014). Oxidative Stress and Psychological Disorders. *Current Neuropharmacology*, 140-147.

Sandín, B. (2003). El estrés: un análisis basado en el papel de los factores sociales. *International Journal of Clinical and Health Psychology*, 141-157.

Schneiderman, N. (2005). Stress and Health: Psychological, Behavioral, and Biological Determinants. *Annual Review of Clinical Psychology*, 607-628.

Segestorm, S.-C. (2004). Psychological Stress and the Human Immune System: A Meta-Analytic Study of 30 Years of Inquiry. *Psychol Bull.*, 204-231.

Sengupta, P. (2013). Male reproductive health and yoga. *International Journal of Yoga*, 87-95.

Shan-Wen, L. (2017). Chloride channels are involved in sperm motility and are downregulated in spermatozoa from patients with asthenozoospermia. *Asian Journal of Andrology*, 418-424.

Sherwood-Brown, E. (2009). Effects of Glucocorticoids on Mood, Memory, and the Hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 41-55.

Sirtokin, A. (2011). *Regulators of overian functions.* New York: Nova Science Publishers, Inc.

Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P., & Baitogiannis, D. (2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 323-330.

Srinivasan, S., Shariff, M., & Bartlett, S. E. (2013). The role of the glucocorticoids in developing resilience to stress and addiction. *Psychiatry*, 1-11.

Stavroula, L. (2004). *La organización del trabajo y el éstres.* Francia: Organización Mundial de la Salud.

Stephens, M.-A. (2018). Stress and the HPA AxisRole of Glucocorticoids in Alcohol Dependence. *Alcohol Research: Current Reviews*, 468-483.

Stroud, C. B. (2008). The Relationship Between Stress and Depression in First Onsets Versus Recurrences: A Meta-Analytic Review. *Journal of Abnormal Psychology*, 206-213.

Tamashiro, K. (2011). Chronic stress, metabolism, and metabolic syndrome. *Stress (Amsterdam Netherlands)*, 468-474.

Thielen, K. (2010). Job stress and the use of antidepressant medicine: A 3.5-year follow-up study among Danish employees. *Occupational and environmental medicine*, 205-210.

Tremellen, K. (2008). Oxidative Stress and Male Infertility: A Clinical Perspective. *Human Reproduction Update*, 243-258.

Trucco, M. (2002). Stress and mental disorders: neurobiological and psychosocial aspects. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 8-19.

UNAM. (2010). *Libro Neurofisiología.* DIstrito Federal: UNAM.

Verga-Valero, C.-Z. (2013). Estrategias de afrontamiento, estrés y alteración psicológica en niños. *Alternativas de psicología*, 92-108.

Wagner, B. (2008). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Sedatives and Analgesics in the Treatment of Agitated Critically Ill Patients. *Clinical Pharmacokinetics* , 426-453.

Walley, A. (Mayo de 2012). *Benzodiazepines.* Obtenido de https://www.bumc.bu.edu/care/files/2012/07/13-WALLEY-BENZOS.pdf

Wang, F., & Han, D. (2019). Sertoli Cell Phagocytosis: An Essential Event for Spermatogenesis. En W. Wu, *Male Reproductive Health* (págs. 1-17). Peking: IntechOpen.

Weiser, E. (2016). Stress, Lifestyle and Health. En E. Weiser, *Psychology* (págs. 210-222). Oxford: Open Stax College.

Whirledge, S. (2013). Glucocorticoids, stress, and fertility. . *Minerva endocrinológica*, 109-125.

Wick, J. (2013). The history of benzodiazepines. *The Consultant Pharmacist*, 538-548.

Yaribeygi, H. (2017). The impact of stress on body function: A review. *Excli Journal*, 1057-1072.

Yates, E. (1987). *Self-Organizing systems. The emergence of order.* New York: Plenum Press.

Zini, A. (2011). *Sperm Chromatin.* New York: Springer.

Abreviaturas

8-OHdG: 8-hidroxilación de la guanina

8-oxodG: 8-Oxo-2'-deoxiguanosina

ACTH: La hormona adrenocorticótropa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ANOVA: Análisis de Varianza
ATP: Adenosín Trifosfato

AVP: Arginina Vasopresina

BZD: Benzodiacepinas

CBG: Transcortina

CIBIOR: Centro de Investigación Biomédica de Oriente

Cl^-: Ion Cloruro

CRF: Factor liberador de Corticotropina

CRH: Hormona liberadora de Corticotropina

DOC: 11-desoxicorticoesterona

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

FDA: Food and Drug Administration

FSH: Hormona Foliculoestimulante

GABA: Ácido γ-aminobutírico

GABA-A: Receptor A de Ácido γ-aminobutírico

GR: Glucocorticoides

HPG: Eje Hipotálamo-Hipofisiario-Gonadal

HHA: Eje Hipotalámico-Hipofisiario-Adrenal

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

LH: Hormona Luteinizante

MAR: Regiones unidas a la matriz

MR: Mineralcorticoides

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NPV: Núcleo Paraventricular

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

OGG1: 8-oxoguanina ADN glicosilasa-1

TAE: Tris-Acetato-EDTA

VDAC: Canales iónicos dependientes de voltaje