



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**MARCADORES APOPTÓTICOS EN ESPERMATOZOIDES
EPIDIDIMÁRIOS DE RATA Y SU RELACIÓN CON EL
ENVEJECIMIENTO**

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

Biol. Exp. Blanca Patricia López Trinidad

Comité tutorial:

Directora: Dra. Edith Arenas Ríos

Asesora interna: Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Asesor externo: Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez

Noviembre, 2017

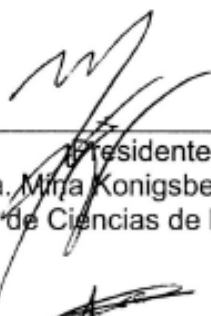
“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 71856

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Marcadores apoptóticos en espermatozoides epididimarios de rata y su relación con el envejecimiento ", que presentó

Blanca Patricia López Trinidad

El día 21 de Noviembre del año 2017



Presidente (a)
Dra. Mirja Konigsberg Fainstein
Depto. de Ciencias de la Salud; UAM-I



Secretario
Dr. Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez
Depto. de Producción Agrícola y Animal; UAM-X



Vocal
Dra. Rosa María Viguera Villaseñor
Instituto Nacional de Pediatría



Vocal
Dr. José Luis Tlachi López
Depto. de Ciencias de la Salud; UAM-I



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00179

Matricula: 2153803888

MARCADORES APOPTÓTICOS EN
ESPERMATOZOIDES
EPIDIDIMARIOS DE RATA Y SU
RELACIÓN CON EL
ENVEJECIMIENTO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 21 del mes de noviembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR
DR. JOSE LUIS TLACHI LOPEZ
DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ



BLANCA PATRICIA LOPEZ TRINIDAD
ALUMNO

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

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: BLANCA PATRICIA LOPEZ TRINIDAD

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

Aprobar

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

Margarita E. Gallegos
DRA. MARGARITA ELIZABETH GALLEGOS
MARTINEZ

PRESIDENTA

Mina Konigsberg Fainstein
DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL

Rosa Maria Vigueras Villaseñor
DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR

VOCAL

Jose Luis Tlachi Lopez
DR. JOSE LUIS TLACHI LOPEZ

SECRETARIO

Alejandro Avalos Rodriguez
DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ

Miembros del comité tutorial

Directora

Dra. Edith Arenas Ríos
Depto. Biología de la Reproducción; UAM-I.
Editharenas2000@yahoo.com.mx

Asesor interno

Dra. Mina Konigsberg Fainstein
Depto. de Ciencias de la Salud; UAM-I
mkf@xanum.uam.mx

Asesor externo

Dr. Alejyro Ávalos Rodríguez
Depto. de Producción Agrícola y Animal; UAM-X
avalosr@correo.xoc.uam.mx

Dedicatorias

Dedico este trabajo a Madre **Ma. de los Ángeles**, porque aún en la distancia me han apoyado en todo y ha sabido respetar mis decisiones. Por todo ese aprendizaje, que aún sin saberlo me ha dado. Por todos esos consejos y por ser esa mujer fuerte y luchona, mi ejemplo a seguir.

A mis hermana **Daniela** porque cuando llegaste a este mundo fuiste la alegría más grande que he podido sentir. Porque quiero ser el mejor ejemplo posible para ti y que el día de mañana tú me puedas dedicar una tesis como lo hago yo ahora. Por ser una persona muy fuerte y cargar con cosas muy duras para alguien de tu edad.

A mi hermana **Jessica**, por ser una mujer muy trabajadora, que no se rinde fácil, por hacer todo lo posible para lograr sus metas aún sin tener ayuda. Porque tengo la esperanza de que lleguemos a ser tan unida como antes.

A mi compañero **Alejandro**, por todo el apoyo en todo momento que me ha dado, por compartir este proceso del posgrado juntos, ya que sin él la maestría hubiera sido muy difícil. Por todas esas noches de desvelo, por todas las sonrisas y aventuras, por todo el aprendizaje que hemos cultivado juntos, por amarme tanto.

A la **familia Aguirre Guillen**, que estuvieron apoyandome en los momentos más difíciles de mi enfermedad, por cuidarme como un integrante más de su familia.

A mis **compañeros de la maestría**, en especial a Carlos y Norma por estar siempre al pendiente de mí y ser mis amigos incondicionales.

A **Ahiezer** por ser mi maestro y mi amigo, porque detrás de cada discusión hay una charla que me deja llena de conocimiento.

A **Ernesto** por cada uno de esos momentos que pasamos, por tus consejos y por dejarme ver al verdadero Ernesto.

A **Lorena** porque sin ti la estancia en el laboratorio hubiera sido muy aburrida.

A **Fabiola** por confiarme gran parte de tu vida y por apoyarme cuando más lo necesite. Porque por ti puedo presumir que conozco el valor de la amistad y de qué manera se demuestra.

A mis compañeros de laboratorio **Edwin, Jessica, Jesús, Víctor y Luis** por los buenos momentos y porque ahora pertenecen a esta familia llamada laboratorio.

A la **Dra. Edith** porque a pesar de que no congeniamos en algunas ideas, en muchas otras si y logramos este proyecto. Por siempre darme la libertad de desarrollar mis ideas y apoyarme en todo. Por ser una gran amiga con la que puedo contar siempre.

Agradecimientos

A la Dra. Edith por aceptar mi proyecto y apoyarme aún con todas las ocupaciones que conlleva su cargo.

A la Dra. Mina Konigsberg por haber aceptado un proyecto de reproducción y apoyarme más de lo que era su responsabilidad.

Al Dr. Alejandro Ávalos por brindarme todo su apoyo durante la realización de ésta tesis.

A la Dra. Edith Cortés por comunicarnos su conocimiento y apoyarnos durante esas largas horas en el citometro de flujo.

Al Dr. Genaro Patiño por compartir su conocimiento y servicio en el microscopio confocal.

A la Dra. Rosa María Viguera por su participación activa en la formación de esta tesis.

Al Dr. Jose Luis Tlachi por favorecer a la mejoría de la escritura de este trabajo.

Resumen

El envejecimiento es un proceso degenerativo que culmina con la muerte y está asociado a patologías como la diabetes, obesidad, desórdenes mentales y desórdenes reproductivos. Esta última se ve reflejada con una disminución de la testosterona sérica que provoca mal funcionamiento en órganos dependientes de testosterona como lo es el epidídimo. El epidídimo es el encargado de la maduración espermática, por consiguiente, cuando disminuye la testosterona, los espermatozoides mala calidad espermática y presencia de marcadores apoptóticos en el eyaculado. En este contexto, la apoptosis es un tipo de muerte que se lleva de manera ordenada sin provocar inflamación, no obstante se desconoce el momento de aparición cuando los espermatozoides atraviesan el epidídimo. De conocer estas alteraciones que pueden estar asociadas al envejecimiento, se podrá utilizar esta información para la conservación de animales en peligro de extinción que han envejecido. Por lo cual, el objetivo del presente estudio fue analizar la existencia de marcadores apoptóticos en espermatozoides epididimarios y cómo es que se modificaban con el envejecimiento.

Se demostró que la testosterona disminuye con el envejecimiento. Sin embargo, en las tres regiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) muestran variaciones en los marcadores apoptóticos en cada grupo de edad. El porcentaje de espermatozoides vivos disminuye de *caput* a *cauda*. Sin embargo, en la región caudal, la viabilidad de los espermatozoides de las ratas de 12 meses es mayor con respecto a las de 3 meses pero igual a las de 18 meses. El porcentaje de externalización de PS total analizado con el citómetro de flujo, disminuye en los espermatozoides de *cauda* de las ratas de

18 meses. No obstante el marcaje en la región acrosomal de los espermatozoides de la *cauda* de las de 18 meses aumenta. Los espermatozoides que presentan la marca para ser fagocitados, aumentan de *caput* a *cauda*. No obstante, en la región caudal, la marca disminuye en las ratas de 18 meses con respecto a las de 12 meses. De igual manera las caspasas activas en los espermatozoides aumentan de *caput* a *cauda*. Por otro lado, los espermatozoides con daño en el DNA disminuyen hacia la *cauda* del epidídimo.

Todas las evidencias indican que los marcadores apoptóticos no aumentan con el envejecimiento, sin embargo, cabe destacar que la alta cantidad de caspasas pudiera participar en otra función diferente a la apoptosis.

Abstract

The epididymis, a testosterone-dependent organ responsible for sperm maturation, has been shown to be damaged as an organism is aging due to a decrease in testosterone serum levels, leading to an impact on sperm quality. In this context, it is not clear if sperm undergo apoptosis (a type of programmed cell death) during this process since studies have reported presence of apoptotic markers in ejaculated sperm of aged animals disregarding the time at which they appeared in the epididymis. Clarifying this unknown will provide useful information for conserving endangered aged animals when reproductive methods are applied. The aim of this research project was to determine if exist somatic cell apoptotic markers in rat sperm from epididymis during aging.

It was demonstrated that there was a decrease of testosterone serum levels in aged animals however, sperm coming from the caput, corpus and cauda regions of epididymis shown variations in somatic cell apoptotic markers between each aged-group. In general, the sperm survival rate declined from caput to cauda but the latest region exhibited the same sperm viability in the twelve-month-old group as the eighteen-month-old group but better than three-month-old group. Flow cytometry analysis demonstrated that Phosphatidylserine (PS) externalization decreased on the plasma membrane of sperm cells from cauda in the eighteen-month-old group. In addition, frequency of cells showing PS externalization on the membrane of acrosomal region was found to be higher in the last group.

Spermatozoa containing external PS to be eliminated by phagocytosis enhance their numbers from caput to cauda. Importantly, marked spermatozoa from cauda epididymis for destruction are reduced in the eighteen-month-old group compare with those of twelve-month-old group. Related to active caspases, they demonstrated to be enhanced in sperm along the epididymis. On the other hand, level of sperm nuclear DNA damage shown a decrease as sperm go localized to the cauda epididymis.

Taking together, evidence suggest that apoptotic markers are not increased during aging however, high level of caspase-activity detected could be involved in different activities other than apoptosis.

Índice

1. Introducción - - - - -	1
1.1 Especies en peligro de extinción y conservación - - - - -	1
1.2 Envejecimiento y sus complicaciones reproductivas- - - - -	2
1.3 El espermatozoide - - - - -	3
1.4 El epidídimo - - - - -	5
1.5 Participación del epidídimo en la maduración espermática - - - - -	7
1.6 Apoptosis - - - - -	8
2. Antecedentes - - - - -	11
2.1 Alteraciones asociadas con la disminución de la testosterona durante el envejecimiento - - - - -	11
2.2 El epidídimo en el envejecimiento - - - - -	12
2.3 Alteraciones espermáticas debido al envejecimiento - - - - -	13
3. Justificación - - - - -	13
4. Pregunta de investigación - - - - -	14
5. Hipótesis - - - - -	14
6. Objetivo general - - - - -	14
7. Objetivos particulares - - - - -	15
8. Material y métodos - - - - -	15
8.1 Animales y grupos de estudio - - - - -	15
8.2 Obtención de suero sanguíneo - - - - -	16
8.3 Determinación de testosterona - - - - -	16

8.4 Obtención de espermatozoides - - - - -	17
8.5 Evaluación de la viabilidad espermática - - - - -	17
8.6 Tinción con Anexina V - - - - -	17
8.7 Detección de caspasas 3 y 7 - - - - -	18
8.9 Prueba de naranja de acridina - - - - -	19
8.10 Detección del potencial transmembranal de la membrana interna mitocondrial - - - - -	20
9. Pruebas estadísticas - - - - -	20
10. Resultados y discusión - - - - -	20
11. Conclusión - - - - -	38
12. Perspectivas - - - - -	38
13. Bibliografía - - - - -	39

1. Introducción

El envejecimiento es un proceso asociado a enfermedades crónico degenerativas. Una de ellas es la alteración en la función reproductiva a través de la modificación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. El principal indicativo encontrado de esta disfuncionalidad es la disminución de la testosterona, que no solo afecta al testículo y por lo tanto la calidad espermática; sino también, por su dependencia con los andrógenos, también afecta al epidídimo; órgano encargado de conferirle a los espermatozoides su capacidad fertilizante. Por tal motivo, el estudio de las alteraciones de los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo resulta un tema central en el estudio del envejecimiento ya que, muchos animales que se catalogan en peligro de extinción que se encuentran en reservas o zoológicos están en estado geriátrico.

1.1 Especies en peligro de extinción y conservación

Actualmente la lista de animales en peligro de extinción ha ido en aumento. En particular para el caso de las especies terrestres y voladores de nuestro país, se proyecta que en el año 2050, se reduzcan a cerca de la mitad (Conde, 2007). En este contexto, los zoológicos cumplen una importante labor al resguardar algunos de estos especímenes para reproducirlos aplicando, en muchas ocasiones, técnicas de reproducción asistida; como por ejemplo, el uso de espermatozoides provenientes de epidídimo, con el fin de continuar con su linaje. Sin embargo, cuando estos ejemplares envejecen, la posibilidad de conservar las especies se vuelve más complicada. En el caso de la CDMX, la secretaria de medio ambiente informó que de los dos mil

doscientos cuarenta y tres animales que hay en los tres zoológicos de la capital, 127 animales están en estado geriátrico, lo que representa 5.6% de la población total de ejemplares (Domínguez, 2016). Por lo que estudiar la fisiología reproductiva durante el envejecimiento se vuelve relevante.

1.2 Envejecimiento y sus complicaciones reproductivas.

El envejecimiento es un proceso degenerativo de las funciones fisiológicas que culmina en la muerte. Este deterioro es el principal factor de riesgo para diversas patologías. En animales en cautiverio las más comunes son el deterioro esquelético, la pérdida muscular, la obesidad, el deterioro mental y los desórdenes reproductivos (Cran y Jones, 1980; Kitchener y McDonald, 2004; López-Otín, Blasco, Partridge, Serrano, y Kroemer, 2013; Zitzmann, 2013). El mayor desorden reproductivo en los machos durante el envejecimiento es la disminución de la testosterona, que es producto de alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

Los bajos niveles de testosterona observados en los machos envejecidos pueden ser causados por disfunción testicular primaria asociada a una disminución de la intensidad y la amplitud de los pulsos de la hormona GnRH, que a su vez provoca una disminución de la producción de las hormonas LH y FSH, provocando que no lleguen en concentraciones adecuadas al testículo. Lo anterior repercute en que las células de Sertoli y de Leydig no lleven de manera adecuada la espermatogénesis. Durante el envejecimiento también se ha observado una disminución en el número de células de Leydig, lo cual contribuye a que la testosterona siga disminuyendo (Taylor et al., 1996,

Wang et al., 1999, Hermann et al., 2000, Vermeulen, 2000, Rajfer, 2003, Stanworth y Jones, 2008, Nelson et al., 2011). Estas alteraciones provocan cambios morfológicos en los órganos reproductivos dependientes de testosterona como lo es el epidídimo (Robaire, 2002, Zitzmann, 2013), y que a su vez se ve reflejado en la calidad espermática (Syntin y Robaire, 2001, Singh et al., 2003, Robaire y Hinton, 2012, Lucio et al., 2013)

1.3 El espermatozoide

El gameto masculino o espermatozoide es el producto final del proceso de la espermatogénesis, que se desarrolla a través de sucesivas fases mitóticas, meióticas y postmeióticas dentro de los túbulos seminíferos del testículo. Sin ésta célula, el ovocito por sí solo no podría formar el cigoto que daría lugar a un nuevo individuo. Los dos componentes principales del espermatozoide son la cabeza y el flagelo. La cabeza contiene el núcleo, el acrosoma, las estructuras del citoesqueleto y una pequeña cantidad de citoplasma. El núcleo contiene cromatina altamente compactada y se encuentra bajo el acrosoma, el cual contiene enzimas hidrolíticas. El flagelo, que está dividido en pieza media, pieza principal y pieza final, está constituido por un complejo central de microtúbulos que conforman el axonema, que le ayuda a la movilidad (figura 1) (Eddy, 2006). En la pieza media se encuentra la vaina mitocondrial, los espermatozoides de mamíferos contienen alrededor de 22 a 75 mitocondrias ubicadas de manera helicoidal alrededor del axonema, se ha visto que las mitocondrias tienen una función principal en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), que son necesarias para la maduración y capacitación (es el conjunto de cambios

fisiológicos y bioquímicos que necesita el espermatozoide para preparar al espermatozoide para que realice la reacción acrosomal y finalmente fertilizar al ovocito) (Eddy, 2006, Ramalho-Santos et al., 2009, Amaral et al., 2013).

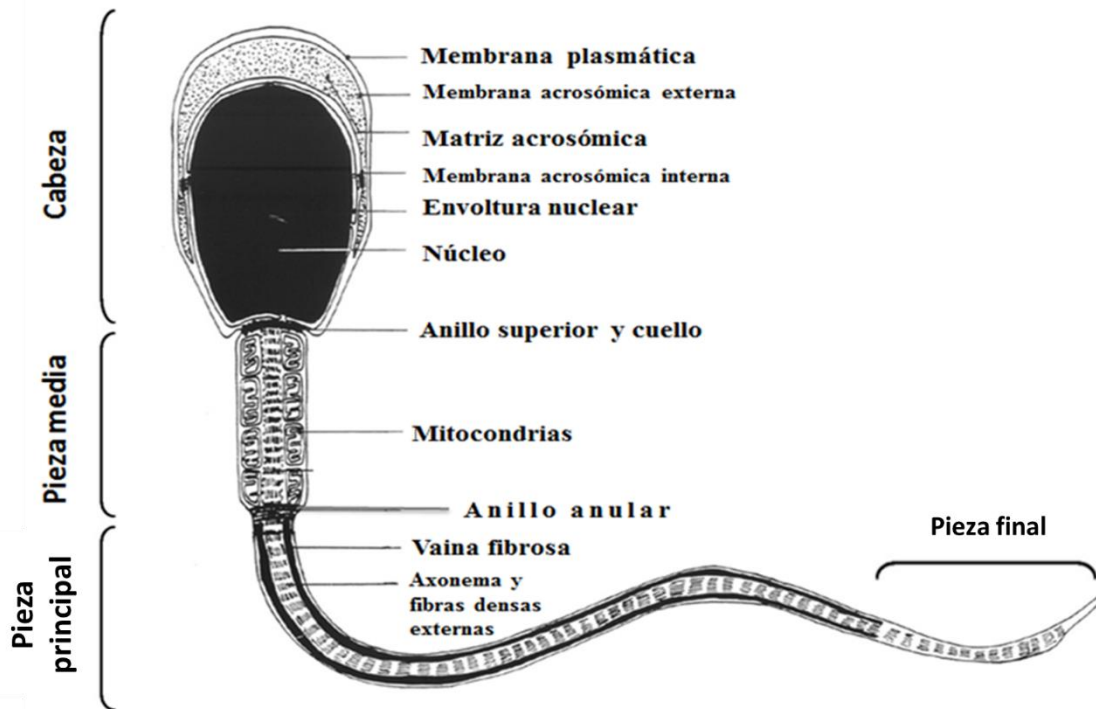


Figura 1. Representación esquemática de un corte transversal de un espermatozoide mostrando sus componentes. Modificado de: (Gadella et al., 2008).

Una vez que el espermatozoide ha sido formado en los túbulos seminíferos, es liberado de las células de Sertoli a través de un proceso llamado espermiación (Eddy, 2006). Sin embargo, a pesar de que esta célula haya terminado su diferenciación morfológica aun no es capaz de fertilizar al ovocito. La adquisición de la capacidad fertilizante dependerá de cambios que presente durante su paso por el epidídimo, entre los que se encuentran: migración de la gota citoplásmica a lo largo del flagelo, remodelación

acrosomal, compactación de la cromatina y cambios en la membrana plasmática, entre otras; éstas modificaciones, son conocidas como maduración espermática epididimaria (Robaire et al., 2006)

1.4 Epidídimo

El epidídimo es un órgano formado por un túbulo altamente enrollado que une a los conductos eferentes con el deferente, y es el encargado de conferirle a los espermatozoides, que han salido del testículo, la capacidad para fertilizar el ovocito (Robaire et al., 2006, Aitken et al., 2007, Sullivan y Mieuxset, 2016). En adición, el epidídimo juega un papel importante en el transporte, el aumento de la concentración espermática, protección y almacenamiento de los espermatozoides (Robaire et al., 2006). El epidídimo puede dividirse en 19 regiones, que se pueden agrupar en tres principales *caput*, *corpus* y *cauda* (Figura 2). Estas subdivisiones están basadas en la distribución de sus tipos celulares. El tipo celular mayormente encontrado en el epidídimo, son las células principales que se encuentran a lo largo de todo el epidídimo; seguido por las células estrechas, que solo se encuentran en el segmento inicial; mientras que las células claras aparecen en las regiones de *caput*, *corpus* y *cauda* del epidídimo. Las células basales y halo se distribuyen a lo largo de todo el epidídimo (Robaire y Hinton, 2012). Sin embargo cada célula cumple una función particular. Las células principales se encargan de endocitar células del lumen y formar epididimosomas (pequeñas vesículas formadas a partir de ampollas en la membrana plasmática de las células epididimarias) que contienen proteínas y ácidos grasos que ayudan a la maduración (Sullivan et al., 2005, Robaire et al., 2006), además posee

receptores para andrógenos (AR), una proteína importante en la vía de señalización río abajo, para la síntesis de proteínas para la maduración (Singh, 2015). Las células apicales de igual manera endocitan sustancias del lumen y contribuyen a la acidificación del medio luminal, al igual que las células estrechas y las células claras. Las células claras además, tienen un rol endocítico y absorben la gota citoplasmica de los espermatozoides. Se desconoce la función principal de las células basales pero se ha visto que tiene un papel en el procesamiento de antígenos, así como el transporte de agua e iones a las células principales, además de tener capacidad antioxidante. Las células halo son la barrera inmunológica del túbulo epididimario (Robaire et al., 2006).

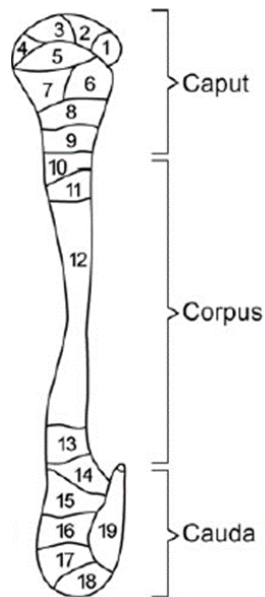


Figura 2. Esquema representativo de la regionalización del epidídimo de rata. Modificado de (Sullivan y Mieusset, 2016)

1.5 Participación del epidídimo en la maduración espermática

Como ya se mencionó previamente, además del transporte, la protección, el almacenamiento y la adquisición de la movilidad, el epidídimo es el encargado de conferirle al espermatozoide la capacidad para fertilizar al ovocito, esto lo lleva a cabo a través de la creación de un microambiente luminal, en donde el objetivo es mantener a los espermatozoides vivos durante su tránsito y que obtengan su potencial fertilizante. Para llevar a cabo esta tarea el fluido epididimario tiene concentraciones de sodio, cloro, calcio y magnesio que disminuyen desde el *caput* hasta la *cauda* del epidídimo, mientras que el fósforo y el potasio aumentan (Aitken et al., 2007, Dacheux y Dacheux, 2014). Este microambiente le permite mantener a los espermatozoides vivos en un estado de reposo a medida que maduran. Así mismo, la concentración de solutos orgánicos como el glutamato, la taurina, el ácido sialico, entre otros, aumenta a medida que los espermatozoides se acercan a la *cauda*, teniendo 100 a 150 mM en el *caput* y más de 200 mM en la *cauda*. Aunque no es claro el papel que tienen estos solutos, se conoce que pueden servir de protección para el espermatozoide, aunado a que pueden ayudar al almacenamiento de los espermatozoides en la región caudal (Robaire et al., 2006). Asimismo, los espermatozoides están expuestos a concentraciones variables de proteínas. A medida que se mueven a lo largo del epidídimo, la composición proteica del líquido epididimal luminal alcanza 25 a 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en la región de la *cauda*, debido que el epidídimo absorbe gran cantidad de agua que acompaña a los espermatozoides de los túbulos seminíferos (lugar donde se forman los espermatozoides) (Robaire et al., 2006, Dacheux y Dacheux, 2014). Otra

labor importante que cumple el epidídimo es aportarle proteínas al espermatozoide a través de exosomas, que pueden transferirle proteínas como la glutatión peroxidasa 5 (Gpx-5) que le ayuda a la protección contra las ERO (Sullivan et al., 2005).

No obstante, cabe destacar que cuando estos mecanismos fallan, los espermatozoides pierden su capacidad fertilizante y mueren. Aunque en espermatozoides no están bien definidos los procesos por los que mueren, en células somáticas se conoce más de este proceso.

1.6 Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular que se lleva a cabo de manera ordenada evitando procesos inflamatorios (Elmore, 2007). Este tipo de muerte celular, puede ser activada en respuesta a varios tipos de estrés celular, daño al DNA, privación de factores de crecimiento, estrés de retículo endoplásmico y señales del medio ambiente, entre otras. También puede activarse por otros factores como: la radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia y radicales libres (Green y Llambi, 2015). En las células somáticas, durante la apoptosis, ocurren eventos como la fragmentación nuclear, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), la exposición de residuos de fosfatidilserina (PS), la activación de caspasas (proteasas específicas de cisteinil-aspartato), la descomposición de la célula en fragmentos discretos (que se refiere comúnmente como “cuerpos apoptóticos”) y su posterior inmersión por fagocitos (Elmore, 2007, Galluzzi et al., 2015, Green y Llambi, 2015, López-Trinidad et al., 2016).

Dependiendo de la vía de señalización que se ejecute, la apoptosis se puede clasificar en dos:

- La extrínseca, que se lleva a cabo por medio de receptores de membrana como son los de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), que poseen dominios intracelulares de muerte (DD, por sus siglas en inglés). Este receptor tiene la capacidad de unirse a ligandos como Fas L, que provoca la oligomerización del receptor, favoreciendo la unión de FADD (proteína asociada al DD-Fas), que actúa sobre la caspasa iniciadora 8 activando a su vez a las caspasas efectoras como lo son la 3 o la 7 (figura 3, A) (Schultz y Harrington, 2003, Elmore, 2007, Green y Llambi, 2015, López-Trinidad et al., 2016).
- La apoptosis intrínseca se ejecuta por medio de la mitocondria o bien del retículo endoplásmico. Cambios como estrés de retículo, daño al DNA, aumento en las ERO, etc., pueden causar que se formen poros en la membrana de la mitocondria interna que resulta en una apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, perdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación al citosol de dos grupos principales de proteínas pro-apoptóticas. La más importante es el citocromo c, que al salir de la mitocondria se une a APAF1 (factor apoptótico 1), el cual, junto con caspasa 9 forman el apoptosoma, que activa a caspasas efectoras como 3 o 7 (figura 3, B) (Schultz y Harrington, 2003, Elmore, 2007, Green y Llambi, 2015, López-Trinidad et al., 2016).

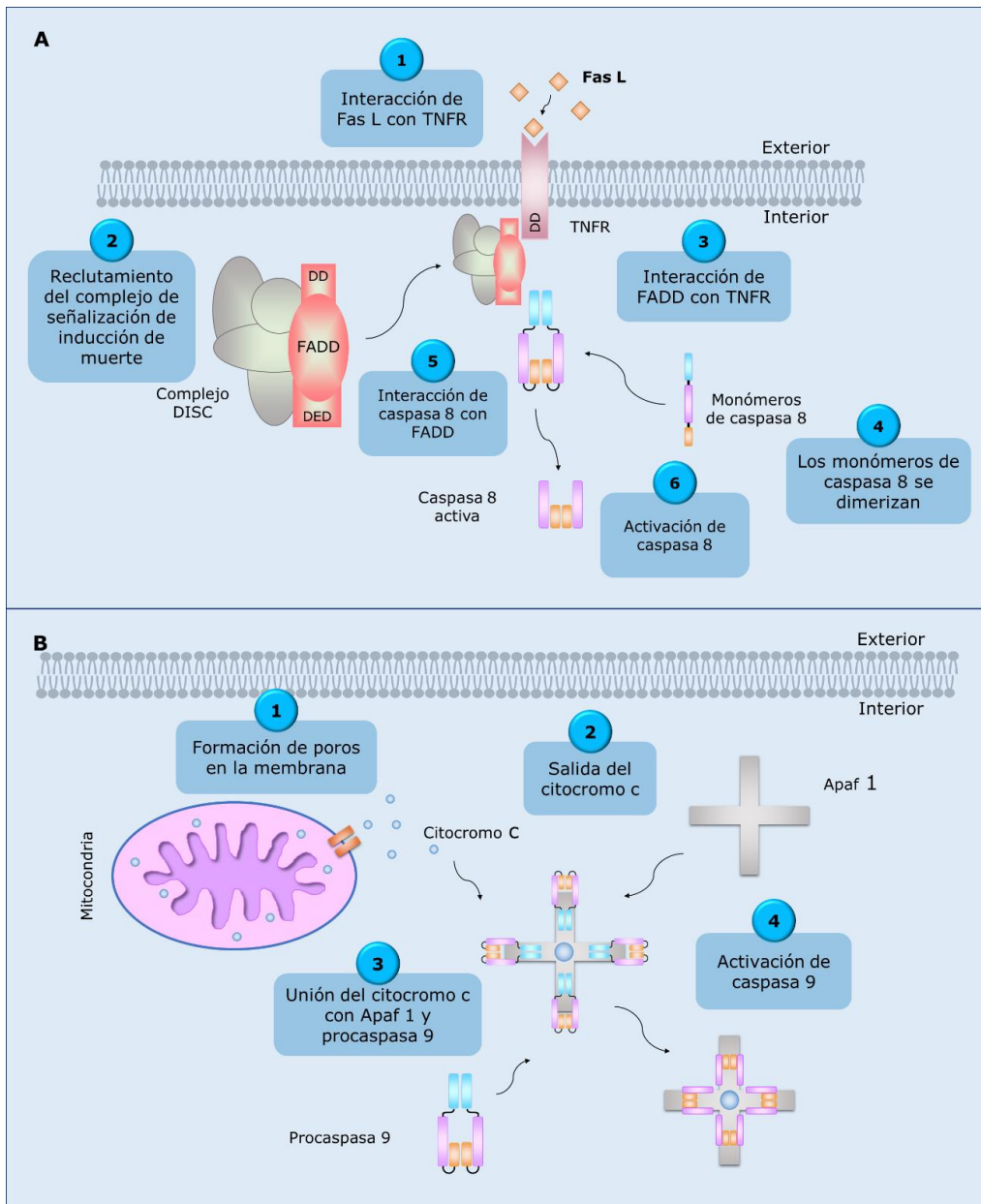


Figura 3. Esquema de la activación de las caspasas que dirige a la apoptosis (A) extrínseca y (B) señalización intrínseca.

En general la apoptosis se puede identificar en células somáticas a través de marcadores como la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la exposición de PS, la fragmentación del DNA en tamaños ascendentes (cuyo se corre en un gel en electroforesis), la formación de cuerpos apoptóticos y la activación de caspasas efectoras. Sin embargo, debido a que los espermatozoides son células altamente diferenciadas y no pueden llevar a cabo procesos como la transcripción genética, no es posible reconocer un verdadero proceso apoptótico, no obstante se han logrado reconocer algunos marcadores, como la fragmentación de DNA (Singh et al., 2003, Aitken y Koppers, 2011, Aitken y Baker, 2013), la externalización de PS (Weng et al., 2002, Aitken y Baker, 2013), la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Grunewald et al., 2009a) y la activación de caspasas (Weng et al., 2002, Paasch et al., 2003, Paasch et al., 2004, Grunewald et al., 2009b, Zalata et al., 2011, Aitken y Baker, 2013, Zitzmann, 2013). Aunque estos marcadores se han encontrado en espermatozoides eyaculados de organismos envejecidos se desconoce si estos marcadores se activan cuando están siendo transportados y madurados a través del epidídimo.

2. Antecedentes

2.1 Alteraciones asociadas con la disminución de la testosterona durante el envejecimiento

Se ha reportado que la testosterona disminuye durante el envejecimiento, y asociado a esto se han encontrado alteraciones en el testículo como aumento del grosor de la

membrana basal de los túbulos seminíferos, en paralelo con la reducción del área del epitelio seminífero, de la vascularización del testículo, así como del número de células de Sertoli y Leydig (Zitzmann, 2013).

2.2 El epidídimo en el envejecimiento

En cuanto al epidídimo, se han reportado la formación de cuerpos densos irregulares (lipofuscinas) en las células principales y en las basales, asociados al aumento de la edad. Así como vacuolas que contienen material homogéneo y cambios degenerativos en las mitocondrias y el retículo endoplásmico. En las células basales se presentan figuras de mielina y matrices irregulares de membrana (Cran y Jones, 1980). También se han observado en la *cauda* del epidídimo una disminución del diámetro luminal, mientras que la altura del epitelio de la región del *corpus* disminuye y el espesor de la membrana basal aumenta (Hermann et al., 2000). Durante el envejecimiento la proporción de las células claras incrementa hacia la *cauda* del epidídimo, mientras que las células principales y las basales disminuyen en todas las regiones y las células estrechas disminuyen hacia el *caput* del epidídimo. Estas disminuciones están acompañadas por un aumento del número de células halo en cada región. Dichas alteraciones, en adición con las alteraciones testiculares (Cran y Jones, 1980, Hermann et al., 2000) provocan modificaciones en los parámetros espermáticos.

2.3 Alteraciones espermáticas debido al envejecimiento

Se ha encontrado disminución de la concentración y movilidad espermática, en el eyaculado y espermatozoides provenientes de *cauda* del epidídimo (Robaire y Hinton, 2012, Lucio et al., 2013). Así como la presencia de anomalías mitocondriales de espermatozoides epididimarios (Syntin y Robaire, 2001), deterioro de la morfología espermática (Zitzmann, 2013) y aumento del daño en el DNA (Singh et al., 2003). Además en espermatozoides eyaculados se han observado algunos de los marcadores apoptóticos mencionados previamente como daño en el DNA (Singh et al., 2003, Aitken y Koppers, 2011, Aitken y Baker, 2013), externalización de PS (Weng et al., 2002, Aitken y Baker, 2013), pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Grunewald et al., 2009a) y activación de caspasas (Weng et al., 2002, Paasch et al., 2004, Grunewald et al., 2009a, Zalata et al., 2011, Aitken y Baker, 2013). No obstante, si el inicio de la apoptosis se desencadena en los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo y mueren, estos no podrán fertilizar al ovocito. Sin embargo, no se ha estudiado la presencia de dichos marcadores en espermatozoides epididimarios y si estos aumentan con el envejecimiento.

3. Justificación

Debido al cambio climático las especies han comenzado a extinguirse, por lo que resulta trascendental conservar el linaje de las especies que se encuentran en peligro de extinción. Sin embargo es inevitable que estos animales envejecan por lo que es imprescindible conocer los mecanismos que afectan a los espermatozoides durante

esta condición, ya que se han visto alteraciones tanto en el epidídimo así como en los espermatozoides que transitan por este órgano. No obstante, es poca la información que se tiene acerca de este tema. Por lo que conocer estos cambios ayudaría a dilucidar una parte de los procesos que sufren los espermatozoides epididimarios durante el envejecimiento, que aporte conocimiento para futuras líneas de conservación de espermatozoides epididimarios.

4. Pregunta de investigación

¿El envejecimiento causará aumento de los marcadores apoptóticos en espermatozoides epididimarios de ratas?

5. Hipótesis

Dado que durante el envejecimiento se disminuye la concentración de testosterona, y ésta es importante para la fisiología del epidídimo, se espera encontrar un aumento de marcadores apoptóticos en espermatozoides epididimarios obtenidos de las diferentes regiones epididimarias.

6. Objetivo general

Determinar si la existencia de marcadores apoptóticos en espermatozoides provenientes del epidídimo de ratas están relacionados con el envejecimiento

7. Objetivo particulares

- Determinar la concentración de testosterona sérica en ratas de 3, 12 y 18 meses, como probable causa de alteraciones espermáticas
- Analizar si existe diferencia en el porcentaje de espermatozoides vivos en ratas envejecidas en *caput*, *corpus* y *cauda* de epidídimo, para conocer si los espermatozoides van muriendo durante su tránsito.
- Conocer la cantidad de espermatozoides epididimários que presenta externalización de PS, en ratas envejecidas.
- Determinar el porcentaje de espermatozoides epididimários que presenta caspasa 3 y 7 activa, que esté relacionada con el envejecimiento.
- Dilucidar si hay una relación de un aumento en el daño en el DNA en espermatozoides epididimários con relación al envejecimiento.
- Determinar si hay una relación de la pérdida de la función mitocondrial en espermatozoides de ratas envejecidas.

8. Material y Métodos

8.1 Animales y grupos de estudio

Para determinar los parámetros apoptóticos se crearon 3 grupos de ratas Wistar: jóvenes (3 meses, n=10); adultas (12 meses, n=7) y envejecidas (18 meses, n=6). Todos los grupos de ratas fueron proporcionadas y mantenidas en el bioterio de la

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar (temperatura ambiente, con un ciclo de luz obscuridad normal y con libre acceso de comida y agua). El manejo de los animales se realizó bajo la norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

8.2 Obtención de suero sanguíneo

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico para proceder con la decapitación. La sangre fue colectada en tubos BD Vacutainer para suero con gel separador y centrifugada a 1500g por 15 minutos. La muestra de suero fue almacenada a -20 °C hasta su análisis.

8.3 Determinación de testosterona

La concentración de testosterona fue determinada por radioinmunoensayo (RIA), usando los kits comerciales TKTT-1 para T (Diagnostic Product Corporation, CA, Estados Unidos). La hormona unida a ¹²⁵I compete por los sitios de unión al anticuerpo (anti-testosterona), posterior a una incubación las muestras fueron leídas con un contador gamma (Cobra, Packard, Estados Unidos) donde la cantidad de cuentas leídas están inversamente relacionadas con la cantidad de hormona presente en la muestra (Martinez-Mota et al., 2008, Viguera-Villasenor et al., 2011).

8.4 Obtención de espermatozoides

Una vez decapitada la rata se disectó y regionalizaron los epidídimos en *caput*, *corpus* y *cauda*. Una vez obtenido el tejido se colocó en una caja Petri para posteriormente picarlo en 500 µl de solución Ringer (NaCl 95 mM; KCl 5 mM; CaCl₂ 1.7 mM; KH₂PO₄ 1.1 mM) y filtrarlo utilizando una malla de lycra (98% Nylon/Poliamida, 2% lycra/Elastano), con un diámetro de trama de 20 µm, para separar los espermatozoides del tejido epididimario (Leon-Galvan et al., 1999).

8.5 Evaluación de la viabilidad espermática

Para poder evaluar el porcentaje de viabilidad espermática se preparó la solución de eosina-nigrosina, disolviendo 0.67 g de eosina Y 10 g de nigrosina en 100 ml de una solución de cloruro de sodio al 9%, posteriormente se realizó un frotis usando 10 µl de espermatozoides y 10 µl del colorante, a continuación se observaron 100 células al microscopio de campo claro a 40X, diferenciando entre espermatozoides muertos en color rosado y espermatozoides vivos sin coloración (WHO, 2010). Como control de la prueba se tomaron 10 µl de la muestra y se sometieron a 70 °C, posteriormente se realizó el frotis con el colorante y finalmente darle lectura.

8.6 Tinción con Anexina V

Para detectar fosfatidilserina una muestra de 5X10⁶ espermatozoides fueron incubados por 5 min a 38°C con Anexina V-FL (1 µg/ml), esta suspensión se mantuvo bajo una atmósfera húmeda en equilibrio con 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente se

fijó usando paraformaldehído al 8% en una proporción 1:1 y se clasificaron los patrones con el marcaje de anexina (figura 6, sección de resultados y discusión) usando el microscopio de fluorescencia, contando 100 células. Así mismo se usó el citómetro de flujo FACScalibur equipado con un láser de Argón excitando a 488nm con un filtro FL-1 para detectar la fluorescencia de Anexina V-FL (de Vries, Wiedmer, Sims, y Gadella, 2003). Para montar el control positivo y corroborar que la prueba se estaba haciendo de manera adecuada, se incubaron espermatozoides de cerdo durante 6 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en un medio capacitante rico en -HCO₃. Está demostrado que este proceso favorece la externalización de fosfatidilserina (Aitken R. J, Baker, y Nixon, 2015; de Vries et al., 2003). En el citómetro de flujo se detectaron 10 mil células y solo se tomó en cuenta aquellas que presentaron fluorescencia. Usando el microscopio de fluorescencia se observaron 100 espermatozoides identificando en cada uno el patrón que presentaban, marcaje en el acrosoma, en la pieza media y aquellos que presentarían ambas (figura 5).

8.7 Detección de caspasas 3 y 7

La actividad de la caspasa 3 y 7 activas se marcaron con el reactivo de nombre comercial FLICA, un inhibidor de caspasas unido a un fluorocromo; y se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante. FLICA 150X stock fue diluida con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 37.5X. Una alícuota de 14.5 µl de semen se incubó con 0.5 µl del reactivo SR-DEVD-fmk a temperatura ambiente por 45 min. Para demostrar la especificidad de FLICA se realizó un control usando dexametasona a una concentración final de 1 µM durante 20 min, después la alícuota

fue procesada para detectar caspasas activas. Se evaluó la presencia de caspasas activas evaluando 100 células usando el microscopio de fluorescencia y 10 mil eventos en el citómetro de flujo.

8.9 Prueba de naranja de acridina

Para determinar la ruptura de cadenas de DNA se tomó una alícuota de 200 μ l de esta suspensión, se mezcló con 400 μ l de una solución detergente/ácido que contenía Tritón X100 0.1% v/v en HCL (0.08 M) y NaCl (0.15 M). Después de 30 seg, se le adicionaron 1.2 ml de solución que contenía naranja de acridina (6 μ g/ml) en NaCl (0.15 M), EDTA (1 mM), Na₂HPO₄ (0.2 M) y ácido cítrico (0.1 M) (pH 6). Las células bajo estas condiciones se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. En el citómetro de flujo se evaluaron 10 mil, la fluorescencia se detectó por el filtro FL1 (Filtro paso de banda de 530/30nm: fluorescencia verde debido a que la naranja de acridina une al DNA intacto) y fue comparada con aquella detectada por el detector FL-3 (Filtro paso banda 620 nm: fluorescencia roja debido a que la naranja de acridina se une a DNA de cadena sencilla) (Gadella y Harrison, 2002). Para la evaluación microscópica se realizó un frotis para posteriormente fijarlo por 12 horas en solución Carnoy's (3:1 metanol, ácido acético). Posteriormente las laminillas fueron sumergidas en la solución de naranja de acridina para proceder con el conteo. Fueron sometidas a evaluación 100 células con el microscopio de fluorescencia, aquellas que presentaran tinción roja en el núcleo se consideraban con daño en el DNA. Como control positivo se usó 100mM H₂O₂ por una hora a 37 °C para detectar ruptura de cadenas de DNA.

8.10 Detección del potencial transmembranal de la membrana interna mitocondrial

Espermatozoides (aproximadamente 5×10^6 células/ml) se tiñeron por 18 min a 38°C con Mitotracker Green (2.5nM) en una atmósfera húmeda en equilibrio con 5% de CO_2 . Todas las muestras se analizaron por citometría de flujo. Después de descartar células no espermáticas y agregados se analizará la muestra bajo un filtro FL1 para la fluorescencia verde (Gadella y Harrison, 2002). Como control positivo se midió la pérdida del potencial de membrana mitocondrial inducida con CCCP a 5mM disuelto en DMSO (un desacoplante del potencial de membrana mitocondrial), incubando durante 40 min bajo las mismas condiciones. De igual manera se detectaron 10 mil células con el citometro de flujo.

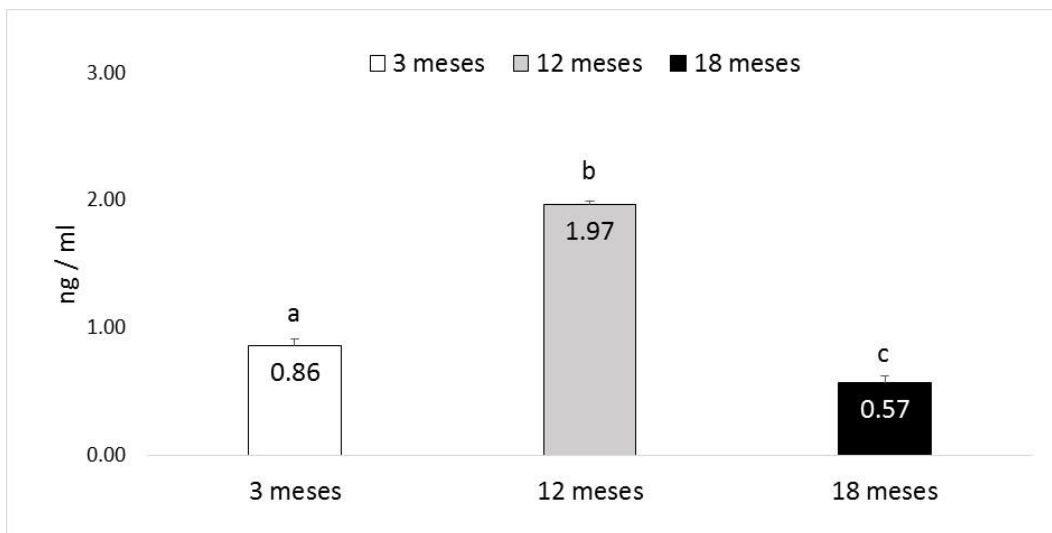
9. Pruebas estadísticas

Para el análisis de datos se compararon los resultados obtenidos de cada región, *caput*, *corpus* y *cauda* en cada una de las edades. También se compararon los resultados de 3, 12 y 18 meses en cada región del epidídimo. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Tukey en caso de que aprobaran la prueba de normalidad, en caso contrario, se compararon mediante kruskal-Wallis, considerando para ello una $p < 0.05$.

10. Resultados y discusión

Durante el envejecimiento, en los mamíferos, el macho presenta cambios reproductivos, como la pérdida de la libido y la disfunción eréctil, principalmente

causado por la disminución de testosterona (Vermeulen, 2000); misma que es causada por diversos factores, entre los que se encuentran: la disminución de las hormonas FSH y LH, disfunción de las células de Leydig y células de Sertoli (Taylor et al., 1996, Hermann et al., 2000); que en conjunto provocan disfunción testicular (Zitzmann, 2013). No obstante, la disminución de la testosterona, no solo afecta al testículo, también se ha reportado que el epidídimo depende de la testosterona para su buen funcionamiento, y se han encontrado alteraciones morfológicas debido al envejecimiento, como aumento del grosor de la membrana basal y formación de lipofuscinas en algunos tipos celulares del epidídimo como, aumento de la proporción de células halo y disminución de células principales y basales (Cran y Jones, 1980). Estos cambios, se ven reflejados en una baja concentración espermática, baja movilidad y anomalías en la pieza media de los espermatozoides, tanto de espermatozoides obtenidos del epidídimo, como espermatozoides eyaculados (Robaire y Hinton, 2012, Lucio et al., 2013). En el presente estudio, se observó que, la rata Wistar de 18 meses presenta una disminución de la testosterona, con respecto a las ratas de 3 meses de edad, 0.57 ± 0.05 ng/ml y 0.86 ± 0.05 ng/ml, respectivamente (Grafica 1); lo que significa una disminución de 34.8%. Cabe señalar que, la concentración más alta de testosterona (1.97 ± 0.02 ng/ml) fue la observada en las ratas de 12 meses.



Gráfica 1. Concentración sérica de testosterona expresada en ng/ml de ratas de 3 meses (barra blanca, n=10); 12 meses (barra gris, n=7) y 18 meses (barra negra, n=6). Letras diferentes representan diferencias estadísticas entre edades (Tukey, $p < 0.05$)

Se ha reportado con anterioridad que la concentración de testosterona dentro de los primeros tres meses de edad es de alrededor de 1.023 ng/ml (RØSte et al., 2003) seguido de un aumento gradual que llega a 2 ng/ml, concentración que se considera de un adulto (Zanato et al., 1994). Sin embargo durante el envejecimiento hay una disminución de hasta 0.7 ng/ml aproximadamente en rata Brown Norway (Wang et al., 1999). Datos que corresponden con nuestros resultados.

Esta disminución en la concentración de testosterona, se debe a alteraciones en el eje hipotálamo hipófisis testículo (Taylor et al., 1996), que a su vez, está relacionada con disminución en el número y funcionalidad de las células de Leydig y Sertoli (Vermeulen, 2000), disminución del pulso y la frecuencia de la hormona LH (Vermeulen, 2000, Stanworth y Jones, 2008), disminución de la hormona GnRH

(Vermeulen, 2000) y aumento de la globulina unidora de hormonas sexuales (SHBG, por sus siglas en inglés) (Stanworth y Jones, 2008). Aunado a lo anterior, hay que considerar que, con el avance de la edad, el número de receptores de andrógenos disminuye en cerebro (Stanworth y Jones, 2008), lo que pudiera provocar que las vías de señalización para la síntesis de proteínas necesarias para la maduración y mantenimiento de los espermatozoides, no se lleven a cabo de manera adecuada.

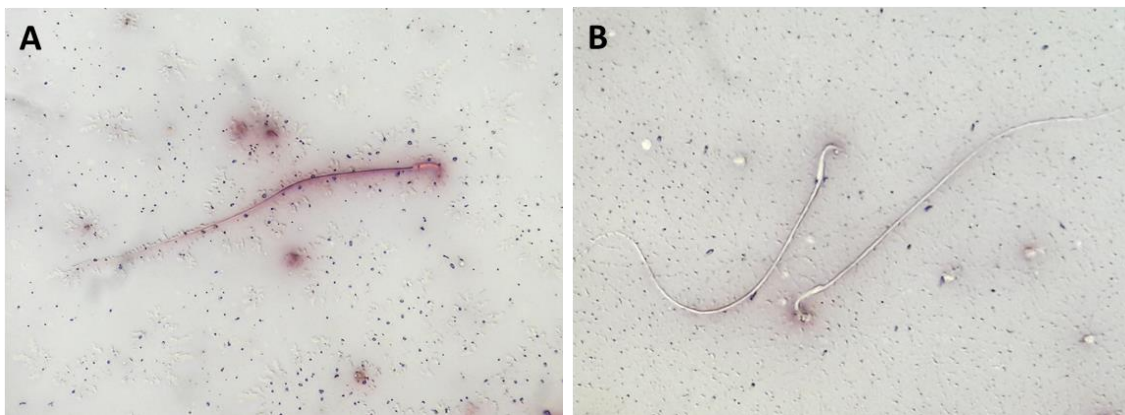
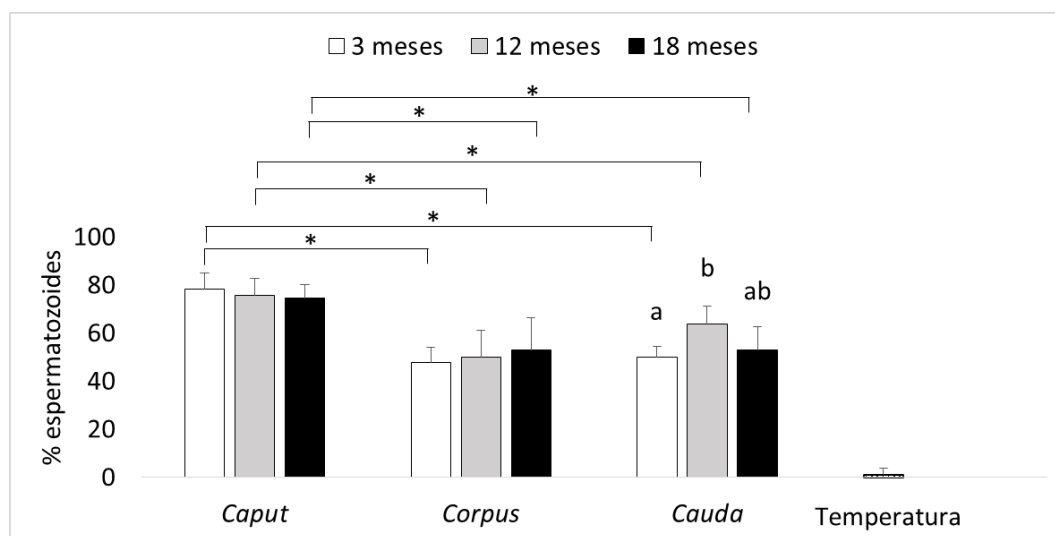


Figura 4. Micrografías de espermatozoides teñidos con Eosina-Nigrosina, en el que se representa una célula muerta (A), y células vivas (B) 400X.

Una vez que los espermatozoides abandonan el testículo, pasan por la *rete testis*, después a los conductos eferentes y posteriormente al epidídimo. En este órgano los espermatozoides permanecen en cada región por ciertos periodos, en *caput* de 2 a 3 días, al igual que en *corpus* y en la región caudal, lugar de almacenamiento, estos permanecen alrededor de 6 días; sin embargo, cuyo el tiempo de almacenamiento en la *cauda* es mayor 6 días, hay una pérdida del potencial fertilizante (Robaire et al., 2006). Posteriormente, estos espermatozoides deben ser removidos de la luz del túbulo epididimario y son absorbidos por las células principales del epidídimo (Ramos-

Ibeas et al., 2013). Por lo anterior, es importante tomar en cuenta que, los machos, en el presente estudio, no fueron eyaculados, y por lo tanto los espermatozoides quedan almacenados por periodos prolongados en el epidídimo, lo que eventualmente provocaría la pérdida de la funcionalidad y la muerte. Esta es una probable explicación de lo que vemos en la gráfica 2. Donde el porcentaje de espermatozoides vivos (Figura 4) en cada una de las regiones del epidídimo, en todas las edades, 3, 12 y 18 meses se ve disminuido, especialmente, en los espermatozoides que pasan de *caput* a *corpus*, pero mantienen esa baja viabilidad al llegar a la *cauda* del epidídimo. En *cauda*, las ratas de 12 meses tienen mayor cantidad de espermatozoides vivos ($63.6 \pm 7.5\%$) que las de 3 meses ($50 \pm 4.3\%$), mientras que las ratas de 18 meses presentan $53 \pm 9.6\%$, que al comparándolo con las ratas de 12 y 3 meses (50% y 63.6% respectivamente), no presenta diferencias significativas ($p > 0.05$) (Gráfica 2).

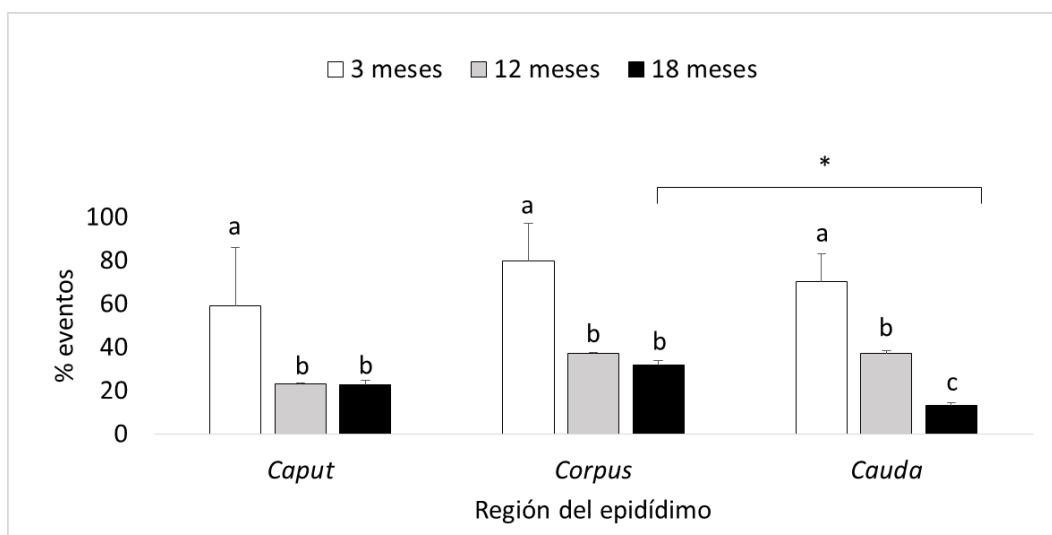


Gráfica 2. Porcentaje de espermatozoides vivos de las tres regiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) de ratas de 3 meses (barra blanca, n=10), 12 meses (barra gris, n=7) y 18 meses (barra negra, n=6), así como los controles

negativos (espermatozoides muertos que previamente fueron sometidos a altas temperaturas, barra con trama). Letras diferentes representan diferencias estadísticas entre grupos de edad. Barra con asterisco representa diferencias entre regiones del epidídimo (Tukey, $p < 0.05$)

Los sistemas biológicos han desarrollado formas de eliminar células que tienen algún daño irreparable y que no son funcionales. Una manera de retirar las células muertas es a través fagocitos profesionales, como las células dendríticas o por los fagocitos no profesionales como las células epiteliales del epidídimo (Knobil y Neill, 2006, Ramos-Ibeas et al., 2013, Gordon, 2016); el indicador para “come me” (eat-me, en inglés) que indica la fagocitosis, es la PS. En la gráfica 3 se muestran los resultados de externalización de PS en la membrana de los espermatozoides, usando el marcaje con Anexina V, evaluados con el citómetro de flujo. Observamos que, los espermatozoides epididimarios de las ratas de 3 meses mantienen el mayor porcentaje de exposición de PS (en promedio 69.62 en las tres regiones), y a partir de los 12 meses disminuye en todas las regiones del epidídimo. Este fenómeno es más marcado en la región de la *cauda* de las ratas de 18 meses en donde alcanza en promedio $12.9 \pm 1.2\%$ (Grafica 3). Al observar estos espermatozoides al microscopio se reconocieron algunas regiones características de fluorescencia (figura 5), marcaje en la pieza media (figura 5A), la región acrosomal y pieza media (figura 5B), y solo en la región acrosomal (figura 5C). Este tipo de marcaje ya se ha reportado con anterioridad, en espermatozoides de humano y de cerdo, bajo condiciones capacitantes (Gadella y Harrison, 2002, de Vries et al., 2003). En donde, de igual manera, usando Anexina V muestran que, el marcaje de la región acrosomal y del flagelo (Figura 6, A) son característicos de células deterioradas (Gadella y Harrison, 2002, de Vries et al., 2003), mientras que, las células

con marcaje en la región acrosomal son células vivas intactas (Gadella y Harrison, 2002, de Vries et al., 2003). En espermatozoides eyaculados de cerdo, se ha encontrado aproximadamente 6% de exposición.



Gráfica 3. Porcentaje de espermatozoides marcados para detectar PS en espermatozoides de cada región del epidídimo, *caput*, *corpus* y *cauda* de ratas de 3 meses (barra blanca, n=10), 12 meses (barra gris, n=7) y 18 meses (barra negra, n=6), analizados bajo el citómetro de flujo. Letras diferentes representan diferencias estadísticas entre grupos de edad. Barra con asterisco representa diferencias entre regiones del epidídimo (Tukey, $p < 0.05$).

Sin embargo, no se había evaluado antes en células provenientes del epidídimo. Por lo tanto, el marcaje en la región acrosomal, se consideró como el marcaje adecuado para la señalización de “eat me”. Por lo que, se evaluó el porcentaje de espermatozoides con marcaje para PS en la región acrosomal (gráfica 4). Los espermatozoides de las ratas de 3 y 12 meses de edad, tienen un aumento en el marcaje cuyo los espermatozoides transitan hacia la *cauda*, y las ratas de 18 meses de edad, aumentan el porcentaje desde que pasan de *caput* a *corpus*, y

posteriormente, hacia la región caudal. Por lo tanto, todos los espermatozoides aumentan este marcaje hacia la región caudal del epidídimo, sin embargo los que mayor marcaje tienen, son los espermatozoides de las ratas de 12 meses ($23.16 \pm 5.9\%$), sin mostrar diferencia con los de las ratas de 3 meses, pero si se encontró una disminución en los espermatozoides de las ratas de 18 meses ($7.6 \pm 7.2\%$). Lo que parece indicar que los espermatozoides que no fueron expulsados del epidídimo y se encuentren almacenados, presenten la marca de “eat me”, ya que deben de ser retirados de la luz del epidídimo, pudiendo ser a través de fagocitosis. Sin embargo y a pesar de que la viabilidad espermática disminuye hacia la *cauda* del epidídimo en todos los grupos experimentales, las ratas de 18 meses presentan menor marcaje para PS, factor que pudiera estar reduciendo la remoción de células, provocando que salieran a través del eyaculado, siendo la causa de un aumento de espermatozoides defectuosos en organismos viejos (Lucio et al., 2013).

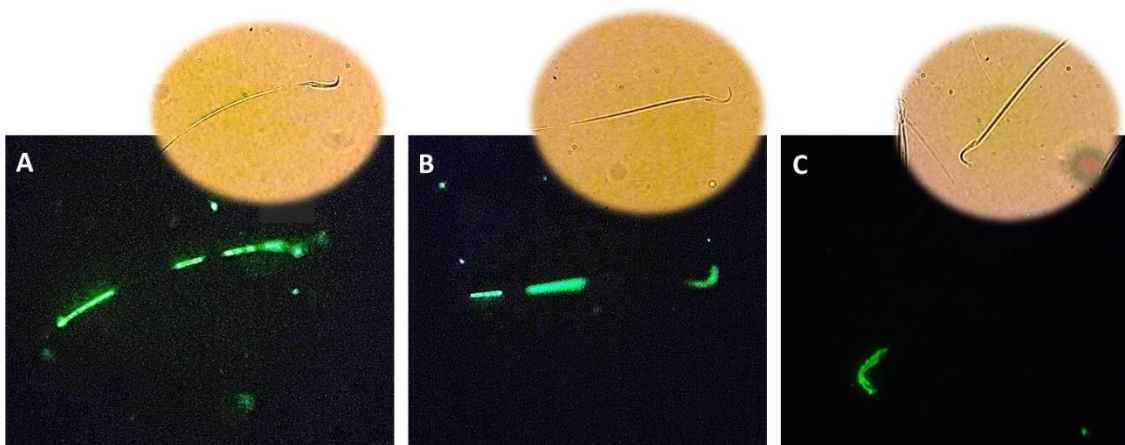


Figura 5. Micrografías de espermatozoides en campo claro (parte superior) y en fluorescencia. Marcaje con Anexina V en la pieza media del espermatozoide (A), pieza media y región acrosomal (B) y solo la región acrosomal (C) 400X.

Recordemos que, durante el envejecimiento la concentración de testosterona disminuye (Vermeulen, 2000, Stanworth y Jones, 2008) (Gráfica 1) lo que provoca mal funcionamiento, tanto del testículo (Zitzmann, 2013) como del epidídimo (Cran y Jones, 1980); esto pudiera provocar que el espermatozoide en algún punto (desde su formación y/o maduración) pudiera tener defectos en las proteínas encargadas de externalizar PS, (escramblasas) o en las responsables de mantener la PS en la cara interna, pudieran tener algún daño o estar siendo inactivadas (Segawa y Nagata, 2015).

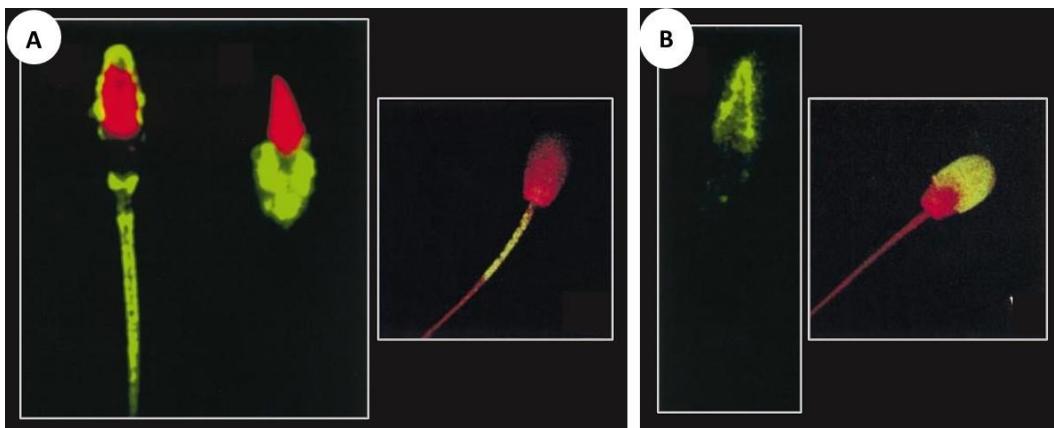
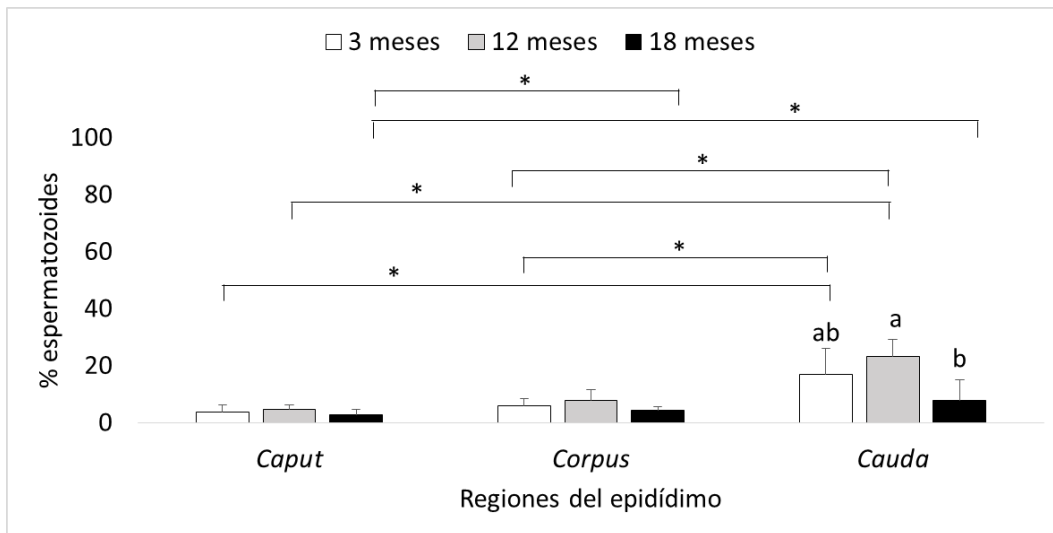


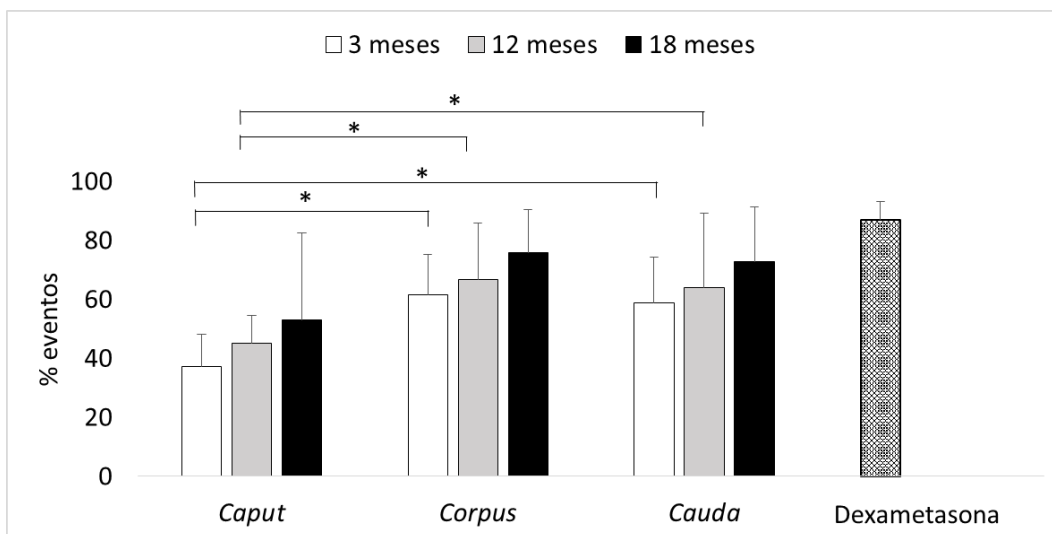
Figura 6. Microfotografía representativa del marcaje con Anexina V en donde demuestra los diferentes patrones encontrados para la externalización de PS. (A) Espermatozoides degenerados, (B) espermatozoides con marcaje para PS (Gadella y Harrison, 2002, de Vries et al., 2003) 1000X.



Gráfica 4. Porcentaje espermatozoides que presentaron marcaje con Anexina V en la región acrosomal, evaluada en cada región del epidídimo, *caput*, *corpus* y *cauda* de ratas de 3 meses (barra blanca, n=10), 12 meses (barra gris, n=7) y 18 meses (barra negra, n=6). Letras diferentes representan diferencias estadísticas entre grupos de edad. Barra con asterisco representa diferencias entre regiones del epidídimo (Para los datos que presentaron normalidad se usó Tukey, datos que no lo presentaron se utilizó Kruskal Wallis, $p < 0.05$)

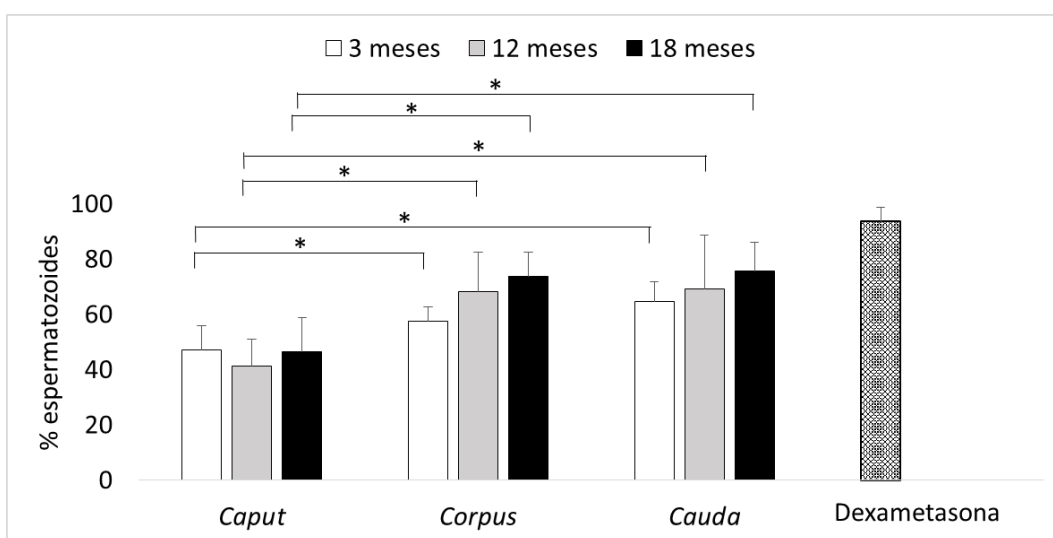
Otro de los factores importantes para lograr la exposición de PS es la activación de caspasas, ya que ellas pueden contribuir a pasar este aminofosfolípido a la capa externa de la membrana lipídica, ya que las caspasas, inactivan a las flipasas por escisión de dominios transmembranales (Segawa y Nagata, 2015). Esta proteína ayuda a mantener a la PS en la cara interna, pero cuando está inactivada, la PS se transloca rápidamente hacia la cara externa de la membrana en contribución con las escramblasas. Por lo tanto, las caspasas tienen un papel importante en este proceso. En la gráfica 5 vemos el porcentaje de células que marcaron caspasa 3 y 7 activas evaluados con el citómetro de flujo, observamos que, los espermatozoides de las ratas

de 3 meses presentan aumento del marcaje de caspasas en los espermatozoides de *corpus* (61.63 ± 13.53) y *cauda* ($58.6 \pm 15.5\%$) en comparación con el marcaje de *caput* ($37.3 \pm 10.7\%$). Este mismo fenómeno se presentó en las ratas de 12 meses, teniendo $45.1 \pm 9.5\%$ en *caput* y $66.6 \pm 19.13\%$, $63.9 \pm 25.15\%$ en *corpus* y *cauda* respectivamente. Esto sugiere que las caspasas aumentan en los espermatozoides de la *cauda* en las ratas de 3 y 12 meses, no así en los espermatozoides de las de 18 meses que se mantienen igual a lo largo de todo el epidídimo. Comparando entre las diferentes edades en cada una de las regiones, no se encuentran diferencias.



Gráfica 5. Porcentaje de espermatozoides que fueron leídos bajo el citómetro de flujo y fueron marcados para caspasa 3 y 7 activas en cada región del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) de ratas de 3 meses (barra blanca, n=10), 12 meses (barra gris, n=7) y 18 meses (barra negra, n=6), así como, los espermatozoides que fueron incubados con dexametasona (control, barra con trama. Barra con asterisco representa diferencias entre regiones del epidídimo (Tukey, $p < 0.05$)

De igual manera los resultados de la microscopía señalan que en todas las edades los espermatozoides presentan más marcaje para caspasas en la región de la *cauda* del epidídimo, comparándolo con *caput* y *corpus*, $64.57 \pm 7.09\%$ en los espermatozoides de las ratas de 3 meses, $69.16 \pm 19.39\%$ en las de 12 y $75.62 \pm 10.48\%$ en 18 meses. No hay diferencias en *caput*, *corpus* o *cauda* en ninguna de las edades. En la figura 7 se ejemplifica el marcaje para caspasas.



Gráfica 6. Porcentaje de espermatozoides con caspasa 3 y 7 activa en cada región del epidídimo, *caput*, *corpus* y *cauda* de ratas de 3 meses (barra blanca, n=10), 12 meses (barra gris, n=7) y 18 meses (barra negra, n=6) así como los espermatozoides que fueron incubados con dexametasona (control, barra con trama). Letras diferentes representan diferencias estadísticas entre grupos de edad. Barra con asterisco representa diferencias entre regiones del epidídimo (Tukey, $p < 0.05$).

De modo que, si se considera que la externalización de la PS está mediada por caspasas, vemos que, en general las caspasas en los espermatozoides aumentan

hacia la *cauda* del epidídimo, al igual que la exposición de PS. Sin embargo, el porcentaje espermatozoides que presenta caspasas activas alcanza el 60% en promedio, mientras que el porcentaje de externalización de PS en la región acrosomal alcanza solo un 8% en promedio. Esto nos hace pensar que, las caspasas pudieran tener algún otro papel en el espermatozoide además de la externalización de PS, ya que, las caspasas se han relacionado continuamente con la “proteólisis catastrófica”, concepto que se refiere a la apoptosis, sin embargo existe otra teoría en donde se relaciona a las caspasas con otros eventos diferentes a la apoptosis como son: la diferenciación terminal; como es el caso de la enucleación de los queratinocitos, que tienen activación de caspasa 3 y 14 (Nhan et al., 2006). Esta activación es necesaria para la remoción de organelos en el estado final de diferenciación del keratinocito (Nhan et al., 2006).

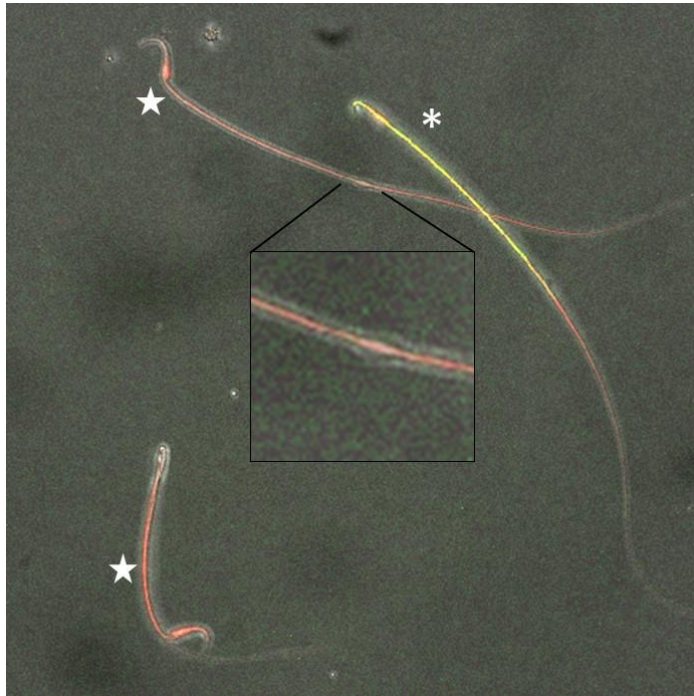
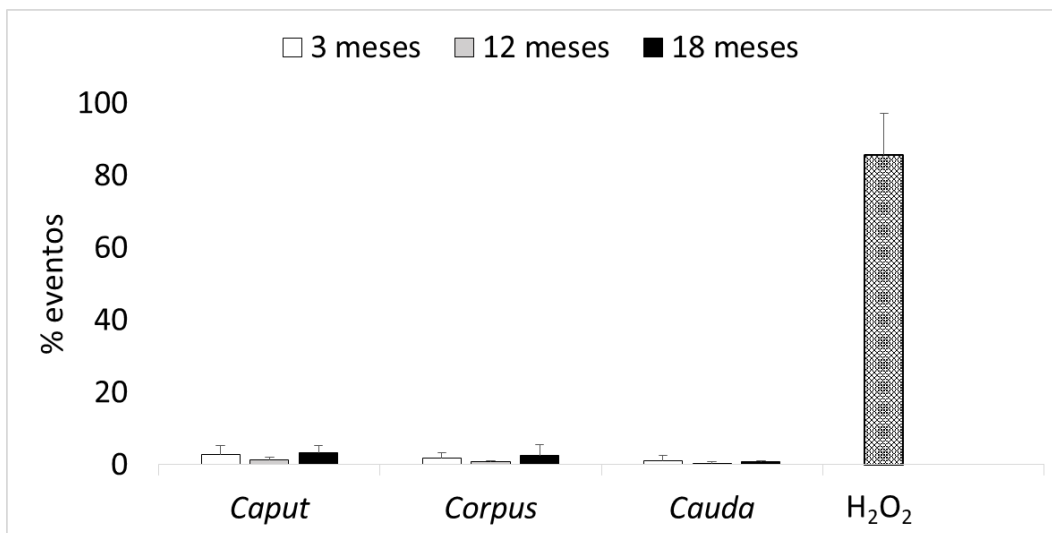


Figura 7. Micrografía de espermatozoides marcados con IP (yoduro de propidio, rojo) y FLICA (verde). Se ejemplifica espermatozoides con anomalías (estrella), así como la amplificación de la pieza principal de un espermatozoide con gota citoplasmica (recuadro) y un espermatozoide normal con doble marcaje (asterisco) 400X.

Esta hipótesis propone que, la activación de las caspasas permite llevar a cabo cambios rápidos y permanentes en el fenotipo celular (Nhan et al., 2006). En el caso del espermatozoide, es una célula altamente diferenciada y que sufre un cambio drástico y permanente, el cual le va a ayudar a cumplir su función, fecundar al ovocito. Por lo que, esta teoría podría ayudar a entender mejor la diferenciación del espermatozoide. Apoyados en el supuesto anterior, es de esperar que si los espermatozoides epididimarios no están sufriendo un proceso similar al de la apoptosis, el DNA se encuentre íntegro o sin fragmentar. En la gráfica 7 se muestran los resultados de la evaluación bajo el citómetro de flujo de los espermatozoides

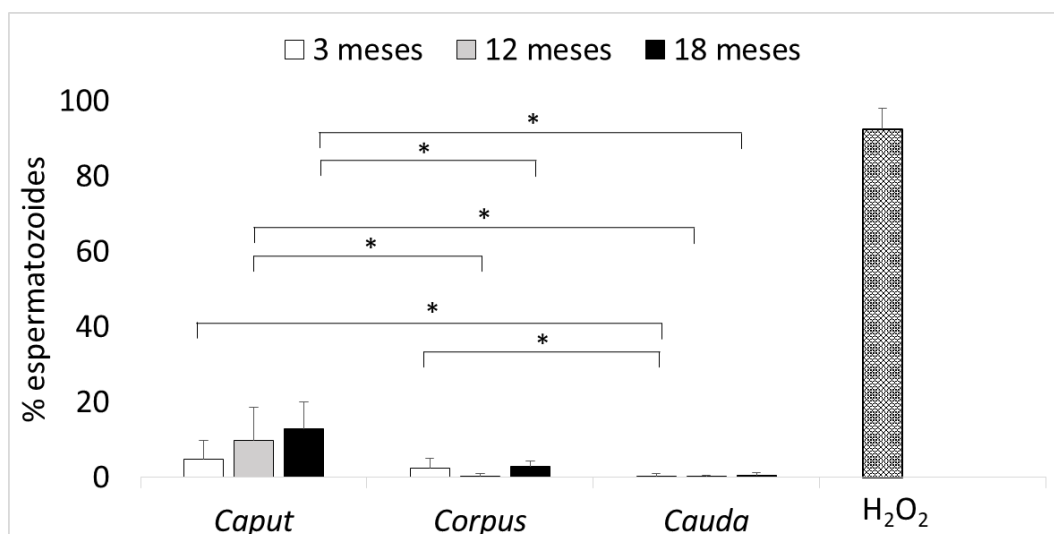
marcados con naranja de acridina. Los espermatozoides de las ratas de 18 meses fueron las que presentaron mayor daño, $3.32 \pm 1.87\%$ en la región del *caput* del epidídimo y el porcentaje más bajo fue los espermatozoides de la *cauda* de las ratas de 12 meses ($0.4 \pm 0.3\%$), sin haber diferencias en ninguna de las comparaciones.



Gráfica 7. Porcentaje de espermatozoides leídos con el citómetro de flujo que presentan pérdida del potencial de membrana mitocondrial, evaluados en cada región del epidídimo, *caput*, *corpus* y *cauda* de ratas de 3 meses (barra blanca, n=10), 12 meses (barra gris, n=7) y 18 meses (barra negra, n=6), así como los espermatozoides que fueron incubados con H₂O₂ (barra con trama). Letras diferentes representan diferencias estadísticas entre grupos de edad. Barra con asterisco representa diferencias entre regiones del epidídimo (Para los datos que presentaron normalidad se usó Tukey, datos que no lo presentaron se utilizó Kruskal Wallis, p<0.05).

De igual manera los porcentajes de daño en el DNA se mantienen bajos cuyo los espermatozoides se observa con el microscopio de fluorescencia (Gráfica 8), teniendo, en este caso, una disminución de daño hacia la *cauda* del epidídimo en las ratas de todas las edades, $0.3 \pm 0.7\%$ en los espermatozoides de *cauda* de ratas de 3 meses, $0.16 \pm 0.4\%$ en las de 12 y $0.5 \pm 0.7\%$ para las de 18 meses. La disminución del

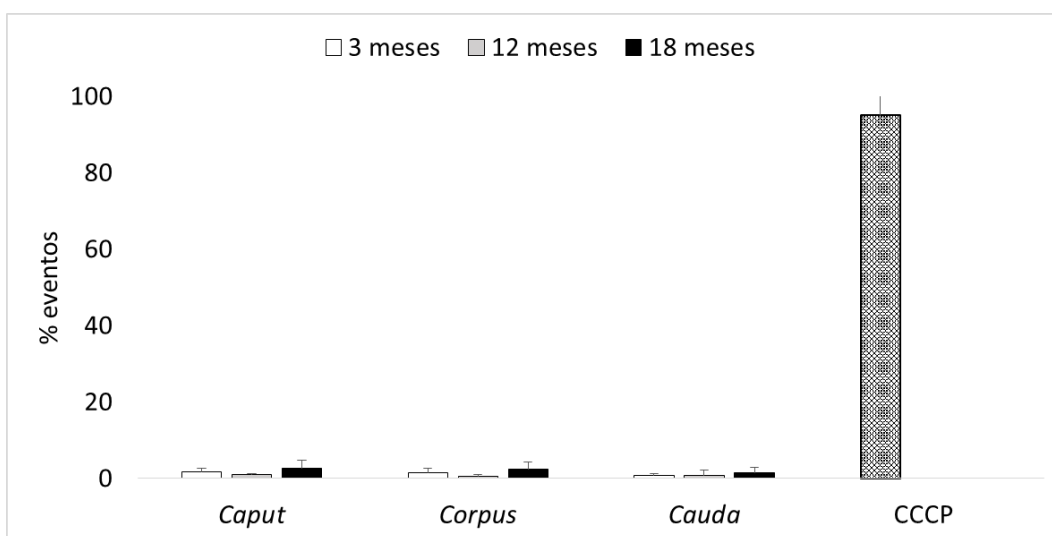
porcentaje de los espermatozoides dañados hacia la *cauda* del epidídimo se ha reportado con anterioridad (De Jonge y Barratt, 2006). Ya que, en el epidídimo, específicamente las células principales, se encarga de retirar de la luz del túbulo epididimario, a las células en mal estado (Ramos-Ibeas et al., 2013).



Gráfica 8. Porcentaje de espermatozoides con daño en el DNA en cada región del epidídimo, *caput*, *corpus* y *cauda* de ratas de 3 meses (barra blanca, n=10), 12 meses (barra gris, n=7) y 18 meses (barra negra, n=6, así como los espermatozoides que fueron incubados con H₂O₂ a 100 mM (barra con trama). Letras diferentes representan diferencias estadísticas entre grupos de edad. Barra con asterisco representa diferencias entre regiones del epidídimo (para los datos que presentaron normalidad se usó Tukey, datos que no lo presentaron se utilizó Kruskal Wallis, p<0.05).

El porcentaje de espermatozoides que perdió el potencial de membrana mitocondrial fue muy bajo, siendo el más bajo en la región del *corpus* en las ratas de 12 meses (0.6±0.3 %) y el más alto en la región del *caput* de las de 18 meses (2.7±2.0 %), sin encontrar diferencias estadísticas (Gráfica 9). En espermatozoides que han llevado a cabo la capacitación, esto quiere decir que las mitocondrias pudieran estar dañadas,

se han encontrado que aproximadamente 5.8% de los espermatozoides pierden el potencial de membrana (Gadella y Harrison, 2002). Dato que no coincide con nuestros resultados. Esto significa que los espermatozoides epididimarios no pierden el potencial de membrana durante el envejecimiento. Esto puede deberse a que las mitocondrias tienen un papel importante en la producción de ERO que contribuyen a la movilidad (Eddy, 2006, Ramalho-Santos et al., 2009, Amaral et al., 2013); sin embargo, en el epidídimo los espermatozoides se mantienen quiescentes gracias a las concentraciones elevadas de iones (Aitken et al., 2007, Dacheux y Dacheux, 2014). Esta quiescencia asegura que en el eyaculado existan espermatozoides móviles (Kumar et al., 2016)



Gráfica 9. Porcentaje de espermatozoides que perdieron el potencial de membrana mitocondrial, en cada región del epidídimo, *caput*, *corpus* y *cauda* de ratas de 3 meses (barra blanca, n=10), 12 meses (barra gris, n=7) y 18 meses (barra negra, n=6 así como los espermatozoides que fueron incubados CCCP, un desacoplante mitocondrial (control, barra con trama) (Tukey, p<0.05).

La apoptosis es un proceso altamente organizado, en el que las células sufren modificaciones para morir de manera ordenada, siendo su principal objetivo: remover las células disfuncionales sin provocar inflamación (Elmore, 2007). Sin embargo, en el espermatozoide no se ha podido definir con certeza si este tipo celular muere por apoptosis, ya que, no cumple con todos los parámetros que engloba la propia definición (Elmore, 2007, Kroemer et al., 2009, Galluzzi et al., 2015). Lo que es evidente es que existen mecanismos en el epidídimo para remover aquellas células que no serán usadas (Ramos-Ibeas et al., 2013) pero hasta el momento, se desconoce con certeza estos mecanismos y sobre todo, de qué manera mueren los espermatozoides en el epidídimo. Cabe destacar que este órgano le ayuda al espermatozoide a la maduración por lo que no se descarta que proteínas como las caspasas pudieran contribuir en este proceso.

Cabe resaltar que los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo están en constante interacción con este órgano y se ha visto que durante el envejecimiento el epidídimo presentan daño en las células que lo componen (Cran y Jones, 1980, Robaire, 2002), esto se pudiera reflejar en el funcionamiento del espermatozoide. Una hipótesis propuesta para el daño en el epidídimo es por estrés oxidante (Robaire, 2002), que es el desequilibrio entre las ERO y las especies antioxidantes. La teoría inmunitaria es otra alternativa que conduce al daño espermático, ya que durante el envejecimiento hay un aumento de las células inmunitarias y pérdida de la barrera hemato-epididimaria. No obstante se conoce poco de cómo estas alteraciones afectan a los espermatozoides.

En base a los resultados obtenidos podríamos sugerir que los espermatozoides epididimarios de animales viejos pudieran utilizarse como alternativa para la conservación de especies. Aunque se usó un modelo murino, las células epididimarias y la maduración epididimaria se conserva en la mayoría de los mamíferos (Robaire et al., 2006)

11. Conclusión

Confirmamos la disminución en las concentraciones de testosterona sin aumento de los marcadores apoptóticos en espermatozoides epididimarios de la rata envejecida.

12. Perspectivas

Hacer un análisis detallado de la morfología del túbulo epididimario de ratas envejecidas.

Determinar si la concentración de testosterona sérica está relacionada con la cantidad de receptor de andrógenos en las células epiteliales del epidídimo.

Determinar si las enzimas antioxidantes y un análisis de las células inmunitarias en el tejido epididimario, como probable causa de daño espermático y epididimario.

13. Bibliografía

AITKEN, R. J. y BAKER, M. A. 2013. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol*, 57, 265-72.

AITKEN, R. J. y KOPPERS, A. J. 2011. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 13, 36-42.

AITKEN, R. J., NIXON, B., LIN, M., KOPPERS, A. J., LEE, Y. H. y BAKER, M. A. 2007. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl*, 9, 554-64.

AMARAL, A., LOURENCO, B., MARQUES, M. y RAMALHO-SANTOS, J. 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, 146, R163-74.

CONDE, C. 2007. *México y el cambio climático global*, México, D.F.

CRAN, D. G. y JONES, R. 1980. Aging male reproductive system: Changes in the epididymis. *Experimental Gerontology*, 15, 93-101.

DACHEUX, J. L. y DACHEUX, F. 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, 147, R27-42.

DE JONGE, C. J. y BARRATT, C. 2006. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, Cambridge University Press.

DE VRIES, K. J., WIEDMER, T., SIMS, P. J. y GADELLA, B. M. 2003. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod*, 68, 2122-34.

DOMÍNGUEZ, P. 2016. *Hay 127 animales viejos en los zoológicos de la CdMx* [Online]. Available: http://www.milenio.com/df/Milenio_Noticias-Mancera_lista_animales_geriatricos-muerte_animales_Chapultepec_0_789521236.html [Accessed 2016].

EDDY, E. M. 2006. The Spermatozoon. *In: KNOBIL, E. y NEILL, J. D. (eds.) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier.

ELMORE, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*, 35, 495-516.

GADELLA, B. M. y HARRISON, R. A. 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod*, 67, 340-50.

GALLUZZI, L., BRAVO-SAN PEDRO, J. M., VITALE, I., AARONSON, S. A., ABRAMS, J. M., ADAM, D., ALNEMRI, E. S., ALTUCCI, L., YREWS, D., ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M., BAEHRECKE, E. H., BAZAN, N. G., BERTRY, M. J., BIANCHI, K., BLAGOSKLONNY, M. V., BLOMGREN, K., BORNER, C., BREDESEN, D. E., BRENNER, C., CAMPANELLA, M., CYI, E., CECCONI, F., CHAN, F. K., CHYEL, N. S., CHENG, E. H., CHIPUK, J. E., CIDLOWSKI, J. A., CIECHANOVER, A., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., DE LAURENZI, V., DE MARIA, R., DEBATIN, K. M., DI DANIELE, N., DIXIT, V. M., DYNLACHT, B. D., EL-DEIRY, W. S., FIMIA, G. M., FLAVELL, R. A., FULDA, S., GARRIDO, C., GOUGEON, M. L., GREEN, D. R., GRONEMEYER, H., HAJNOCZKY, G., HARDWICK, J. M., HENGARTNER, M. O., ICHIJO, H., JOSEPH, B., JOST, P. J., KAUFMANN, T., KEPP, O., KLIONSKY, D. J., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LEMASTERS, J. J., LEVINE, B., LINKERMANN, A., LIPTON, S. A., LOCKSHIN, R. A., LOPEZ-OTIN, C., LUGLI, E., MADEO, F., MALORNI, W., MARINE, J. C., MARTIN, S.

J., MARTINOU, J. C., MEDEMA, J. P., MEIER, P., MELINO, S., MIZUSHIMA, N., MOLL, U., MUNOZ-PINEDO, C., NUNEZ, G., OBERST, A., PANARETAKIS, T., PENNINGER, J. M., PETER, M. E., PIACENTINI, M., PINTON, P., PREHN, J. H., PUTHALAKATH, H., RABINOVICH, G. A., RAVICHYRAN, K. S., RIZZUTO, R., RODRIGUES, C. M., RUBINSZTEIN, D. C., RUDEL, T., SHI, Y., SIMON, H. U., STOCKWELL, B. R., SZABADKAI, G., TAIT, S. W., TANG, H. L., TAVERNARAKIS, N., TSUJIMOTO, Y., VYEN BERGHE, T., VYENABEELE, P., VILLUNGER, A., WAGNER, E. F., et al. 2015. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*, 22, 58-73.

GORDON, S. 2016. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*, 44, 463-475.

GREEN, D. R. y LLAMBI, F. 2015. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.

GRUNEWALD, S., KRIEGEL, C., BAUMANN, T., GLYER, H. J. y PAASCH, U. 2009a. Interactions between apoptotic signal transduction y capacitation in human spermatozoa. *Hum Reprod*, 24, 2071-8.

GRUNEWALD, S., SHARMA, R., PAASCH, U., GLYER, H. J. y AGARWAL, A. 2009b. Impact of caspase activation in human spermatozoa. *Microsc Res Tech*, 72, 878-88.

HERMANN, M., UNTERGASSER, G., RUMPOLD, H. y BERGER, P. 2000. Aging of the male reproductive system. *Experimental Gerontology*, 35, 1267-1279.

KNOBIL, E. y NEILL, J. D. 2006. *Knobil y Neill's Physiology of Reproduction*, Elsevier.

KROEMER, G., GALLUZZI, L., VYENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., EL-DEIRY, W. S., GOLSTEIN, P., GREEN, D. R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., MALORNI, W., NUÑEZ,

G., PETER, M. E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B. y MELINO, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16, 3-11.

KUMAR, L., YADAV, S. K., KUSHWAHA, B., PYEY, A., SHARMA, V., VERMA, V., MAIKHURI, J. P., RAJENDER, S., SHARMA, V. L. y GUPTA, G. 2016. Energy Utilization for Survival and Fertilization-Parsimonious Quiescent Sperm Turn Extravagant on Motility Activation in Rat. *Biol Reprod*, 94, 96.

LEON-GALVAN, M. A., FONSECA, T., LÓPEZ-WILCHIS, R. y ROSADO, A. 1999. Prolonged storage of spermatozoa in the genital tract of female Mexican big-eared bats (*Corynorhinus mexicanus*): the role of lipid peroxidation. *Canadian Journal of Zoology*, 77, 7-12.

LÓPEZ-TRINIDAD, B. P., F, M. K., ALEJANDRO ÁVALOS-RODRÍGUEZ, RODRÍGUEZ-TOBÓN, A., RODRÍGUEZ-TOBÓN, E., S, F. M. R. y ARENAS-RÍOS, E. 2016. Apoptosis en espermatozoides. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 3, 22-27.

LUCIO, R. A., TLACHI-LÓPEZ, J. L., EGUIBAR, J. R. y ÁGMO, A. 2013. Sperm count and sperm motility decrease in old rats. *Physiology y Behavior*, 110–111, 73-79.

MARTINEZ-MOTA, L., CRUZ-MARTINEZ, J. J., MARQUEZ-BALTAZAR, S. y FERNYEZ-GUASTI, A. 2008. Estrogens participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 88, 332-40.

NELSON, N. R., BIRD, I. M. y BEHAN, M. 2011. Testosterone restores respiratory long term facilitation in old male rats by an aromatase-dependent mechanism. *The Journal of Physiology*, 589, 409-421.

NHAN, T. Q., LILES, W. C. y SCHWARTZ, S. M. 2006. Physiological Functions of Caspases Beyond Cell Death. *The American Journal of Pathology*, 169, 729-737.

PAASCH, U., AGARWAL, A., GUPTA, A. K., SHARMA, R. K., GRUNEWALD, S., THOMAS, A. J., JR. y GLYER, H. J. 2003. Apoptosis signal transduction and the maturity status of human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci*, 1010, 486-8.

PAASCH, U., GRUNEWALD, S., AGARWAL, A. y GLYERA, H. J. 2004. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril*, 81 Suppl 1, 802-9.

RAJFER, J. 2003. Decreased Testosterone in the Aging Male. *Reviews in Urology*, 5, S1-S2.

RAMALHO-SANTOS, J., VARUM, S., AMARAL, S., MOTA, P. C., SOUSA, A. P. y AMARAL, A. 2009. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads y gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update*, 15, 553-72.

RAMOS-IBEAS, P., PERICUESTA, E., FERNYEZ-GONZALEZ, R., RAMIREZ, M. A. y GUTIERREZ-ADAN, A. 2013. Most regions of mouse epididymis are able to phagocytose immature germ cells. *Reproduction*, 146, 481-9.

ROBAIRE, B. 2002. Aging of the Epididymis. *In*: ROBAIRE, B., HINTON, B. y ORGEBIN-CRIST, M. C. (eds.) *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice: From Molecules to Clinical Practice : a Comprehensive Survey of the Efferent Ducts, the Epididymis and the Vas Deferens*. Springer US.

ROBAIRE, B., HINTON, B. T. y ORGEBIN-CRIST, M.-C. 2006. The Epididymis. *In*: KNOBIL, E. y NEILL, J. D. (eds.) *Knobil y Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier.

RØSTE, L. S., TAUBØLL, E., ISOJÄRVI, J. I. T., BERNER, A., BERG, K. A., PAKARINEN, A. J., HUHTANIEMI, I. T., KNIP, M. y GJERSTAD, L. 2003. Gonadal morphology and sex hormones in male and female Wistar rats after long-term lamotrigine treatment. *Seizure*, 12, 621-627.

SCHULTZ, D. R. y HARRINGTON, W. J., JR. 2003. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*, 32, 345-69.

SEGAWA, K. y NAGATA, S. 2015. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends in Cell Biology*, 25, 639-650.

SINGH, N. P., MULLER, C. H. y BERGER, R. E. 2003. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*, 80, 1420-30.

SINGH, S. K. 2015. *Mammalian Endocrinology and Male Reproductive Biology*, CRC Press.

STANWORTH, R. D. y JONES, T. H. 2008. Testosterone for the aging male; current evidence and recommended practice. *Clinical Interventions in Aging*, 3, 25-44.

SULLIVAN, R. y MIEUSSET, R. 2016. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update*.

SULLIVAN, R., SAEZ, F., GIROUARD, J. y FRENETTE, G. 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis*, 35, 1-10.

SYNTIN, P. y ROBAIRE, B. 2001. Sperm structural and motility changes during aging in the Brown Norway rat. *J Yrol*, 22, 235-44.

TAYLOR, G., BARDGETT, M., FARR, S., HUMPHREY, W., WOMACK, S. y WEISS, J. 1996. Aging of the brain-testicular axis: reproductive systems of healthy old male rats with or without endocrine stimulation. *Proc Soc Exp Biol Med*, 211, 69-75.

VERMEULEN, A. 2000. Andropause. *Maturitas*, 34, 5-15.

VIGUERAS-VILLASENOR, R. M., ROJAS-CASTANEDA, J. C., CHAVEZ-SALDANA, M., GUTIERREZ-PEREZ, O., GARCIA-CRUZ, M. E., CUEVAS-ALPUCHE, O., REYES ROMERO, M. M. y ZAMBRANO, E. 2011. Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem*, 113, 214-20.

WANG, C., SINHA HIKIM, A. P., LUE, Y. H., LEUNG, A., BARAVARIAN, S. y SWERDLOFF, R. S. 1999. Reproductive aging in the Brown Norway rat is characterized by accelerated germ cell apoptosis and is not altered by luteinizing hormone replacement. *J Yrol*, 20, 509-18.

WENG, S. L., TAYLOR, S. L., MORSHEDI, M., SCHUFFNER, A., DURAN, E. H., BEEBE, S. y OEHNINGER, S. 2002. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod*, 8, 984-91.

WHO 2010. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, World Health Organization.

ZALATA, A., EL-MOGY, M., ABDEL-KHABIR, A., EL-BAYOUMY, Y., EL-BAZ, M. y MOSTAFA, T. 2011. Sperm caspase-9 in oligoasthenoteratozoospermic men with and without varicocele. *Fertil Steril*, 96, 1097-9.

ZANATO, V. F., MARTINS, M. P., ANSELMO-FRANCI, J. A., PETENUSCI, S. O. y LAMANO-CARVALHO, T. L. 1994. Sexual development of male Wistar rats. *Braz J Med Biol Res*, 27, 1273-80.

ZITZMANN, M. 2013. Effects of age on male fertility. *Best Practice y Research Clinical Endocrinology y Metabolism*, 27, 617-628