

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**IMPACTO DE LA NUTRICIÓN DIFERENCIAL DURANTE LA PREÑEZ Y
LACTANCIA SOBRE LA PROTEÍNA DE SHOCK TÉRMICO HSP90 β EN
TESTÍCULOS DE RATAS ADULTAS**

“Por”

Camila LARRAÑAGA SPOSITO

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias.
Orientación: Tecnología de los alimentos.

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2017**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dra. Patricia Genovese

Segundo Miembro (Tutor):

Dra. Graciela Pedrana

Tercer Miembro:

Prof. Juan Calvo

Cuarto Miembro:

Lic. Paula Lombide

Fecha:

30/08/2017

Autor:

Camila Larrañaga Sposito

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutora Graciela Pedrana, por su enseñanza, apoyo, constancia, y calidad humana que permitieron realizar la Tesis de Grado y a su familia por acompañarnos de cerca en este proceso. A mi co-tutora Paula Lombide por su constante apoyo. A todas las personas que forman parte del Área de Histología Embriología y Desarrollo por hacerme sentir parte del equipo, permitir realizar el trabajo y por el conocimiento aportado, en especial a Ana Camacho por su compañerismo y constante disponibilidad. Al personal de Biblioteca de Facultad de Veterinaria por su rapidez en la búsqueda bibliográfica. A mis amigas y a mis compañeros de estudio por la motivación constante, a mi familia, en especial a mis padres por inculcarme las ganas de superarme y ser constante para lograr mis objetivos y por su enorme apoyo para realizar esta carrera. A Federico, mi amor y compañero de vida, por estar presente constantemente y no dejar que nunca bajara los brazos y por último y más importante a mi hijo Felipe que se convirtió en el motor de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	1
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE FIGURAS.....	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Subnutrición como factor de programación fetal	11
1.2. Espermatogénesis.....	11
1.3. Proteínas de shock térmico (HSPs).....	11
1.4. Rol de las HSPs en la espermatogénesis.....	11
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Espermatogénesis.....	12
2.1.2. Fases de la espermatogénesis.....	14
2.1.2.1. Espermatocitogénesis	14
2.1.2.2. Meiosis	14
2.1.2.3. Espermiogénesis:	14
2.1.3. Regulación de la espermatogénesis.....	15
2.2. Histología de los túbulos seminíferos.	16
2.2.1. Epitelio seminífero	16
2.2.1.1. Células de Sertoli.....	16
2.2.1.2. Espermatogonias.....	17
2.2.1.3. Espermatocitos	17
2.2.1.4. Espermatidas.....	17
2.2.1.5. Espermatozoides	17
2.2.2. Lámina propia.....	18
2.2.3. Tejido intersticial (intertubular).....	18
2.3. Proteínas de shock térmico (HSP)	20
2.3.1. HSP90	20
2.3.1.1. HSP90 en testículo	22
2.4. Subnutrición como factor de programación fetal	23
3. OBJETIVOS	24

4. HIPÓTESIS	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. Animales.....	25
5.2. Diseño experimental.....	25
5.3. Obtención de muestras.....	25
5.4. Procesamiento histológico.....	27
5.4.1. Microtomía.....	27
5.5. Técnica de inmunohistoquímica	27
5.5.1. Preparación de soluciones buffer, alicuotado y dilución de anticuerpo	27
5.5.2. Ensayo de inmunohistoquímica.....	27
5.6. Captura de imágenes de preparaciones de inmunohistoquímica	28
5.7. Análisis cuantitativo digital de imágenes	28
5.8 Análisis estadístico	31
6. RESULTADOS	32
6.1. Resultados descriptivos de la inmunomarcación de HSP90 en el parénquima testicular de rata.....	32
6.1.1. Localización de la inmunomarcación de HSP90 en animales del grupo control	32
6.1.2. Localización de la inmunomarcación de HSP90 en animales de grupos tratados	34
6.2. Resultados cuantitativos de inmunoexpresión de HSP90 en el parénquima testicular de animales subnutridos	44
6.2.1. Área inmunomarcada total para la proteína HSP90	44
6.2.2. Área inmunomarcada para la proteína HSP90, nivel de inmunoexpresión alto.....	44
6.2.3.. Área inmunomarcada para la proteína HSP90, nivel de inmunoexpresión moderado	44
7. DISCUSIÓN.....	46
7.1. Inmunexpresión y localización de HSP90 en túbulo seminífero de ratas adultas normales.....	47
7.2. Inmunexpresión y localización de HSP90 en túbulo seminífero de ratas en animales subnutridos.....	48
7.3. El mayor efecto de la subnutrición sobre la inmunexpresión testicular HSP90 se observó cuando la subnutrición se extendió en períodos pre y postnatales	48
7.4. Efecto de la subnutrición sobre la expresión de HSP90 en espermatogonias... ..	48
7.5. Efecto de la subnutrición sobre la expresión de HSP90 en espermátidas	48

7.6. Efectos de la subnutrición sobre la translocación al núcleo de HSP90 en espermátidas elongadas	49
7.7.. Efecto de la subnutrición sobre la expresión de HSP90 en células de Sertoli..	49
7.8. Relación entre la subnutrición, las HSP90 y la inhibición de la apoptosis	50
7.9. Vinculación de la disminución HSP90 con la disminución de la hormona testosterona.....	50
8. CONCLUSIONES	52
9. BIBLIOGRAFÍA.....	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Imágenes histológicas de túbulos seminíferos que representan los 14 estadios del ciclo del epitelio seminífero de la rata en base a las posibles asociaciones de células germinales. Adaptado de Lagarrigue et. al 2011.....13
- Figura 2. Histología del epitelio seminífero de rata adulta a: Dibujo de células del epitelio, adaptado de Gilbert et al 2006, b:Imagen histológica de túbulo seminífero de un animal control.....19
- Figura 3. Ilustración donde se muestra la conformación tridimensional de HSP90, con sus tres dominios (N, M y C). Adaptado de (Li & Buchner 2012).....21
- Figura 4. Diseño experimental. Esquema donde se describen los períodos de subnutrición materna.....26
- Figura 5. Imágenes representativas de procesamiento de imágenes para cuantificación de área inmunomarcada de HSP90 β en túbulo seminífero de rata adulta.....30
- Figura 6. Cortes transversales de túbulos seminíferos de ratas adultas del grupo control con técnica de inmunohistoquímica evidenciando la inmunomarcación de la proteína de shock térmico HSP90 β a nivel de los diferentes tipos celulares.....33
- Figura 7. Imágenes histológicas de túbulos seminíferos de ratas adultas con técnica de inmunohistoquímica evidenciando la inmunomarcación de la proteína de shock térmico HSP90 β . En cada una de las imágenes se observa un sector del túbulo seminífero en corte transversal correspondiente al mismo estadio del ciclo del epitelio seminífero (XIV).....35
- Figura 8. Imágenes histológicas de túbulos seminíferos de ratas adultas con técnica de inmunohistoquímica donde se denota la inmunomarcación de la proteína de shock térmico HSP90 β en espermátidas redondas que se encuentran entre la fase de Golgi y de Casquete. En cada una de las imágenes se observa un sector del túbulo seminífero en corte transversal correspondiente al mismo estadio del ciclo del epitelio seminífero (V-VI).....37
- Figura 9. Imágenes histológicas de túbulos seminíferos de ratas adultas con técnica de inmunohistoquímica evidenciando la inmunomarcación de la proteína de shock térmico HSP90 β . En cada una de las imágenes se observa un sector del túbulo seminífero en corte transversal correspondiente al mismo estadio del ciclo del epitelio seminífero, entre los estadios IX-X.....39
- Figura 10. Imágenes histológicas de túbulos seminíferos de ratas adultas con técnica de inmunohistoquímica evidenciando la inmunomarcación de la proteína de shock térmico HSP90 β . En cada una de las imágenes se observa un sector del túbulo seminífero en corte transversal correspondiente al mismo estadio del ciclo del epitelio seminífero (XI-XII).....41

Figura 11. Imágenes histológicas de túbulos seminíferos de ratas adultas con técnica de inmunohistoquímica evidenciando la inmunomarcación de la proteína de shock térmico HSP90 β a nivel del citoplasma de las células de Sertoli.....43

Figura 12. Gráficos de análisis cuantitativo de inmunomarcación de HSP90 β en túbulos seminíferos de ratas adultas, cuyas madres fueron subnutridas durante diferentes períodos del desarrollo. Porcentaje de área inmunomarcada en grupo control (CONT), grupo subnutrido en preñez (UNP), grupo subnutrido en lactación (UNL) y grupo subnutrido en preñez y lactación (UNPL).....45

RESUMEN

Numerosos estudios han determinado que el estado nutricional de la madre durante la gestación puede alterar el desarrollo fetal disminuyendo el peso al nacer, programando a largo plazo alteraciones en la vida adulta. A nivel reproductivo se ha demostrado que una restricción de nutrientes durante la preñez provoca infertilidad en machos en la vida adulta. Sin embargo los mecanismos intrínsecos que median los eventos de programación fetal aún no han sido dilucidados. Dentro de las moléculas plausibles de mediar cambios se encuentran a las proteínas de shock térmico (HSPs), chaperonas moleculares esenciales en las células eucariotas. Se vinculan al desarrollo de los testículos, jugando un rol crucial en el proceso de espermatogénesis. Entre ellas la HSP90 es una proteína vinculada a la estabilización y activación de quinasas postmeióticas. Nuestra hipótesis sugiere que la subnutrición durante períodos claves del desarrollo afecta la expresión de la HSP90. Por lo tanto el objetivo del presente estudio fue caracterizar y cuantificar la expresión de la HSP90 en testículos de animales adultos cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez y lactancia. Se utilizaron testículos obtenidos de ratas Wistar de 120 días de edad (n=40) cuyas madres fueron divididas al azar en grupos control, subnutrido en preñez, subnutrido en lactación y subnutrido en preñez/lactancia. Los testículos fueron fijados en formaldehído, procesados histológicamente hasta su inclusión en parafina. Posteriormente se obtuvieron secciones de 5µm de espesor, se realizó la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpo primario anti-HSP90β1, y se reveló con diaminobencidina dando un precipitado de color marrón en los sitios donde se localiza la proteína. Se realizó el análisis descriptivo de la localización de la HSP90, así como la cuantificación del área inmunomarcada total, área inmunomarcada de nivel alto (marrón oscuro), y de nivel moderado (marrón claro). Los resultados fueron expresados como medias ± e.e.m. y comparados mediante ANOVA, siendo el nivel de significación definido como $p < 0,05$. En animales control, dentro del túbulo seminífero la inmunomarcación de HSP90 a nivel de las espermatogonias fue intensa y de localización citoplasmática. En cuanto a los espermatocitos se evidenció una inmunomarcación moderada a intensa en espermatocitos en leptocigoteno en región nuclear y moderada inmunomarcación en espermatocitos en paquiteno a nivel citoplasmático. En espermátidas redondas la inmunomarcación fue intensa en la región de gránulo acrosómico, y leve a nivel nuclear en espermátidas elongadas. En las células de Sertoli se observó inmunomarcación leve a moderada a nivel citoplasmático. En todos los animales subnutridos la inmunomarcación intensa fue localizada en leptocigoteno y en espermátidas elongadas en la región nuclear. En cuanto al análisis cuantitativo, el área inmunomarcada total de HSP90 disminuyó en todos los grupos subnutridos en comparación con el grupo control, siendo el grupo subnutrido durante preñez y lactancia (UNPL) el de menor expresión ($p < 0,0001$). En la inmunomarcación de nivel alto registró una disminución únicamente en el grupo UNPL ($p = 0,0019$) con respecto al control. En la inmunomarcación de nivel moderado se registró una disminución en todos los grupos subnutridos al igual que en la inmunomarcación total. En conclusión, la inmutioexpresión de la proteína de shock térmico HSP90 se altera en condiciones de subnutrición, siendo dicha disminución más intensa cuando la subnutrición se produce en ambos períodos de desarrollo pre y postnatal. Por lo tanto la subnutrición durante períodos críticos del desarrollo disminuye la inmutioexpresión de una de las proteínas importantes para el mantenimiento de una espermatogénesis normal.

SUMMARY

Numerous studies have determined that the nutritional status of the mother during gestation can alter fetal development, decreasing weight at birth, provoking long-term alterations in adulthood. At the reproductive level, it has been shown that nutrient restriction during pregnancy leads to infertility in males in adult life. However the intrinsic mechanisms that mediate fetal programming events have not yet been elucidated. Among the molecules which are plausible of medical changes are heat shock proteins (HSPs), essential molecular chaperones in eukaryotic cells. They are linked to the development of the testicles, playing a crucial role in the process of spermatogenesis. Among them, HSP90 is a protein linked to the stabilization and activation of post-meiotic kinases. Our hypothesis suggests that undernourishment during periods of development affects HSP90 expression. Therefore, the aim of the present study was to characterize and quantify the expression of HSP90 in the testes of adult animals whose mothers were undernourished during pregnancy and lactation. The testes were obtained from 160 day old Wistar rats ($n = 40$) whose mothers were randomly divided into control groups, undernourished in pregnancy, undernourished in lactation and undernourished in pregnancy / lactation. The testes were fixed in formaldehyde, processed histologically until their inclusion in paraffin. Subsequently, sections of 5 μm thickness were obtained and the immunohistochemistry technique was performed with anti-HSP90 β 1 primary antibody, and was developed with diaminobenzidine giving a brown precipitate of color at the sites where the protein is located. A descriptive analysis of the HSP90 localization was carried out, as well as the quantification of the total immunolabeled area, the high level (dark brown) and moderate (light brown) immunolabeled area. The results were expressed as means \pm e.e. and compared by ANOVA, the significance level being defined as $p < 0.05$. In control animals, within the seminiferous tubule the immunostaining of HSP90 at the level of spermatogonia was intense and cytoplasmic. As for the spermatocytes, a moderate to intense immunolabeling was evidenced in leptozygotene spermatocytes in the nuclear region and moderate immunostaining in spermatocytes in pachytene a cytoplasmic level. In round spermatids the immunostaining was intense in the acrosomal granule region, and a nuclear level in elongated spermatids. Sertoli cells showed mild to moderate immunolabeling at the cytoplasmic level. In all undernourished animals the intense immunostaining was localized in leptozygotene and elongated spermatids in the nuclear region. As for the quantitative analysis, the total immunolabelled area of HSP90 decreased in all the undernourished groups compared to the control group, with the UNPL group being the lowest expression one ($p < 0.0001$). In the high-level immunostaining, there was a decrease in the UNPL group ($p = 0.0019$) with respect to the control. In moderate-level immunostaining, there was a decrease in all undernourished groups as well as in total immunostaining. In conclusion, the immunoexpression of the heat shock protein HSP90 is altered under undernutrition conditions, while the most intense decline takes place when undernutrition occurs in both pre and postnatal developmental periods. Thus undernutrition during critical periods of development decreases the immunoexpression of one of the proteins which are important for the maintenance of normal spermatogenesis

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Subnutrición como factor de programación fetal

Durante el período del desarrollo que va desde la concepción hasta después del nacimiento, existen influencias que pueden interferir en la vida reproductiva adulta. La subnutrición es uno de los factores que pueden intervenir en la programación fetal, actuando en los procesos de diferenciación de los tejidos, formación de gónadas y en el establecimiento de sistemas enzimáticos, alterando la función posterior de los órganos (Rhind y col., 2001). La subnutrición materna juega un rol fundamental en la programación de la capacidad reproductiva de las crías. Una dieta materna hipocalórica e hipoproteica produce una disminución del peso testicular y un retardo en la pubertad de las crías (Zambrano y col., 2014).

1.2. Espermatogénesis

La espermatogénesis consta de una secuencia de eventos citológicos que ocurren en el túbulo seminífero del testículo que resultan en la formación de un espermatozoide maduro. La producción de espermatozoides es continua durante la vida del animal (Kerr y col., 2006).

1.3. Proteínas de shock térmico (HSPs)

Las HSP son llamadas también chaperonas moleculares ya que protegen a las proteínas de la agregación, facilitan su correcto plegado y median en la degradación proteica. Regulan la homeostasis celular y la citoprotección interviniendo tanto en procesos fisiológicos como fisiopatológicos (Parsell & Lindquist 1993; Macphee 2017). En los mamíferos las HSPs se agrupan según su peso molecular. En este estudio nos focalizaremos en la HSP90, de las cuales existen dos isoformas HSP90 α y HSP90 β , que forman parte del 1-2% de las proteínas citosólicas en condiciones normales. Su nivel de expresión puede verse aumentado en casos de estrés (Lanneau y col., 2008).

1.4. Rol de las HSPs en la espermatogénesis

Las HSPs regulan el proceso de apoptosis durante la espermatogénesis con el fin de mantener una población adecuada de células germinales y eliminar espermatozoides anormales (Ji y col., 2012). Durante el proceso de espermatogénesis los pasos de transformación y diferenciación celular se ven acompañados por la expresión de las HSPs. (Neuer y col., 2000). Se ha visto una marcada expresión de HSP90 en diferentes fases de la espermatogénesis en testículos de ratas (Purandhar y col., 2014).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso complejo que involucra la producción de espermatozoides a partir de las células germinales primordiales (Gilbert 2007). Como resultado de la espermatogénesis se obtiene una célula altamente diferenciada tanto en estructura como en su función, que luego al fecundar un ovocito comenzará el proceso que dará lugar a un nuevo ser (Kerr y col., 2006). El inicio de este proceso tiene lugar previo a la pubertad continuándose durante toda la vida del animal (De Rooij & Russell 2000; Ross & Pawlina 2012). Es considerada como un evento único y complejo que involucra en su inicio a la división de las células madres espermatogonias y termina con diferenciación celular que finaliza con la formación de espermatozoides maduros (Kretser y col., 1998; Kerr y col., 2006). La espermatogénesis en ratas tiene una duración de 65 días (Hermo y col., 2010). En el epitelio seminífero de ratas se puede encontrar 14 posibles asociaciones celulares que se encuentran en diferentes fases del desarrollo para formar los espermatozoides. La secuencia completa de los 14 estadios constituye un ciclo del epitelio seminífero (Kerr y col., 2006) Dicha clasificación se basa principalmente en la formación del acrosoma de las espermátidas. El ordenamiento de asociaciones celulares a lo largo del túbulo seminífero es denominado onda del epitelio seminífero (Lagarrigue y col., 2011) (Figura. 1).

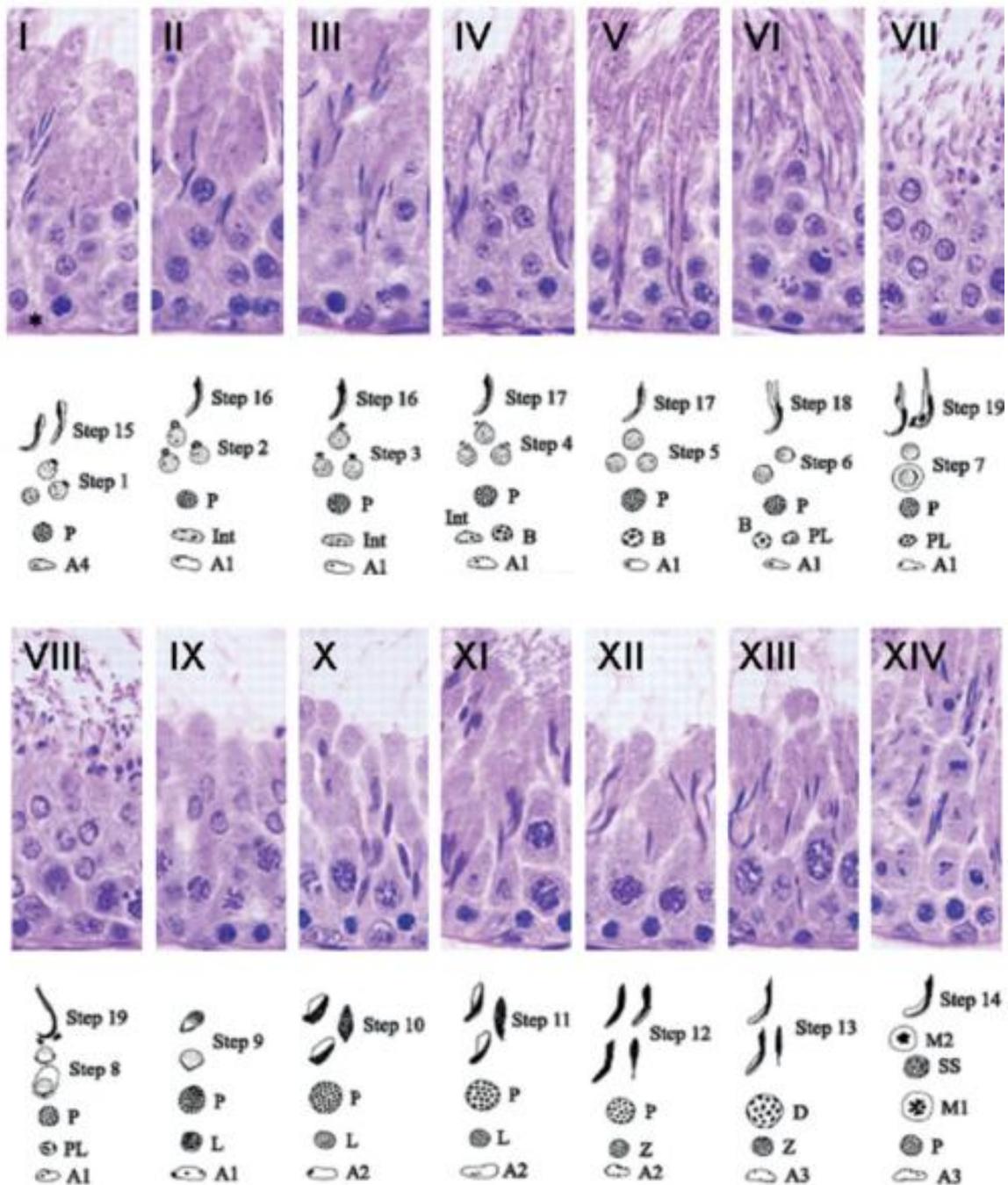


Figura1. Imágenes histológicas de secciones de túbulos seminíferos que representan los 14 estadios del ciclo del epitelio seminífero de la rata (representados con número romanos I-XIV) en base a las posibles asociaciones de células germinales. Adaptado de Lagarrigue 2011.

2.1.2. Fases de la espermatogénesis

La espermatogénesis incluye tres fases principales, la multiplicación de células madre espermatogonias (espermatocitogénesis), la meiosis y la espermiogénesis (Gartner & Hiatt 2011).

2.1.2.1. Espermatocitogénesis

En la fase de espermatocitogénesis ocurre la diferenciación de espermatogonias a espermatocitos primarios. Dichas espermatogonias se encuentran localizadas en el compartimiento basal del epitelio seminífero, son células germinales diploides que se dividen por mitosis, para formar más espermatogonias y espermatocitos primarios (Gartner & Hiatt 2011).

2.1.2.2. Meiosis

Durante la meiosis I, la profase I de la primera división meiótica está formada por 4 etapas definidas como leptoteno, cigoteno, paquiteno, diacinesis. Los cromosomas de los espermatocitos primarios comienzan a condensarse durante la fase de leptoteno, formando filamentos largos. Durante el cigoteno los cromosomas forman pares con sus homólogos. En paquitenos se observan cromosomas gruesos y cortos, se reconocen como tétradas. El entrecruzamiento de cromosomas homólogos ocurre durante la diacinesis, dando origen a las variaciones genéticas únicas de cada gameto. Durante la metafase I los cromosomas pares se alinean en la placa ecuatorial. Luego durante la anafase I los cromosomas migran a los polos opuestos de las células. Por último, durante la telofase I las células hijas se separan aunque permanece un puente citoplasmático para formar 2 espermatocitos secundarios que iniciarán la meiosis II (Gartner & Hiatt 2011). Durante la meiosis II, meiosis reduccional, se obtienen 2 células hijas, espermatidas haploides. A medida que cada célula se divide para formar 2 células hijas, permanece un puente citoplasmático entre ambas que conserva unidas entre sí a las células recién formadas, dando como resultado la formación de un sincitio de células. Esta conexión permite que las células germinales se comuniquen unas con otras y en consecuencia, sincronicen sus actividades.

2.1.2.3. Espermiogénesis:

En las fases postmeióticas se produce el proceso de espermiogénesis donde ocurre la diferenciación de las espermatidas en espermatozoides maduros. Dicho proceso de diferenciación consta de cuatro fases: 1) Fase de Golgi: los gránulos proacrosómicos del complejo de Golgi se fusionan formando los gránulos acrosómicos dentro de vesículas acrosómicas. 2) Fase del casquete: las vesículas acrosómicas se expanden convirtiéndose en el casco del polo anterior del núcleo y el complejo de Golgi se reduce y desplaza en dirección caudal. 3) Fase acrosómica: el núcleo adquiere mayor densidad y se elonga. El acrosoma se extiende sobre el núcleo y el gránulo acrosómico lo ocupa por completo. La célula se elonga y se orienta quedando la cabeza incluida en el receso citoplasmático apical de la célula de Sertoli y la cola en dirección a la luz tubular. 4) Fase de maduración: desarrollo de las partes media, principal y terminal en el cordón espermático de la cola. Por último se produce la liberación del espermatozoide a la luz tubular, desprendiéndose de la mayor parte del citoplasma que queda formando los cuerpos residuales (Dellman 1999).

2.1.3. Regulación de la espermatogénesis

La espermatogénesis está regulada mediante hormonas, como ser, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) secretadas por la hipófisis (Saribek y col., 2006). Localmente también se encuentra regulada por factores hormonales como son las hormonas esteroideas principalmente los andrógenos sintetizados por las células intersticiales de Leydig, y por los estrógenos sintetizados por las células de Sertoli (Bielli 2002). Asimismo la regulación de la espermatogénesis está dada por la interacción entre diversos factores sintetizados por las células las células de Sertoli y enviadas a las células germinales (Griswold 1995), a través de interacciones parácrinas (Kerr y col., 2006).

La testosterona juega un rol fundamental en el proceso de espermatogénesis, ya que se ha visto que una ausencia de ésta o sus receptores produce infertilidad en machos. Los receptores de andrógenos se encuentran en células de Leydig, células mioideas peritubulares y en células de Sertoli. En la rata, la localización de estos receptores a nivel de las células de Sertoli es baja y difícil de detectar excepto durante los estadios VI-VIII del epitelio seminífero donde los niveles aumentan dramáticamente. La testosterona es clave para que las células germinales culminen los procesos de meiosis, mantener la unión de células germinales a las células de Sertoli y para la espermiación, donde los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo seminífero (estadio VIII) y también juega un rol fundamental en la integridad de la barrera hematotesticular. (Walker 2011).

2.2. Histología de los túbulos seminíferos.

2.2.1. Epitelio seminífero

Los túbulos seminíferos están formados por un epitelio seminífero estratificado complejo que se encuentra rodeado por una lámina propia (Gartner & Hiatt 2002). Las células de Sertoli y células germinales (espermatogonias, espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides) son los tipos celulares que constituyen en epitelio seminífero (Geneser. & Brüel 2015) (Figura 2).

2.2.1.1. Células de Sertoli

Las células de Sertoli, también llamadas células sustentaculares o de sostén fueron descritas por primera vez en 1865 (Griswold 1995). Participan en la nutrición y poseen funciones fisiológicas esenciales para el desarrollo de las células germinales. Están constituidas por prominentes manojos de filamentos lo que confiere rigidez estructural a la región e interviene en la regulación del movimiento de células y fluidos. Son células cilíndricas altas que se extienden perpendicularmente a través del epitelio seminífero, desde la membrana basal hacia la luz del túbulo, posee ramificaciones citoplasmáticas que rodean las células germinales, que se asemejan a las ramas de un árbol. Su núcleo es largo e irregular y se encuentra hacia la zona basal de la célula. En los roedores la forma y posición del núcleo varia acorde a la etapa del ciclo espermatogénico. La interacción célula - célula es de gran importancia en la espermatogénesis, el desarrollo de las células germinales depende de la asociación y comunicación con la célula de sostén. Una célula de Sertoli se encuentra en constante contacto con la membrana basal y aproximadamente otras seis células de Sertoli y con cinco a seis diferentes tipos de células germinales que se encuentran en diferentes fases del desarrollo. La base de la célula de Sertoli se encuentra en contacto directo con la matriz extracelular de la lámina basal que rodea el túbulo a través de los hemidesmosomas, que son filamentos intermedios. Las uniones inter - Sertoli forman la base de la barrera hemoato-testicular, separan a las células germinales de la sangre y sistema linfático que se encuentra en el intersticio y permite la regulación de la composición del compartimiento adluminal (O'Donnell y col., 2006).

2.2.1.2. Espermatogonias

Las células madres espermatogonias, son células diploides que sufren divisiones mitóticas dando como resultado un pool de células a partir de las cuales se realiza el proceso de meiosis. Dichas espermatogonias se encuentran apoyadas sobre la membrana basal del túbulo seminífero (O'Donnell y col., 2006). Poseen funciones de diferenciación y autorenovación (De Rooij & Russell 2000). Las espermatogonias se diferencian en seis tipos sucesivos: A₁, A₂, A₃, A₄, Intermedia (In) y B. La identificación del tipo celular se hace en base a la distribución de la cromatina. A medida que van madurando van adquiriendo más cromatina y reduciendo el tamaño nuclear (De Rooij & Russell 2000; Hermo y col., 2010).

2.2.1.3. Espermatocitos

Los espermatocitos ingresan a meiosis, sufriendo primero una etapa donde se duplica el material génico (meiosis I) y luego una etapa de meiosis II reduccional. En el proceso de meiosis se produce una reducción en la cantidad de cromosomas y contenido de ADN, obteniéndose células haploides, llamadas espermátidas (Ross & Pawlina 2012).

2.2.1.4. Espermátidas

Las espermátidas redondas son células haploides, redondeadas de 8 micras de diámetro. Las espermátidas elongadas, se reordenan y reducen el número de sus organelos, desarrollan flagelos, y se elimina parte de su citoplasma (Gartner & Hiatt, 2011).

2.2.1.5. Espermatozoides

Los espermatozoides están constituidos por una cabeza, un cuello y una cola. En la región de la cabeza es donde se localiza el núcleo condensado, heterocromático. Además en la región de la cabeza del espermatozoide se localiza el acrosoma, que rodea al núcleo, y contiene numerosas enzimas incluidas la neuraminidasa, hialuronidasa, fosfatasa ácida, arilsulfatasas y acrosina (Gartner & Hiatt 2011). El cuello es muy corto, posee un centriolo proximal, se encuentra rodeado por un cúmulo de citoplasma residual, denominado gota citoplasmática (Geneser & Brül 2015). La cola podemos subdividirla en 3 regiones: pieza intermedia, principal y terminal (Gartner & Hiatt 2011).

2.2.2. Lámina propia

También llamado tejido peritubular se encuentra formado por capas de células mioideas. Poseen función contráctil, lo que contribuye a mover los espermatozoides y el líquido testicular hacia las vías espermáticas (Ross & Pawlina 2012).

2.2.3. Tejido intersticial (intertubular)

Los túbulos seminíferos se encuentran separados por un espacio que se encuentra formado por vasos sanguíneos, células de Leydig y otros tipos celulares. Encontrándose también el sistema de canales linfáticos. El tejido intersticial es fundamental para el movimiento de hormonas y nutrientes hacia dentro y fuera del testículo (Ross & Pawlina 2012).

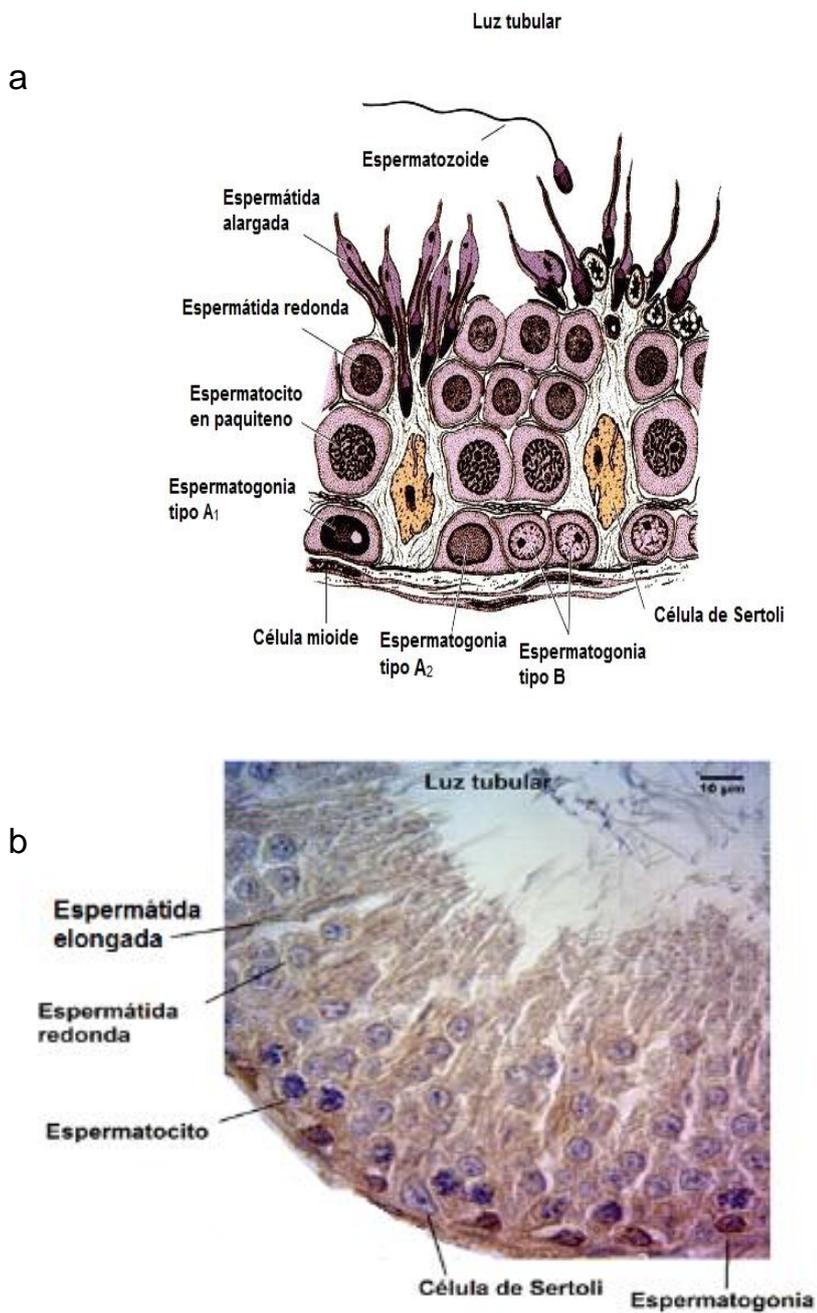


Figura 2. Imágenes representativas de la histología testicular de una sección de túbulo seminífero. Donde se observan las células germinales y somáticas. a. Esquema representativo de sección de túbulo seminífero de humano adaptado de Gilbert et al 2006. b. Imagen histológica de sección de túbulo seminífero de una rata adulta normal. Magnificación total 400 aumentos, Barra e escala = 10µm

2.3. Proteínas de shock térmico (HSP)

El científico italiano Ferruccio Ritossa en el año 1960 fue quien descubrió las proteínas de shock térmico cuando se encontraba estudiando la síntesis del ácido nucleico en las glándulas salivales de la mosca *Drosophila melanogaster*. Debido a una equivocación en la elevación de la temperatura de incubación, se observó una increíble actividad transcripcional, como nuevas formaciones proteicas. Este hallazgo lo motivó a seguir estudiando dichas proteínas (De Maio y col., 2012).

Se encuentran en prácticamente todos los organismos vivos desde las bacterias hasta los seres humanos (Purandhar y col., 2014).

Son también llamadas proteínas del estrés. Poseen función citoprotectora y se comportan como chaperonas moleculares para otras proteínas celulares. Cuando ocurre un estrés crónico o agudo se activa una señalización inapropiada, debido al mal plegamiento o agregación de las proteínas y disrupción de los complejos reguladores, y dichas chaperonas a través de sus propiedades en la homeostasis de las proteínas intentan restablecer el equilibrio (Lanneau y col., 2008).

Las HSPs promueven la supervivencia celular manteniendo la integridad estructural y funcional de las proteínas cliente, que regulan la supervivencia, proliferación y apoptosis celular (Saribek y col., 2006).

Algunos de los factores que intervienen en la inducción de las HSP son la hipertermia, estrés oxidativo, inflamación, daño celular, hipoxia, isquemia y agotamiento de la energía celular (Purandhar y col., 2014).

Algunas HSPs se expresan en condiciones normales, sugiriendo que también pueden desempeñar un rol en el normal desarrollo (Ohsako y col., 1995).

Las HSPs se clasifican en dos grupos según su tamaño molecular, en alto y bajo peso molecular, en el grupo de alto peso molecular se encuentran incluidas las HSP90, HSP70 y HSP60 que son las más estudiadas (Lanneau y col., 2008; Purandhar y col., 2014).

2.3.1. HSP90

HSP90 es una de las chaperonas moleculares más abundantes y esenciales en las células eucariotas. Interviene en la maduración final de determinadas proteínas cliente, como ser las proteinquinasas, factores de transcripción y receptores hormonales esteroideos. También participa en diversos procesos celulares como transducción de señales, transporte intracelular y degradación de proteínas (Li & Buchner 2012).

HSP90 interviene en los procesos de homeostasis celular, regulación transcripcional y reparación de ADN (Pennisi y col., 2015).

HSP90 constituye el 1-2% del total de las proteínas celulares en condiciones normales (Lanneau y col., 2008). Se encuentra en su mayoría en el citoplasma celular aunque puede translocarse hacia el núcleo en condiciones de estrés (Taipale y col., 2010).

Se encuentra expresada en gran cantidad en células eucariotas normales y en células tumorales (Saribek y col., 2006).

HSP90 α y HSP90 β son las dos isoformas principales que se encuentran en el citoplasma de las células de los mamíferos. La HSP90 α se expresa bajo condiciones de estrés, mientras que HSP90 β se expresa constitutivamente (Li & Buchner 2012).

HSP90 α responde expresándose rápidamente como isoforma citoprotectora, mientras que HSP90 β actúa a largo plazo en la adaptación celular y facilitando la evolución celular. HSP90 β regula funciones celulares normales como el mantenimiento de la arquitectura celular, diferenciación y citoprotección (Sreedhar y col., 2004).

Es un homodímero y cada protómero contiene tres regiones enlazadas flexibles, un N-terminal ATP-dominio de unión (Dominio-N), un dominio medio (Dominio-M) y un dominio de dimerización C-terminal (Dominio-C) (Li & Buchner 2012) (Figura 3).

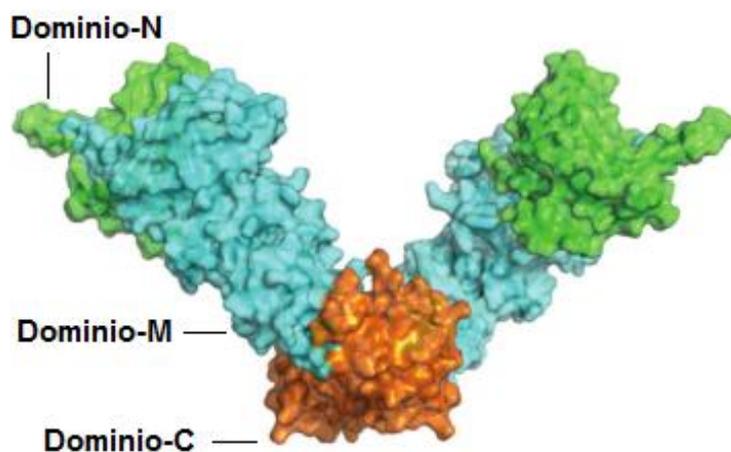


Figura 3. Ilustración donde se muestra la conformación tridimensional de la proteína de Shock Térmico HSP90, indicando sus tres dominios (N, M y C). Adaptado de (Li & Buchner 2012).

La proteína HSP90 β es codificada en ratas por el gen Hsp90b1 que se localiza en el cromosoma 7: 27, 226,569-27,240,533, y posee dos transcritos, HSP90b1-202 que se encuentra formado por 3168 pares de bases y 643 aminoácidos, y HSP90b1-201 formado por 2799 pares de bases y 804 aminoácidos.

La expresión del gen fue estudiada en ratas en diferentes tejidos, como ser glándula adrenal, cerebro, colon, riñón, hígado, pulmón, musculo esquelético (gastrocnemio), bazo, testículo, timo y útero (Ensembl).

2.3.1.1. HSP90 en testículo

Una sobre expresión de HSP90 β fue observada en la línea de células germinales en etapas tempranas del desarrollo, sugiriendo que dicha proteína es necesaria para el desarrollo embrionario temprano (Sreedhar y col., 2004).

Las HSPs regulan la apoptosis durante la espermatogénesis, ya sea tanto por efectos anti-apoptóticos como pro-apoptóticos. Manteniendo así una cantidad adecuada de células germinales y de Sertoli y eliminando espermatozoides anormales. De esta manera se asegura la supervivencia y se previene el desarrollo defectuoso en la próxima generación (Ji y col., 2012).

La HSP90 fue observada en las células que intervienen en el proceso de espermatogénesis normal del ratón, a nivel del citoplasma, y en menor medida en el núcleo. Luego de un shock térmico la HSP90 se incrementa y parte se relocaliza en el núcleo (Biggiogera y col., 1996).

2.4. Subnutrición como factor de programación fetal

La nutrición materna juega un rol crítico en el crecimiento y desarrollo fetal.

El ambiente intrauterino es uno de los factores determinantes del crecimiento fetal. La subnutrición durante la gestación reduce el crecimiento fetal y placentario. Existe evidencia que durante el período de pre-implantación y el periodo de rápido desarrollo placentario el crecimiento fetal es más vulnerable a la deficiencia nutricional en la madre (Wu y col., 2004).

El ambiente intrauterino puede modificar el genoma fetal y dar consecuencias de por vida. Este fenómeno es llamado programación fetal, que ha llevado a la teoría del “origen fetal de las enfermedades en adultos” (Barker & Clark 1997).

Las alteraciones en la nutrición fetal y estatus endócrino pueden resultar en una adaptación del desarrollo permanente, como cambios de estructura, fisiología y metabolismo de las crías, predisponiendo a sufrir enfermedades metabólicas, endocrinas y cardiovasculares en los adultos. El estatus nutricional de la madre puede alterar el estado epigenético del genoma fetal e imprimir la expresión génica (Wu y col., 2004).

El feto detecta el entrono adverso y reprograma el genoma, favoreciendo la supervivencia inmediata pero predispone a enfermedades metabólicas en la vida adulta. El desarrollo de estas enfermedades depende del grado de desajuste en el ambiente pre y post-natal. Una restricción calórica moderada o grave, da como resultado un menor peso corporal, hiperfagia y alteraciones metabólicas como adiposidad, hipertensión, hiperinsulinemia, hiperleptinemia y expresión genética alterada (Lakshmy 2013).

Los embriones tienen la capacidad de responder a las influencias ambientales como ser el shock térmico sintetizando proteínas protectoras de shock térmico a través de la transcripción de nuevo ARN mensajero (Rhind y col., 2001).

Se puede manipular el desarrollo embrionario y fetal en diferentes etapas, se debe considerar la etapa de la gestación en la que ocurre la diferenciación de los tejidos y desarrollo de procesos específicos para determinar el momento en que puede ocurrir la programación fetal. Por ejemplo si se produce la subnutrición durante un período en que un órgano, y sus tipos celulares se han desarrollado no será afectado por dicho tratamiento, pero si se ve afectado si ocurre en células madre (Rhind y col., 2001).

Estudios previos demostraron un retraso en el desarrollo del sistema reproductivo y una disminución de la fertilidad en el número de espermatozoides en animales expuestos a dietas bajas en proteína durante la preñez y/o lactación sobre el desarrollo del sistema reproductivo en ratas macho. Las consecuencias no fueron vistas en la vida post-natal temprana, sino que se demostró luego de los 70 días de vida. Se encontró que el mayor efecto persistente en el crecimiento testicular fue debido a la restricción alimentaria de la madre en el periodo de lactación, esto coincide con la temporización postnatal de la división celular y el crecimiento en ratas (Zambrano y col., 2005).

Por lo anteriormente expuesto, la subnutrición en períodos claves del desarrollo afecta la reproducción en machos. Sin embargo resta por dilucidar muchas interrogantes de los mecanismos intratesticulares que regulan dichas alteraciones.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los efectos de la subnutrición materna sobre la expresión de las proteínas de shock térmico en el proceso de espermatogénesis.

Objetivos específicos

- 1) Describir la localización de la inmunomarcación de HSP90 β en células del parénquima testicular específicamente en espermatogonias, espermatocitos, espermátidas, espermatozoides adultos y células de Sertoli, cuyas madres fueron subnutridas en períodos de preñez, lactancia o preñez y lactancia.
- 2) Cuantificar la inmunoexpresión de HSP90 β en células del parénquima testicular de animales adultos cuyas madres fueron subnutridas en períodos de preñez, lactancia o preñez y lactancia.

4. HIPÓTESIS

La subnutrición de la madre durante la gestación y lactación afectan la expresión de la HSP90 β en el epitelio seminífero de ratas adultas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales

Se utilizaron ratas hembras Wistar adultas de 120 días de edad (n=24) que fueron apareadas con machos Wistar. Tanto los machos como las hembras fueron alimentados con la dieta estándar durante el período previo al apareamiento. Los animales fueron mantenidos en jaulas de a dos animales, con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad con libre acceso al agua.

5.2. Diseño experimental

El diseño experimental fue realizado en la Universidad Mc Master de Canadá y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Canadá.

Se realizó la formación de harenes y luego de confirmado el apareamiento, por citología vaginal exfoliativa, se establecieron 4 grupos de animales:

- 1- grupo control (CONT) de hembras mantenidas con dieta estándar durante la preñez y lactancia conteniendo un 18% de proteínas, un 5% de grasa y 3,4 kcal/gm energía digestible (2018 Fórmula comercial: Teklad Global 18% Protein Rodent Diet:, Harlan, Blackthorn, Bicester, UK),
- 2- grupo de hembras alimentadas con el 50% de la dieta control en preñez (UNP)
- 3- grupo de hembras alimentadas con el 50% de la dieta control en lactancia (UNL)
- 4- grupo de hembras alimentadas con el 50% de la dieta control durante preñez y lactancia (UNPL).

5.3. Obtención de muestras

Se obtuvieron crías macho (n=40) que fueron destetados al día 22, y luego alimentados con dieta control hasta el día 160 de vida. Al día 160 postnatal los animales machos fueron sometidos a ayuno durante la toda la noche, luego de ser anestesiados con pentobarbital sódico intraperitoneal se procedió a decapitarlos. (Figura4).

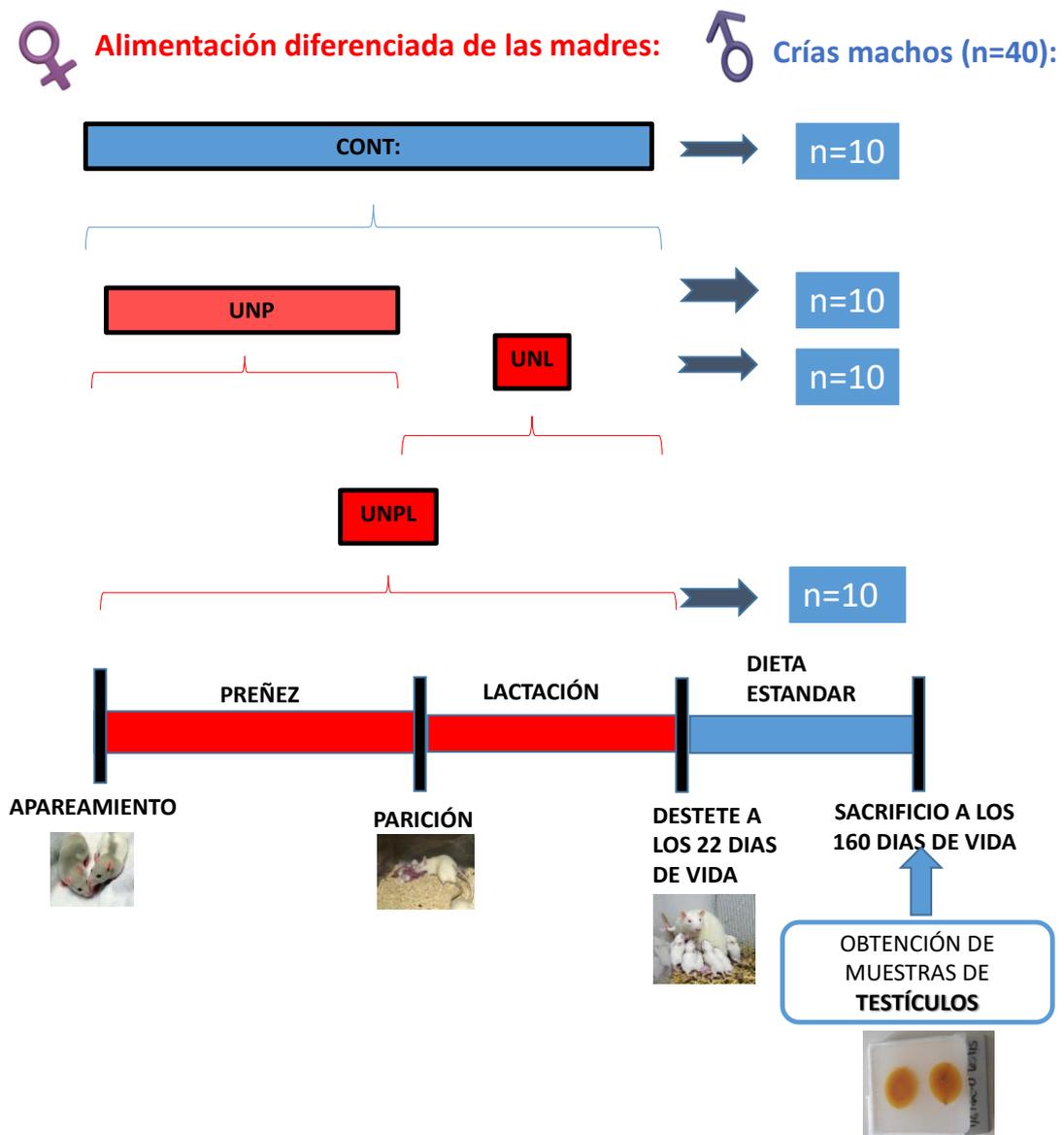


Figura 4. Diseño experimental. Esquema donde se describen los períodos de subnutrición materna. Las hembras preñadas fueron divididas al azar en 4 grupos: grupo control (CONT) que recibieron 100 % de la dieta estándar (proteína 18%, grasa 5%, energía digestible 3.4 kcal/gm), grupo subnutrido durante la preñez (UNP) recibió 50% de la dieta estándar, grupo subnutrido durante la lactación (UNL) recibió 50% de la dieta estándar y grupo subnutrido durante ambos períodos de preñez/lactancia (UNPL) recibió 50% de la dieta estándar.

5.4. Procesamiento histológico

Los testículos fueron disecados, pesados, cortados y fijados en solución de formaldehído durante 12 hs y sumergidos en concentraciones crecientes de etanol (70°, 96° y 100°), cloroformo, e incluidos e impregnados en parafina para la confección de los bloques.

5.4.1. Microtomía

Las siguientes etapas se realizaron en el Área de Histología y Embriología, Facultad de Veterinaria de Montevideo, Uruguay. Se realizaron cortes de 5 micrómetros de espesor en micrótopo (LeicaReichert Jung Biocut 2030, Wetzlar, Alemania). Se colocaron en un baño de flotación de agua corriente a 37°C. Luego se levantaron los cortes en portaobjetos. Se procedió al secado de las láminas en estufa para evitar el desprendimiento. Se obtuvieron cortes histológicos por testículo por cada animal.

5.5. Técnica de inmunohistoquímica

5.5.1. Preparación de soluciones buffer, alicuotado y dilución de anticuerpo

Para la realización de los ensayos de inmunohistoquímica se debió realizar previamente la preparación de soluciones buffer (PBS y Buffer citrato). Además, se realizó el alicuotado del anticuerpo en tubos eppendorf y stock en freezer a -20°C para ser utilizados posteriormente. Luego se llevó a cabo la dilución del anticuerpo, con una concentración final de 1/50 µl previo a la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

5.5.2. Ensayo de inmunohistoquímica

Se realizó el desparafinado de los cortes de testículo en estufa a 60° (15 minutos), inmersión en xilol (15 minutos); luego se hidrataron por inmersión en concentraciones crecientes de etanol (70°,95°,100°). Posteriormente se lavaron en PBS durante 5 minutos y se realizó la recuperación antigénica por calor en microondas con solución buffer citrato 0,01 M pH 6.0, durante 3 minutos a 100% de potencia. Nuevamente se lavó con PBS y luego se procedió a la inactivación de peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno al 3% (H₂O₂). Luego se incubaron los cortes por 18 horas a 4°C con anticuerpo primario monoclonal de ratón anti HSP90β (anti-HSP90β mouse monoclonal, No 37-9400, No 954681, A-Invitrogen, USA). Se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno con PBS y luego se colocó el anticuerpo secundario biotinilado (concentrado, volumen 10 ml, kit mouse monoclonal HRP/DAB, ab 64259 Abcam, USA) durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS y se colocó el complejo enzimático estreptavidina-peroxidasa (HRP/DAB detection Kit, ab 64259 Abcam, USA) 30 minutos y se lavaron con PBS, para luego realizar el revelado con solución de cromógeno de Diaminobencidina (DAB, 10 ml, HRP/DAB detection Kit, ab 64259, Abcam, USA) de 1 a 10 minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se agregó Hematoxilina de Mayer durante 30 segundos para la contracoloración. Luego se realizó el virado en agua corriente y la posterior deshidratación en concentraciones crecientes de etanol 70°, 95° y 100°. Por último se realizó el aclaramiento con xilol, montaje con entellan y se

colocó los cubreobjetos. Para verificar la especificidad de la técnica se realizaron controles negativos reemplazando el anticuerpo primario por suero normal.

5.6. Captura de imágenes de preparaciones de inmunohistoquímica

Las imágenes digitales se obtuvieron de los preparados histológicos mediante software de captura (DinoCapture 2,0 software, AnMoElectronics Corporation, Taiwan) de cámara digital (Dino-Eyepiece, AM-423X, AnMoElectronics Corporation, Taiwan) conectada a un microscopio (Binocular Premiere profesional, modelo MRP-5000, Manassas, USA.). Se capturaron 80 imágenes a 400 aumentos por testículos por cada animal (grupos control y tratados).

5.7. Análisis cuantitativo digital de imágenes

Se realizó el análisis cuantitativo de la inmunoexpresión de HSP90 β , en 80 imágenes de cortes transversales de túbulos seminíferos por animal (controles y tratados). Para ello se utilizó el software de análisis de imágenes ImageJ (Image J 1.43m, Wayne Rasband open Source, National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). El procesamiento de imágenes incluyó la segmentación, binarización, umbralización y creación de macros, automatizando de esta manera el procesamiento de cada imagen con los parámetros de intensidad de coloración marrón (DAB positivos) seleccionados/umbralizados previamente.

Se analizaron los siguientes parámetros de inmunoexpresión:

1. Área inmunomarcada total para la proteína HSP90 en el parénquima testicular. (%)

El área inmunomarcada total (%) se definió mediante una macro seleccionando el área donde se observó marcación DAB positiva, que se refiere a una marcación de color marrón claro a marrón oscuro (Figura 5-b). Los parámetros definidos por la macro se describen a continuación:

```
selectWindow("Hue");rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=42;
max[0]=213;
filter[0]="stop";
min[1]=33;
max[1]=211;
filter[1]="pass";
min[2]=67;
max[2]=162;
```

2. Área inmunomarcada para la proteína HSP90 con nivel de inmunoexpresión alto

Este nivel incluyó las regiones con marcación DAB positiva con un color marrón oscuro (Figura 5-c). Los parámetros definidos para dicha macro fueron los siguientes:

```
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=19;
max[0]=191;
filter[0]="stop";
min[1]=71;
max[1]=165;
filter[1]="pass";
min[2]=48;
max[2]=93;
```

3. Área inmunomarcada para la proteína HSP90 con nivel de inmunoexpresión moderado

Este nivel incluyó las regiones con marcación DAB positiva con un color marrón claro (Figura 5-d). Los parámetros definidos para dicha macro fueron los siguientes:

```
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=28;
max[0]=224;
filter[0]="stop";
min[1]=24;
max[1]=136;
filter[1]="pass";
min[2]=98;
max[2]=150;
```

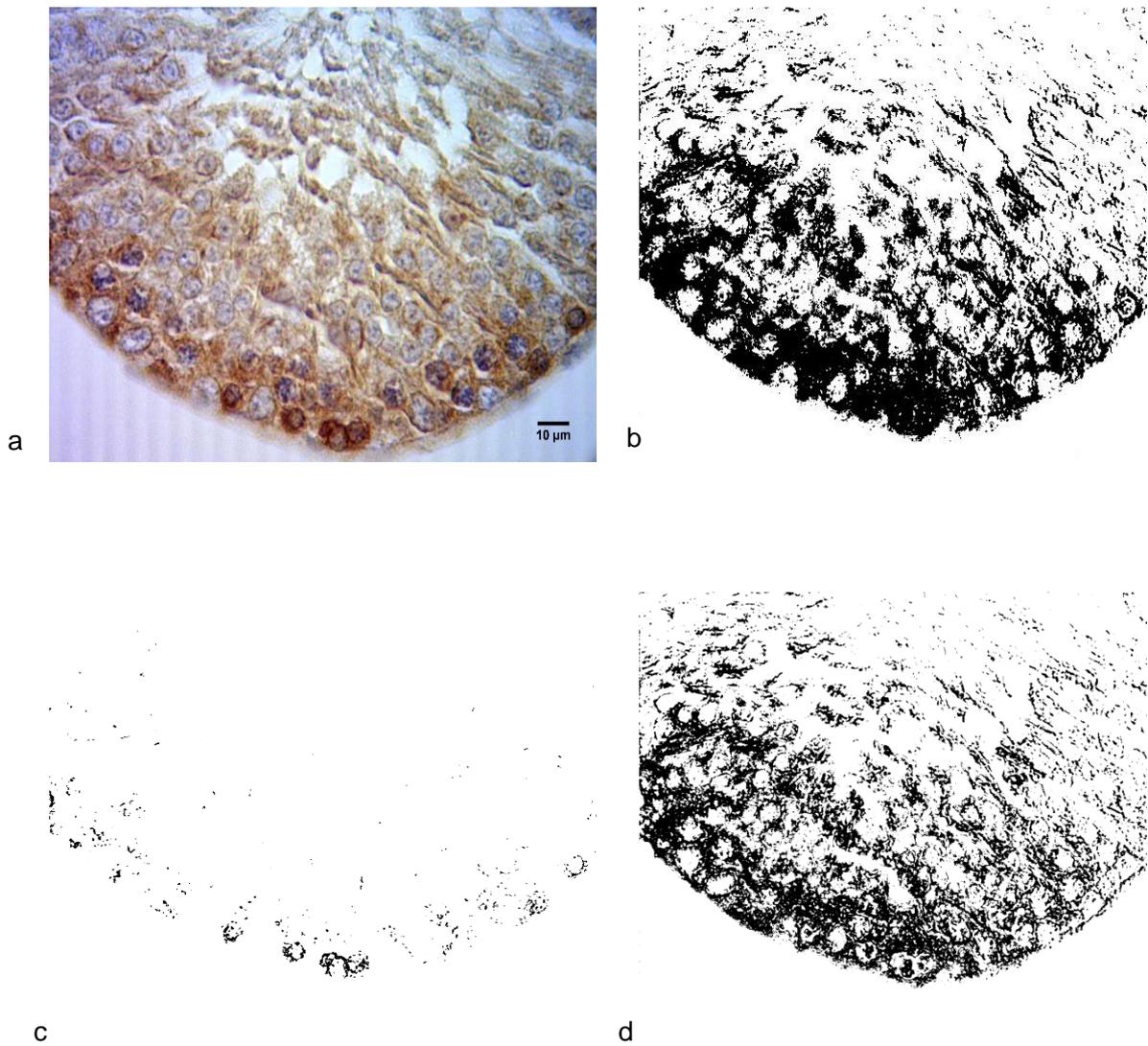


Figura 5. Imágenes representativas de secuencia de procesamiento para cuantificación de área inmunomarcada de HSP90 en túbulo seminífero de rata adulta. Imagen original (a), área inmunomarcada total (b), nivel de inmunomarcación alta (c) y nivel de inmunomarcación moderada (d). Magnificación total 400 aumentos, Barra e escala = 10µm.

5.8 Análisis estadístico

Se analizó el efecto de la subnutrición en diferentes momentos del desarrollo, sobre las variables analizadas que fueron las siguientes:

- 1) área inmunomarcada total en los túbulos seminíferos.
- 2) área inmunomarcada con nivel de inmunoexpresión alta
- 3) área inmunomarcada con nivel de inmunoexpresión moderada.

Todos los resultados fueron expresados como medias \pm e.e.m y fueron comparados mediante análisis de varianza (ANOVA) considerando en el modelo el efecto de momento de la subnutrición (preñez, lactación, preñez y lactación). Se utilizó el programa estadístico SAS (SAS; v. 9.1; SAS Institute Inc; Cary, NC, USA.). En todos los casos, el nivel de significación fue de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Resultados descriptivos de la inmunomarcación de HSP90 en el epitelio seminífero de rata

Dentro del espesor del epitelio seminífero se observó la expresión de la proteína de shock térmico HSP90 β tanto en el citoplasma de las células de Sertoli como en las células germinales, en estas últimas también se observó inmunomarcación a nivel nuclear.

6.1.1. Localización de la inmunomarcación de HSP90 en animales del grupo control

En los animales del grupo control, dentro de la línea germinal, observando desde la región peritubular hacia la luz, las espermatogonias presentan una marcada inmunoexpresión citoplasmática (Figura 6.a). Los espermatocitos presentan inmunomarcación citoplasmática de color marrón más tenue (figura 6.a). En cuanto a las espermátidas redondas mostraron inmunoexpresión a nivel de la formación del gránulo acrosómico, siendo dicha marcación de forma intensa en escasos cortes (Figura 6.b). En el momento en el cual las espermátidas se encuentran en el proceso de elongación presentaron inmunoexpresión nuclear y citoplasmática perinuclear (Figura 6.c). Hacia los últimos estadios (XII-XIII), donde las espermátidas darán origen a los espermatozoides, se observó escasa inmunomarcación a nivel nuclear de las mismas, en la luz tubular se observaron espermatozoides con escasa inmunomarcación. Por otro lado se observó inmunomarcación a nivel citoplasmático en células de Sertoli (Figura 6 d).

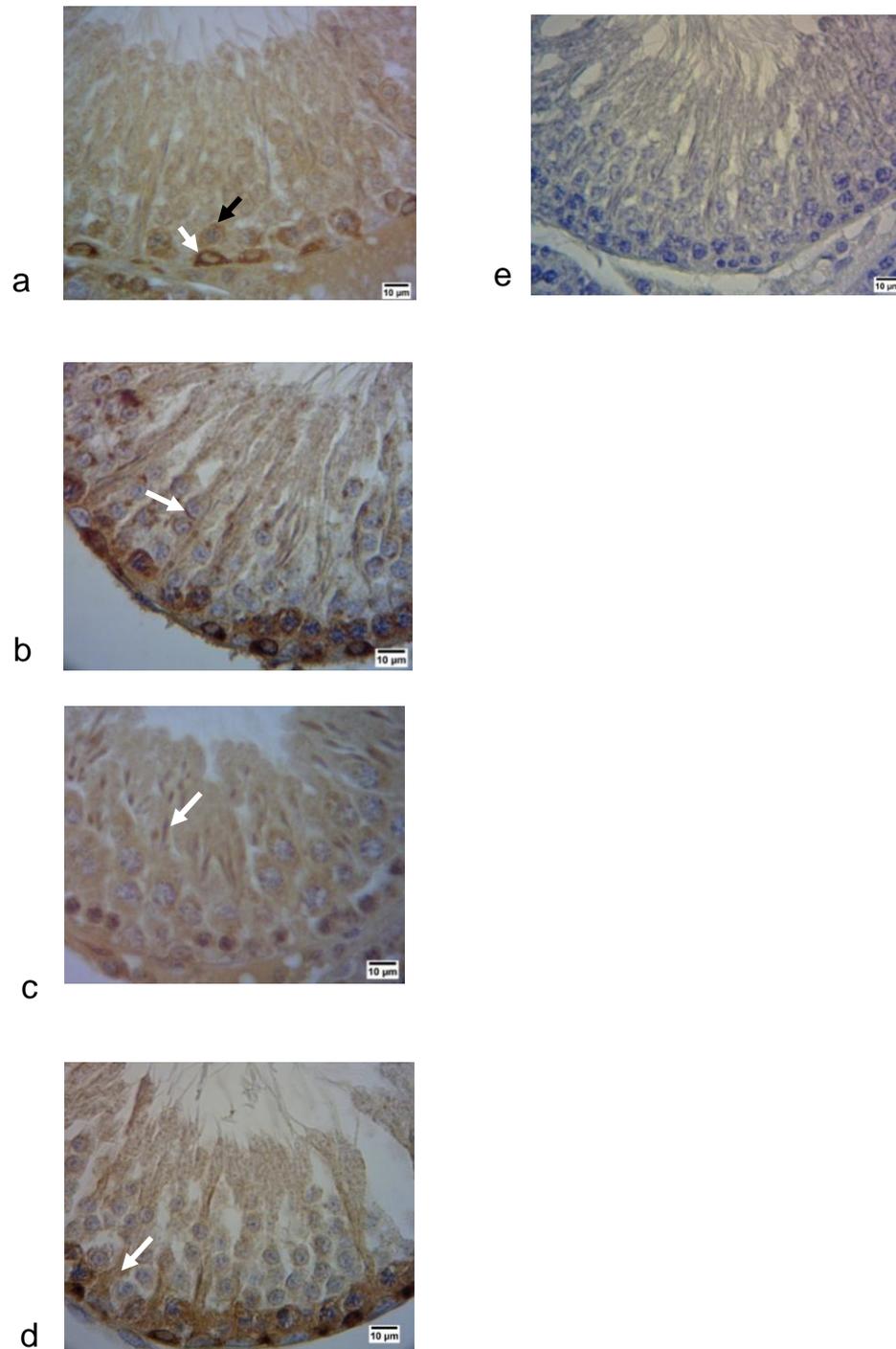


Figura 6. Corte transversal de secciones de túbulos seminíferos de rata adulta de grupo control. a. Observe la inmunomarcación intensa de HSP90 en citoplasma de espermatogonias (flecha blanca) e inmunomarcación menor a nivel citoplasmático de espermatocitos (flecha negra). b. Note inmunomarcación a nivel de gránulo acrosómico de espermatidas redondas (flecha blanca). c. Inmunomarcación nuclear de espermatidas en proceso de elongación (flecha blanca). d. Inmunomarcación citoplasmática en células de Sertoli (flecha blanca). e. Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Magnificación 400 aumentos. Barra de escala = 10µm.

6.1.2. Localización de la inmunomarcación de HSP90 en animales de grupos tratados

Con respecto a las células de la línea germinal, la inmunomarcación la proteína de shock térmico HSP90 β en testículos de animales subnutridos UNP, UNL y UNPL se localizó en todas las células de la línea germinal.

En animales subnutridos la inmunomarcación citoplasmática de las espermatogonias fue menor, observándose un color marrón más claro, en comparación al grupo control. A simple vista se observó una menor cantidad de espermatogonias en los animales de los grupos tratados (Figura 7.b, c y d).

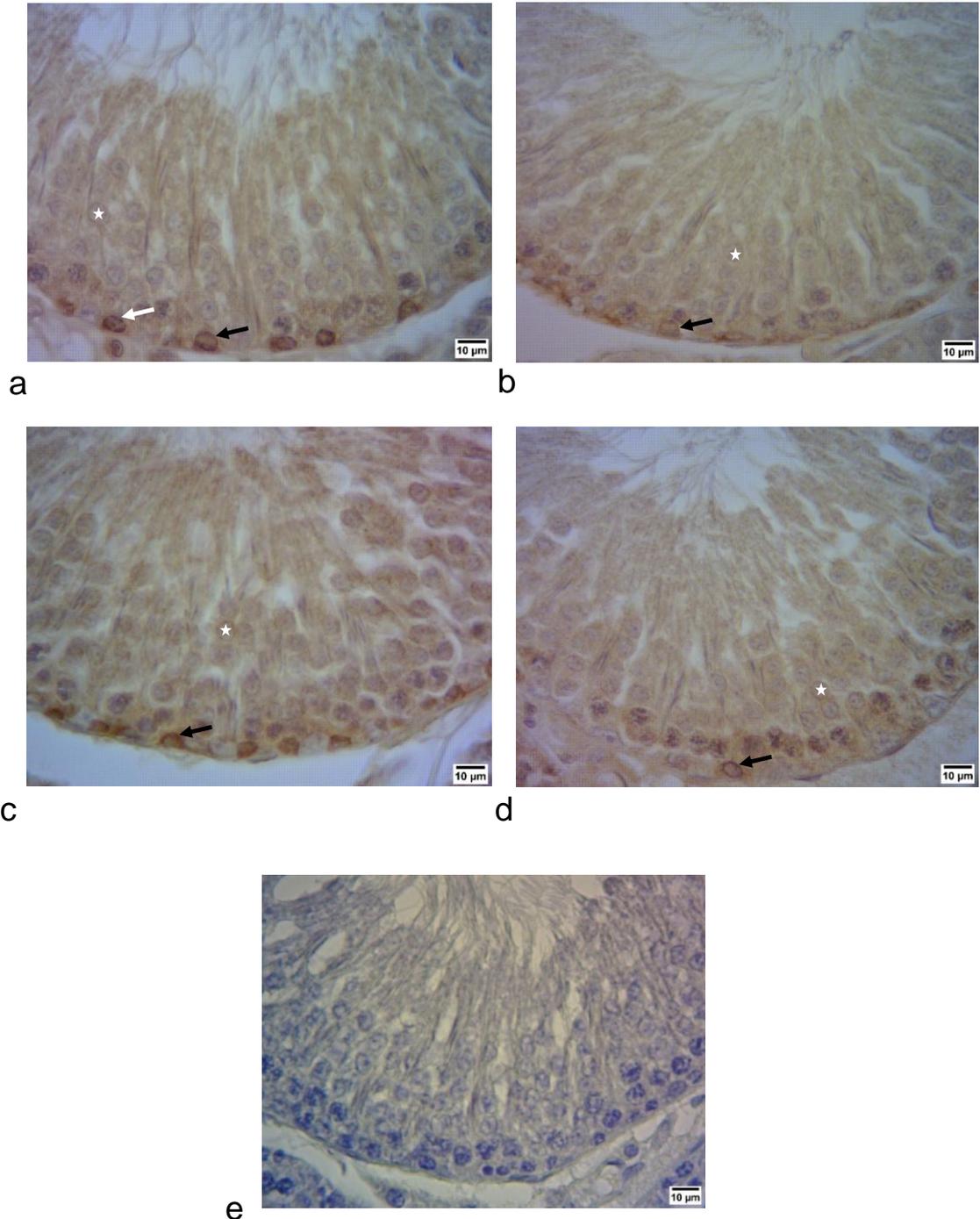


Figura 7. Imágenes histológicas de secciones de túbulos seminíferos de ratas adultas en estadio V del ciclo del epitelio seminífero, con técnica de inmunohistoquímica evidenciando la inmunomarcación de la proteína de shock térmico HSP90, en los diferentes grupos de tratamiento: a. Grupo control b. Grupo subnutrido en preñez, c. Grupo subnutrido en lactación, d. Grupo subnutrido en preñez y lactación . Se observan desde la lámina basal del túbulo seminífero hacia la luz del mismo espermatogonias tipo A (flecha negra) y tipo B (flecha blanca), espermatocitos en paquiteno, espermátidas redondas (estrella blanca) y alargadas. e. Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Magnificación 400 aumentos. Barra de escala = 10µm

Se evidenció inmunomarcación a nivel del gránulo acrosómico cuando se encuentra entre las fases de Golgi y de Casquete. Se notó intensa inmunomarcación en escasos túbulos del grupo subnutrido en lactación (Figura 8).

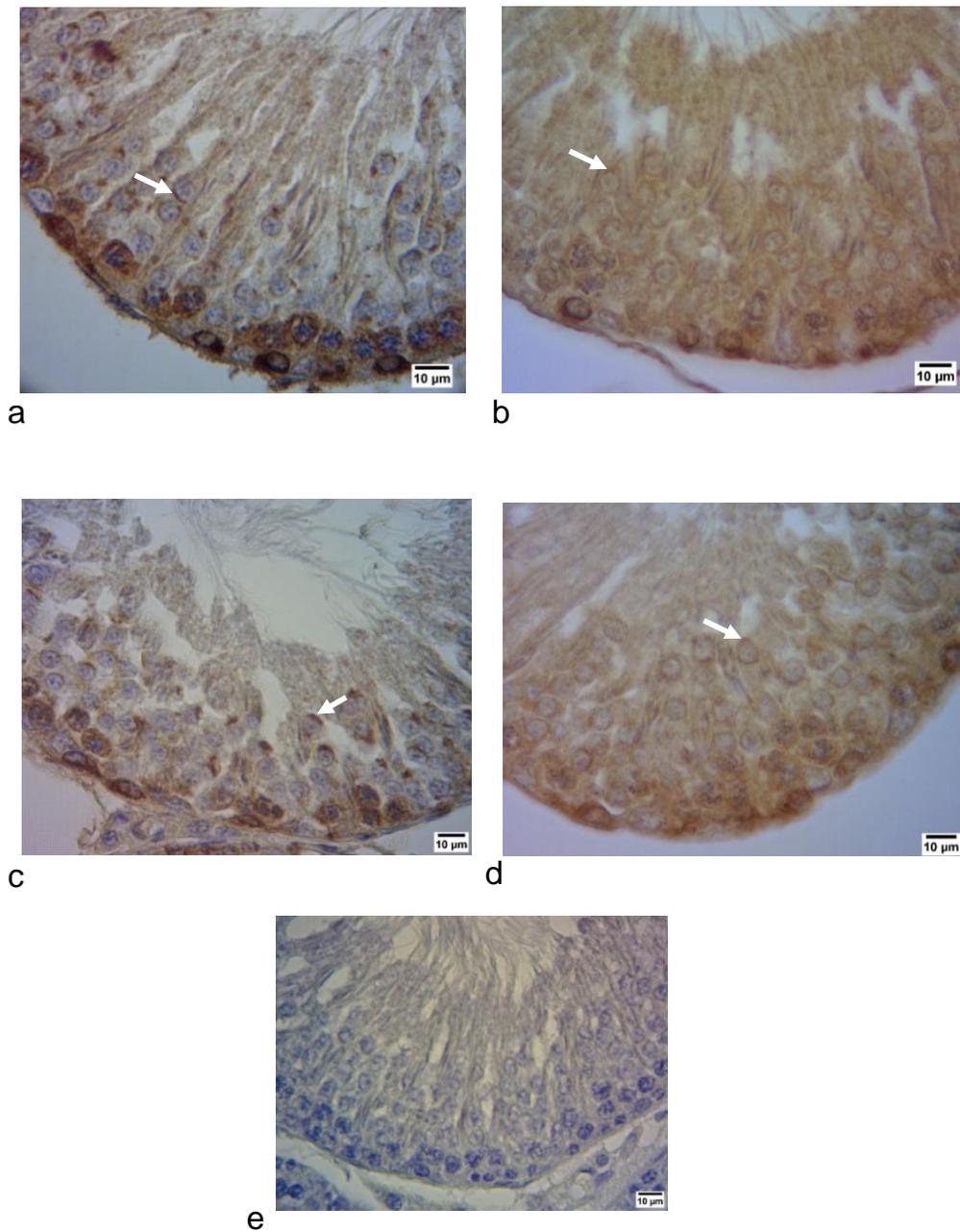


Figura 8. Imágenes histológicas de secciones de túbulos seminíferos en el estadio V del ciclo del epitelio seminífero de ratas adultas con técnica de inmunohistoquímica donde se denota la inmunomarcación de la proteína de shock térmico HSP90 en los diferentes grupos de tratamiento: a. Grupo control b. Grupo subnutrido en preñez, c. Grupo subnutrido en lactación, d. Grupo subnutrido en preñez y lactación. Se observan espermátidas redondas que se encuentran entre la fase de Golgi y de casquete (flechas blancas). En todos los grupos se evidencia la inmunomarcación de HSP90 a nivel de la formación del gránulo acrosómico en las espermátidas redondas, siendo marcado en los grupos control y subnutrido en lactación. Se observan desde la lámina basal del túbulo seminífero hacia la luz del mismo espermatogonias, espermatoцитos en paquiteno y espermátidas redondas. e. Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Magnificación 400 aumentos. Barra de escala = 10µm.

Sin embargo la inmunoexpresión con mayor intensidad en los animales subnutridos fue observada en espermatocitos en leptocigoteno y en espermatidas elongadas en la región nuclear, cuando el epitelio del túbulo seminífero se encuentra entre el estadio IX-X. (Figura 9.b, c y d).

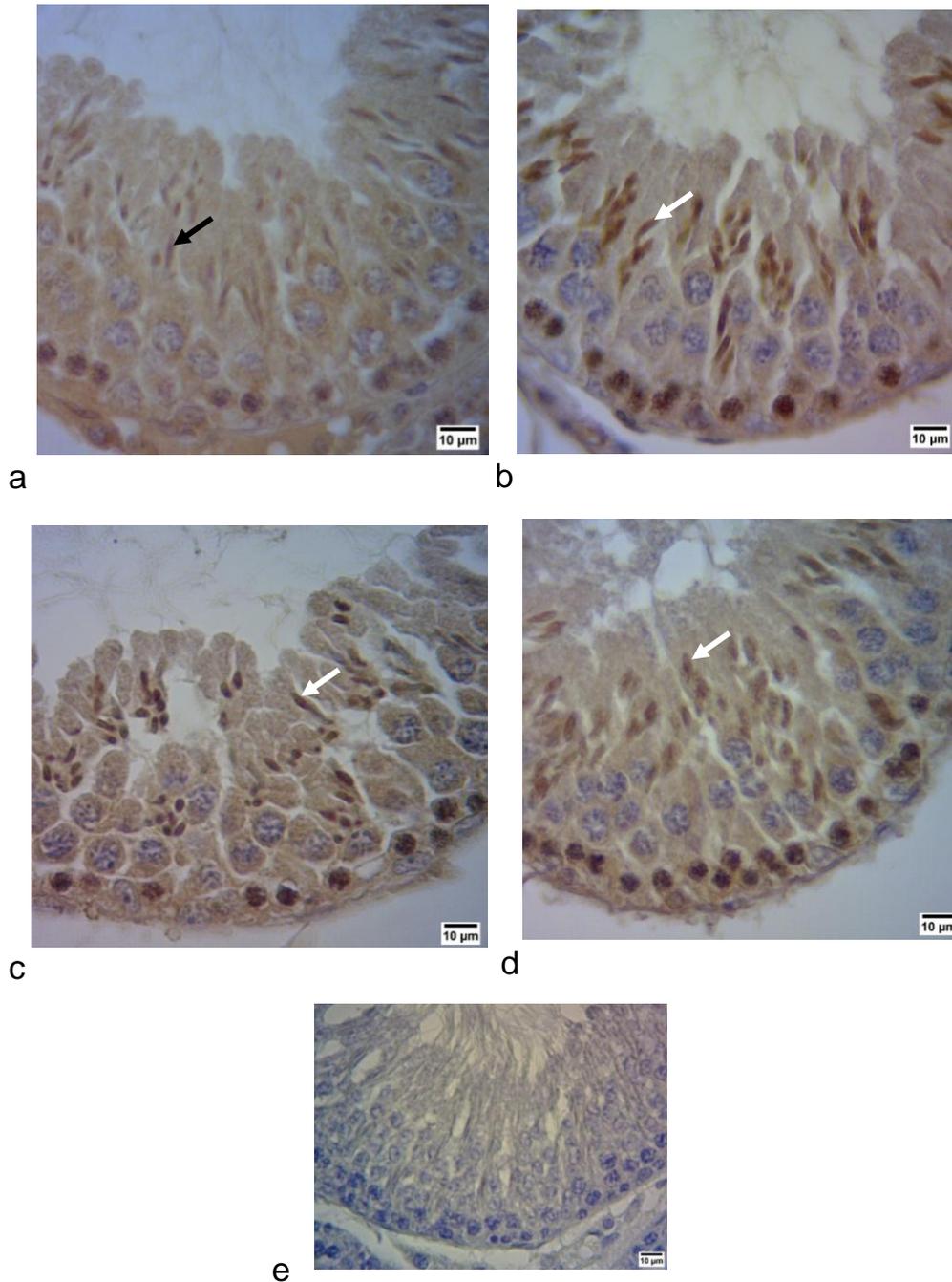


Figura 9. Imágenes histológicas de túbulos seminíferos de ratas adultas en estadio X-XI del ciclo del epitelio seminífero, con técnica de inmunohistoquímica evidenciando la inmunomarcación de la proteína de shock térmico HSP90. a. Grupo control b. Grupo subnutrido en preñez, c. Grupo subnutrido en lactación, d. Grupo subnutrido en preñez y lactación. e. Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Se observan desde la lámina basal del túbulo seminífero hacia la luz del mismo espermatocitos en leptocigoteno, espermatocitos en paquiteno y espermátidas en elongación. Observe que se localiza inmunomarcación a nivel nuclear de las espermátidas elongadas en todos los grupos. En todos los grupos subnutridos la inmunomarcación es intensa en espermátidas (flechas blancas), sin embargo en el grupo control la intensidad es menor (flecha negra). Magnificación 400 aumentos. Barra de escala = 10µm.

Por otro lado en las últimas fases del proceso de elongación de las espermátidas, previo a convertirse en espermatozoides, (estadio XI-XII), donde pierden la mayor parte de su citoplasma no se evidenció inmunomarcación nuclear, siendo los núcleos basófilos heterocromáticos. A nivel de la gota citoplasmática y células de Sertoli se ve menor expresión de HSP90 en los grupos subnutridos en comparación al control (Figura 10).

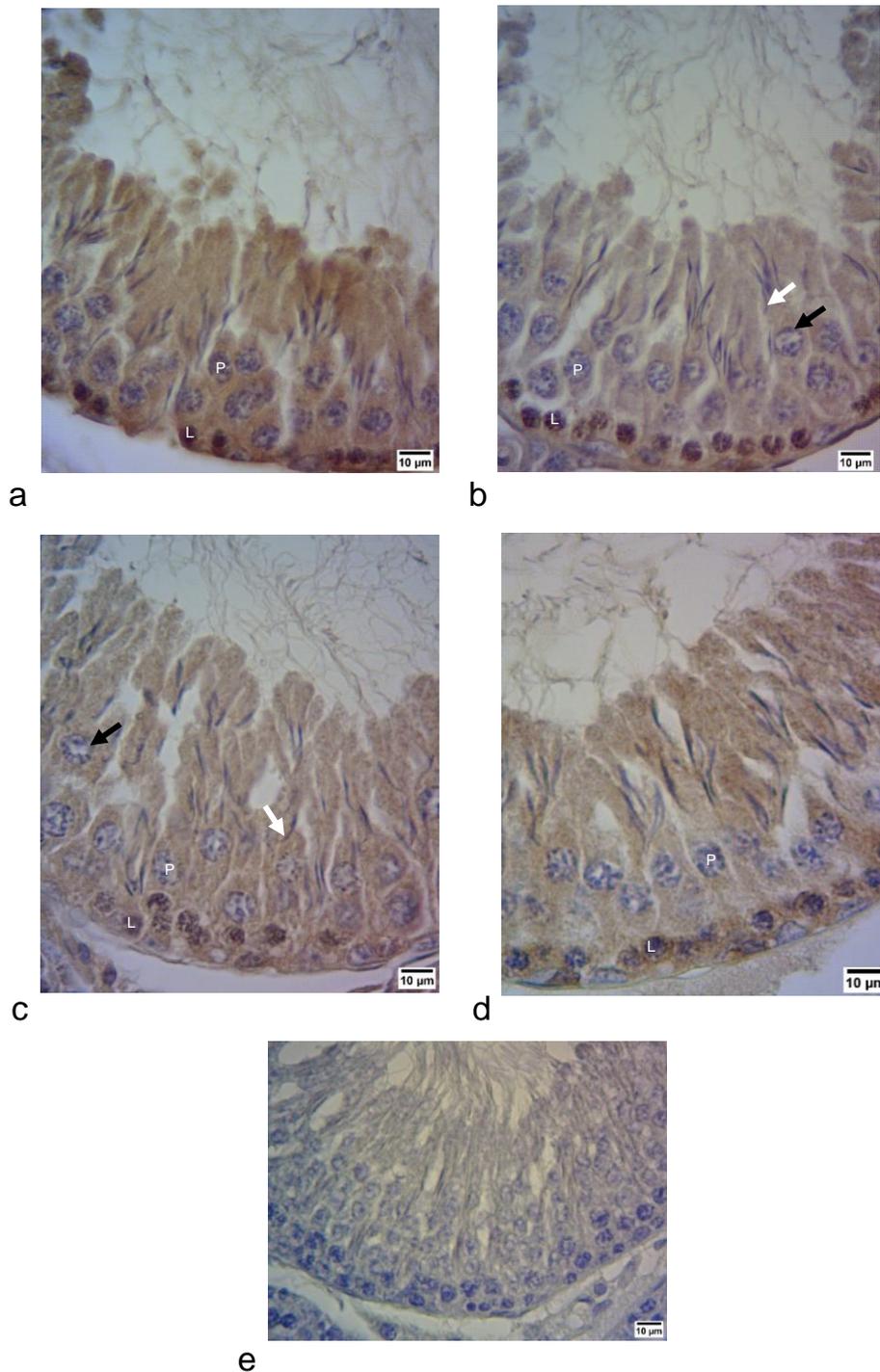


Figura 10. Imágenes histológicas de sección de túbulos seminíferos de ratas adultas en estadio XII-XIII del ciclo del epitelio seminífero, con técnica de inmunohistoquímica evidenciando la inmunomarcación de la proteína de shock térmico HSP90, en los diferentes grupos de tratamiento: a. Grupo control b. Grupo subnutrido en preñez, c. Grupo subnutrido en lactación, d. Grupo subnutrido en preñez y lactación Se observan desde la lámina basal del túbulo seminífero hacia la luz del mismo espermatocitos en leptocigoteno (L), paquiteno (P) diploteno (flecha negra) y espermátidas alargadas con núcleo heterocromático basófilo con forma de gancho (flecha blanca). e. Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. . Magnificación 400 aumentos. Barra de escala = 10µm.

Por otra parte, la inmunomarcación fue moderada en el citoplasma de las células de Sertoli, registrándose una inmunomarcación menor en los animales tratados que en los animales control (Figura 11).

En cuanto a los espermatozoides la inmunomarcación fue escasa, ésta fue observada a nivel de los cuerpo citoplasmáticos residuales y en la región perinuclear (Figura 11).

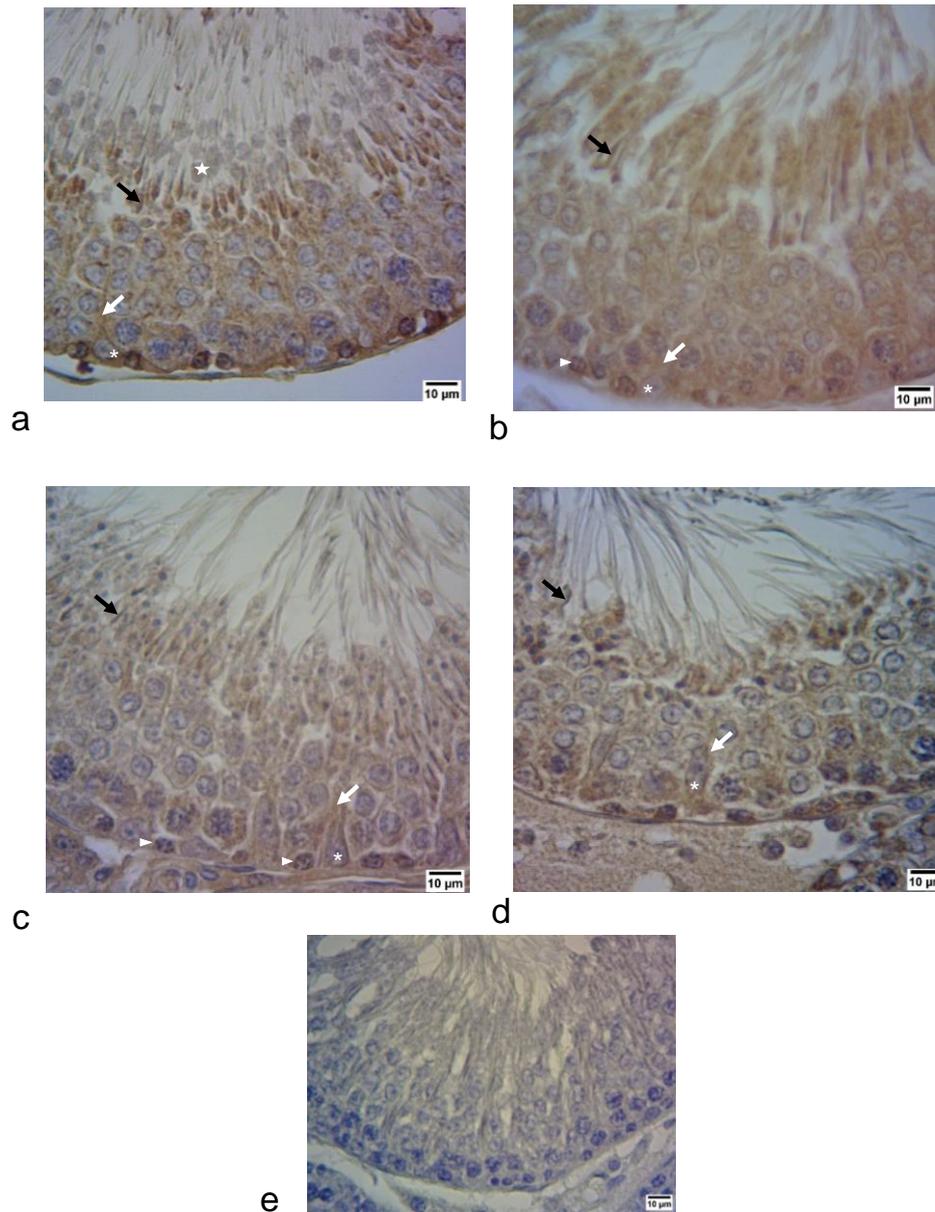


Figura 11. Imágenes histológicas de sección de túbulos seminíferos de ratas adultas correspondientes al estadio VIII en etapa de espermiación en los diferentes grupos de tratamiento: a. Grupo control (CONT) b. Grupo subnutrido en preñez (UNP), c. Grupo subnutrido en lactación (UNL), d. Grupo subnutrido en preñez y lactación (UNPL).. Se evidencia a nivel del citoplasma de células de Sertoli (flecha blanca) inmunomarcación de la proteína de shock térmico HSP90 y núcleo basófilo (asterisco blanco). Observe la inmunomarcación a nivel citoplasmático de los cuerpos residuales (estrella blanca) y la inmunomarcación leve a nivel de la cabeza de espermatozoides (flecha negra). En los grupos subnutridos UNP y UNL observe la presencia de espermatogonias tipo B (punta de flecha blanca). e. Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Magnificación 400 aumentos. Barra de escala = 10 μ m.

6.2. Resultados cuantitativos de inmun expresión de HSP90 en el epitelio seminífero de animales subnutridos

En el modelo experimental se observó que hubo efecto del factor tratamiento nutricional ($p < 0,0001$) sobre las variables dependientes estudiadas (área inmunomarcada de HSP90 β total, área inmunomarcada con nivel de inmun expresión alto, área inmunomarcada con nivel de inmun expresión moderado (%)).

6.2.1. Área inmunomarcada total para la proteína HSP90

El área inmunomarcada total de la proteína HSP90 β fue menor en los grupos subnutridos en preñez (UNP), en lactancia (UNL) y en ambos períodos (UNPL) versus el grupo control (CONT) ($p = 0,0004$; $p = 0,0004$; $p < 0,0001$ respectivamente). Entre los grupos subnutridos el UNPL registró una menor área inmunomarcada con respecto a UNP y UNL ($p < 0,001$) (Figura 12.a).

6.2.2. Área inmunomarcada para la proteína HSP90, nivel de inmun expresión alto

El área inmunomarcada con nivel de inmun expresión alto para la HSP90 β fue menor en el grupo subnutrido en preñez y lactancia (UNPL) versus el grupo control (CONT) ($p = 0,0019$). No se registró diferencias entre los grupos subnutridos en preñez (UNP) y subnutridos en lactancia (UNL) versus el grupo CONT ($p = 0,6769$; $p = 0,6288$). No se encontraron diferencias entre los animales del grupo UNP y UNL ($p = 0,9480$), ni entre ellos ni contra el CONT. (Figura 12.b).

6.2.3. Área inmunomarcada para la proteína HSP90, nivel de inmun expresión moderado

El área inmunomarcada con nivel de inmun expresión moderado para la HSP90 β fue menor en los grupos subnutridos en preñez (UNP), en lactancia (UNL) y en ambos períodos (UNPL) versus el grupo control (CONT) ($p < 0,0001$; $p = 0,0004$; $p < 0,0001$). Entre los grupos subnutridos el UNPL fue el que registró una menor área inmunomarcada con respecto al UNP y UNL ($p < 0,001$) (Figura 12.c).

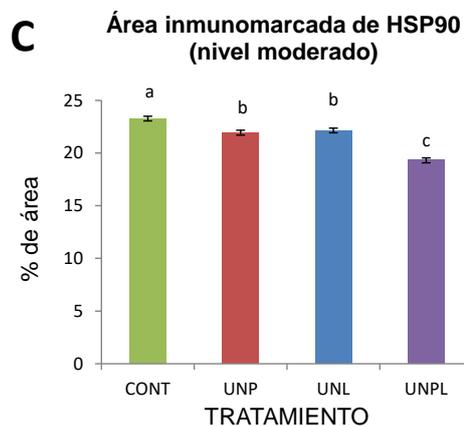
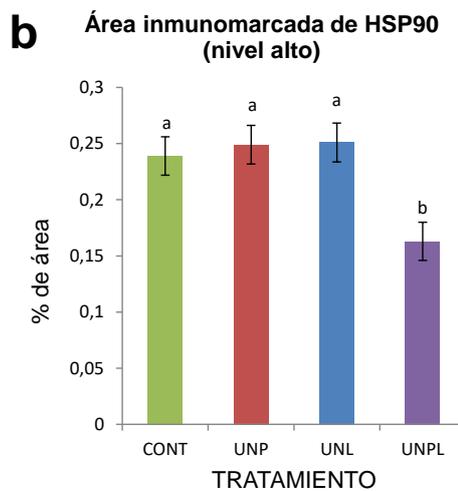
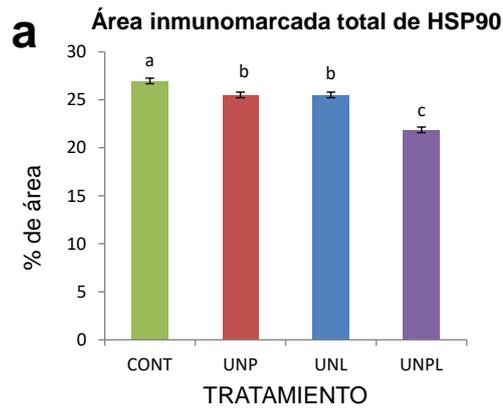


Figura 12. Gráficos de análisis cuantitativo de inmunomarcación de HSP90 en túbulos seminíferos de ratas adultas, cuyas madres fueron subnutridas durante diferentes períodos del desarrollo: Grupo control (CONT), Grupo subnutrido en preñez (UNP), Grupo subnutrido en lactación (UNL), Grupo subnutrido en preñez y lactación (UNPL). a. Área inmunomarcada total (%), b. Área inmunomarcada con nivel de inmunoexpresión alto (%), c. Área inmunomarcada nivel de inmunoexpresión moderado (%). Los datos presentados corresponden a las medias \pm error estándar de la media. Diferentes literales sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

7. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que relaciona las condiciones de subnutrición durante distintos períodos del desarrollo con la disminución en la expresión de HSP90 en testículos de ratas adultas. Entre las posibles consecuencias de dicha disminución podemos considerar diferentes repercusiones que desarrollaremos a continuación.

En primer lugar, la HSP90 es reconocida como proteína anti-apoptótica, bloqueando la muerte celular en diferentes niveles (Wang y col., 2014). Por lo tanto, la disminución registrada de HSP90 a nivel testicular de ratas adultas en el presente estudio, podría generar un desbalance entre la proliferación y muerte celular, estimulando esta última.

En segundo lugar, la disminución de HSP90 podría afectar la regulación hormonal, dado que como chaperona molecular está unida a los receptores de andrógenos a nivel citoplasmático. Dichos receptores requieren de esta proteína y luego pasan a disociarse de ella, se translocan al núcleo, donde se dimerizan, fosforilan y se unen al elemento de respuesta en el ADN (Squires 2006). La importancia del receptor de andrógeno radica en que regula la expresión génica, siendo responsable de la diferenciación sexual y los posteriores cambios durante el período de pubertad en machos (Gao y col., 2005), por lo cual un cambio en la molécula chaperona que lo acompaña tendrá efectos sobre el mismo. Por ejemplo, en este sentido se ha visto que en condiciones de fármacos como la geldanamicina, que inhiben a la HSP, se desestabiliza el receptor de andrógenos causando su degradación proteosomal, y esto a su vez disminuye la expresión de los genes por ellos regulados (Zoubeidi y col., 2007).

En tercer lugar, la HSP90 se expresa en las espermatidas, donde estabilizan y activan a las serina treonina quinasas específicas del testículo, proteínas expresadas exclusivamente en células postmeioticas, siendo esenciales para la fertilidad (Jha y col., 2013). Por lo tanto, la disminución de HSP90 observada en el presente estudio nos permite sugerir que la subnutrición tiene consecuencias negativas sobre el proceso de espermiogénesis.

Por lo tanto, con todo lo mencionado anteriormente sugerimos que la disminución de HSP90 en testículos de ratas puede tener injerencia directa sobre la espermatogénesis.

7.1. Inmunoexpresión y localización de HSP90 en túbulo seminífero de ratas adultas normales

La inmunolocalización de HSP90 ya ha sido descrita para testículos normales de ratas Wistar adultas, y se ha observado una elevada inmunomarcación de HSP90 en el citoplasma de las espermatogonias y espermatocitos en pre-leptoteno y leptoteno, siendo menor en espermatocitos en paquiteno (Ohsako y col., 1995), tal como observamos en nuestro estudio. Nuestros resultados indicaron que la inmunoexpresión de HSP90 β en ratas adultas se localizó en el epitelio del túbulo seminífero en el citoplasma y núcleo de células germinales, y en citoplasma de células de Sertoli en condiciones normales de nutrición adecuada durante la vida pre y post-natal, coincidiendo con registros previos que detallaremos a continuación. Por otra parte, en testículos normales de ratones, también se registró inmunomarcación a nivel de citoplasma y núcleo en espermatogonias así como a nivel citoplasmático en espermatocitos primarios (paquiteno) (Biggiogera y col., 1996). Nuestros resultados de inmunolocalización de HSP90 en testículos normales de ratas adultas coinciden con dichos resultados, siendo la expresión de HSP90 marcadamente citoplasmática en espermatogonias.

Continuando la observación hacia la luz del túbulo seminífero, en estudios anteriores en rata, las células post-meióticas, espermátidas redondas y elongadas, presentaron una menor inmunoexpresión de HSP90 en comparación a las espermatogonias (Ohsako y col., 1995), y menor expresión en espermátidas en comparación con espermatocitos en paquiteno, así como en el pasaje de espermátida redonda a elongada (Aguilar-mahecha y col., 2001). Nuestros resultados coinciden con lo anteriormente mencionado, dado que las espermatogonias presentaron una marcada inmunoexpresión perinuclear y citoplasmática, siendo esta menor en el citoplasma de los espermatocitos. En cambio, no observamos disminución de HSP90 en espermátidas elongadas en comparación con redondas, siendo más notoria la inmunomarcación en las espermátidas elongadas.

En otras especies también se ha registrado la inmunoexpresión de HSP90 en testículos de animales adultos. Por ejemplo, en el jabalí se observó expresión nuclear y citoplasmática de HSP90 en espermatogonias, espermatocitos, espermátidas redondas y espermátidas alargadas (Huang y col., 2005). Del mismo modo, en conejos se observó HSP90 en espermatogonias, y en la cabeza de espermátidas elongadas, sin embargo no se evidenció inmunomarcación ni en espermatocitos ni en espermátidas redondas (Wu y col., 2011). En cambio, nuestros resultados indicaron inmunomarcación a nivel citoplasmático en espermatocitos, y en espermátidas redondas específicamente en la región de formación del gránulo acrosómico.

Por otra parte, en estudios previos, a nivel de células de Sertoli, no se detectó inmunoexpresión de HSP90 (Ohsako y col., 1995). Por el contrario, nuestros resultados difieren, dado que observamos inmunomarcación en citoplasma de las células de Sertoli, tal como se registró en ratones (Biggiogera y col., 1996). Sin embargo, no registramos inmunomarcación a nivel nuclear en Sertoli, a diferencia de lo registrado en el estudio en ratones mencionado anteriormente.

Por otra parte, a nivel de espermatozoides no se registraron en estudios previos ni en ratones (Biggiogera y col., 1996) ni en ratas (Ohsako y col., 1995) inmunomarcación de HSP90. Sin embargo, nuestras observaciones indican una leve

inmunomarcación a nivel de los cuerpos citoplasmáticos residuales y en la región perinuclear de los espermatozoides. A pesar de esto, algunos espermatozoides no presentaron inmunomarcación de HSP90.

7.2. Inmunoexpresión y localización de HSP90 en túbulo seminífero de ratas en animales subnutridos

En estudios previos se observó que en condiciones normales existen altos niveles de HSP90 que actúan para mantener la homeostasis proteica, y que frente a un estrés ambiental severo pueden disminuir (Taipale y col., 2010). Coincidentemente, nuestros resultados indican una disminución en la expresión de HSP90 en el parénquima testicular de animales subnutridos en comparación con testículos normales. La importancia y efecto de la HSP90 en el proceso de la espermatogénesis, también se ha visto en estudios en *Drosophila melanogaster* donde se produjeron animales *knock out* para el gen *Hsp-/-* y se observó que esto causaba esterilidad en machos (Castrillon y col., 1993)

7.3. El mayor efecto de la subnutrición sobre la inmunoexpresión testicular HSP90 se observó cuando la subnutrición se extendió en períodos pre y postnatales

En cuanto al momento en que es más severo el efecto de la subnutrición algunos autores sugieren que cuando la subnutrición se extiende durante preñez y lactancia tiene menos consecuencias negativas en cuanto a las células germinales en comparación a subnutridos solo en preñez o solo en la lactancia (Rodríguez-González y col., 2012). Sin embargo, en cuanto a los efectos de la subnutrición sobre la HSP90 vemos en nuestro estudio que disminuye más aún cuando la subnutrición se prolonga en ambos períodos, el de gestación y lactación.

7.4. Efecto de la subnutrición sobre la expresión de HSP90 en espermatogonias

Estudios previos demuestran que una dieta hipo-proteica materna, produce en las crías una reducción del diámetro tubular del testículo y una disminución en la cantidad de células germinales y células de Sertoli (Rodríguez-González y col., 2012). Nuestros resultados indican que la subnutrición provoca la disminución de la inmunoexpresión intensa de HSP90 en las espermatogonias. Sugerimos que la disminución de HSP90 podría provocar un aumento de la apoptosis en espermatogonias, ya que también observamos escasa presencia de las mismas en animales subnutridos.

7.5. Efecto de la subnutrición sobre la expresión de HSP90 en espermátidas

La HSP90 juega un rol fundamental para la espermiogénesis, es decir la diferenciación de las espermátidas en espermatozoides maduros. El rol de la HSP90 se manifiesta durante la diferenciación post-meiótica de las células germinales masculinas, coordinando la activación temporal y espacial de las protein-quinasas (Jha y col., 2013). Las serina treonina kinasas, son protein-quinasas que configuran una serie de proteínas expresadas únicamente en espermátidas, observándose que en ratones *knock-out* a dichas proteínas se alteraba la vaina mitocondrial y los cuerpos cromatóides de las espermátidas (Shang y col., 2010). Por lo tanto, sugerimos que la disminución observada de HSP90 podría influir directamente en

dichas proteínas fundamentales para la generación de la vaina mitocondrial en la espermátida elongada.

7.6. Efectos de la subnutrición sobre la translocación al núcleo de HSP90 en espermátidas elongadas

Se ha reportado que en condiciones de estrés celular luego del tratamiento hipertérmico, se produce un fuerte aumento de HSPs en cuerpos cromatóides de espermátidas redondas. La localización de HSPs en estructuras nucleares que están activamente involucrados en la síntesis y procesamiento de ARN sugiere que pueden tener funciones protectoras en estos procesos, en un tejido particularmente sensible a las tensiones térmicas (Biggiogera y col., 1996). Algunas proteínas sólo se mueven al núcleo selectivamente en condiciones de estrés, las HSP90 son una de ellas (Knowlton & Salfity 2002). En el presente estudio observamos una marcada inmunexpresión a nivel nuclear en espermátidas de animales subnutridos, sugiriendo que se produce una translocación nuclear de la HSP90 en momentos de espermiogénesis.

Por otra parte, un estudio previo en testículos de conejo mostró que en condiciones de estrés calórico el nivel de inmunomarcación de HSP90 aumentó, sin variar la distribución de la inmunomarcación tanto en espermatogonias como en espermátidas elongadas (Pei y col., 2012). Sin embargo, nuestros resultados descriptivos en condiciones de subnutrición indican una inmunomarcación más intensa de HSP90 en espermatoцитos en leptocigoteno y en el núcleo de espermátidas en el proceso de elongación entre los estadios X-XI del ciclo del epitelio seminífero.

En cuanto a las espermátidas elongadas, presentes en los estadios XII-XIII los núcleos se observaron heterocromáticos y negativos, basófilos, evidenciando condensación nuclear y ausencia de inmunexpresión de HSP90. Esto indica que hacia el final de la espermiogénesis, durante la fase de elongación del núcleo y posterior condensación (Kerr y col., 2006) la HSP90 ya no se expresa. Estas observaciones de ausencia de HSP90 en espermatozoides con núcleo hipercondensados, coincide con experimentos realizados en levaduras, donde la expresión de HSP90 fue menor en condiciones de menor actividad metabólica o quiescencia (Tapia & Morano 2010). Sin embargo en el citoplasma de las espermátidas de animales subnutridos se observa una disminución de la inmunexpresión de HSP90. Nuestras observaciones descriptivas de la inmunomarcación de HSP90 en espermátidas tardías en distintos estadios del ciclo del epitelio seminífero (X-XI y XII-XIII) en animales subnutridos, sugiere una posible alteración en los procesos de la espermiogénesis.

7.7. Efecto de la subnutrición sobre la expresión de HSP90 en células de Sertoli

En cuanto al estudio de los efectos de la subnutrición materna durante la lactación, se han reportado disminución del peso corporal y el peso testicular de las crías ratas macho adultas. Asimismo también se ha observado una disminución en el número de células de Sertoli por sección de túbulo seminífero y por testículo y una disminución del volumen absoluto del túbulo seminíferos (Genovese y col., 2010). En cuanto a las células de Sertoli se observó una disminución en el número en el grupo subnutridos en preñez (Zambrano y col., 2005). Una de las principales

funciones de las células de Sertoli es generar un ambiente propicio para la proliferación y maduración de las células germinales, el número de células de Sertoli determina la producción de espermatozoides en el adulto, por lo tanto una disminución en el número de estas células afecta el desarrollo de las células germinales y compromete la espermatogénesis (Rodríguez-González y col., 2012)

En base a los antecedentes previamente mencionados sobre la subnutrición y sus consecuencias en el número de células de Sertoli sugerimos que esto podría estar vinculado con la disminución de la expresión de la proteína HSP90 en el presente estudio.

7.8. Relación entre la subnutrición, las HSP90 y la inhibición de la apoptosis

La subnutrición provocó a largo plazo efectos en la expresión de proteínas a nivel testicular, conduciendo a una disminución en la expresión de la proteína de shock térmico en los grupos subnutridos durante preñez y en lactación. Si consideramos a la subnutrición como un factor estresante, cuando este factor se prolonga durante ambos períodos del desarrollo observamos un mayor impacto a nivel de la expresión de HSP90. Estudios previos, demostraron que una sobreexpresión de HSP90 inhibe la apoptosis a través de la prevención en la activación de las caspasas en varios modelos de estrés celular (Pennisi y col., 2015). Por otra parte, una disminución en la expresión de HSP90 aumenta la sensibilidad de la célula a la apoptosis (Lanneau y col., 2008). Por lo tanto, sugerimos que en el presente estudio los procesos de muerte celular o apoptosis podrían ser estimulados, al encontrarse disminuido el nivel de la proteína HSP90 a nivel testicular.

7.9. Vinculación de la disminución HSP90 con la disminución de la hormona testosterona

En estudios previos en ratas donde se realizó una restricción proteica en madres durante los períodos de preñez y lactancia se observó en las crías a los 70 días de vida una disminución de la hormona testosterona (Zambrano y col., 2005). La regulación de la testosterona está vinculada a los receptores de andrógenos, que existen a nivel testicular y estos receptores a su vez se encuentran regulados por HSP90, por lo tanto la disminución de esta proteína podría estar afectando la espermatogénesis a través de este mecanismo. Dentro de las funciones de la HSP90 está el mantener la conformación y estabilizar receptores, como se ha descrito previamente en esta discusión. En este sentido, también reportes previos en levaduras *in vitro* demuestran que la HSP90 estabiliza la conformación de receptores de andrógenos, dándole mayor afinidad por la hormona, funcionando así como una chaperona molecular estimulando la estabilidad del receptor (Fang y col., 1996).

La supresión de andrógenos altera dos complejos proteicos de conexión especializada (cadherina / cadherina y $\alpha 6\beta 1$ -integrina / laminina) entre las células de Sertoli y las espermátidas alargadas. En ausencia de andrógenos, hay una alteración en la fosforilación de proteínas que incluyen la adhesión quinasa focal y la β -catenina que disminuyen la integridad de las cadenas caderinas y $\alpha 6\beta 1$ -integrina / laminina y conexiones intracelulares que conduce al desprendimiento prematuro de las espermátidas alargadas (Walker y col., 2015). Por lo tanto, una reducción en la testosterona resulta en el desprendimiento prematuro de espermátidas de las células de Sertoli en la fase de transición redonda a alargada (O'Hara & Smith 2015).

Por todo lo anteriormente expuesto, la subnutrición durante el desarrollo pre y post-natal produce una disminución de HSP90, lo que sugiere un aumento en los procesos de apoptosis celular a nivel testicular. Consideramos que dada la vinculación de la proteína de shock térmico HSP90 en la regulación de los receptores de andrógenos, su disminución tendría implicancia directa sobre los niveles de andrógenos, causando su degradación.

8. CONCLUSIONES

La subnutrición durante los períodos de desarrollo pre y postnatal afecta la expresión de HSP90 en el parénquima testicular disminuyendo su expresión, siendo más marcado el efecto cuando se produce en ambos períodos claves del desarrollo como son preñez y lactancia. Por lo tanto, se concluye que la restricción de nutrientes durante el crecimiento intrauterino y posnatal se asocia cambios persistentes a nivel de la estructura histológica y molecular en el testículo de animales adultos. Los cambios en la localización e inmunoexpresión de las proteínas de shock térmico observados en los túbulos seminíferos sugieren efectos deletéreos sobre el proceso de espermatogénesis. Finalmente, este estudio provee evidencia que sustenta el rol esencial de las proteínas de shock térmico a nivel de la espermatogénesis y como estas se ven afectadas en condiciones de subnutrición.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar-mahecha A, Hales BF, Robaire B (2001). Expression of Stress Response Genes in Germ Cells During Spermatogenesis. *Biol Reprod* 65: 119–127.
2. Barker DJ, Clark PM (1997). Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev. Reprod.* 2: 105–112.
3. Bielli, A (2002) Regulación hormonal de la función reproductiva en el macho, En: Ungerfeld, R. Reproducción en lo animales domésticos, Montevideo, Ed. Melibea, v 1, pp 79-113.
4. Biggiogera M, Tanguay RM, Marin R, Wu Y, Martin TE, Fakan S (1996). Localization of Heat Shock Proteins in Mouse Male Germ Cells: An Immunoelectron Microscopical Study. *Exp. Cell Res.* 229: 77–85.
5. Castrillon DH, Gonczy P, Alexander S, Rawson R, Eberhart CG, Sridhar V, DiNardo S, Wasserman A. S (1993). Toward a Molecular Genetic Analysis of Spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* Characterization of Male-sterile Mutants Generated by Single P Element Mutagenesis. *Genetics* 135: 489-505.
6. Dellman, D (1999) Aparato reproductor masculino. En: Mangieri, J. Citología e histología. Buenos Aires, Ed. Inter-Médica, pp. 337-353.
7. Ensembl, 2017, Gene: Hsp90b1, Disponible en: http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Gene/Summary?g=ENSRNOG00000026963;r=7:27226569-27240533, Fecha de consulta 18/08/2017.
8. Fang Y, Fliss AE, Robins DM, Caplan AJ (1996). Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo. *J. Biol. Chem.* 271: 28697–28702.
9. Gao W, Bohl CE, Dalton JT (2005). Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem. Rev.* 105: 3352–3370.
10. Gartner LP, Hiatt JL (2011). *Histología básica*. Madrid, Ed. Elsevier, 352p.
11. Geneser., Brüel A (2015). *Histología*. 4ª ed, México, Ed. Médica Panamericana, 768p.
12. Genovese P, Núñez ME, Pombo C, Bielli A (2010). Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of sertoli cells in the adult rat. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 233–236.
13. Gilbert S (2007). *Developmental Biology*. *Dev. Biol.* 311: 691.
14. Griswold MD (1995). Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol. Reprod.* 52: 211–216.
15. Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE (2010). Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatoocytes. *Microsc. Res. Tech.* 73: 243–278.
16. Huang S-Y, Tam M-F, Hsu Y-T, Lin J-H, Chen H-H, Chuang C, Chen M-Y, King Y-T, Lee W-C (2005). Developmental changes of heat-shock proteins in porcine testis by a proteomic analysis. *Theriogenology* 64: 1940–1955.
17. Jha KN, Coleman AR, Wong L, Salicioni AM, Howcroft E, Johnson GR (2013). Heat shock protein 90 functions to stabilize and activate the testis-specific serine/threonine kinases, a family of kinases essential for male fertility. *J. Biol. Chem.* 288: 16308–16320.
18. Ji Z-L, Duan Y-G, Mou L-S, Allam J-P, Haidl G, Cai Z-M (2012). Association of heat shock proteins, heat shock factors and male infertility. *Asian Pacific J. Reprod.* 1: 76–84.
19. Kerr JB, Loveland KL, O'Bryan MK, Kretser DM (2006). *Cytology of the Testis*

- and Intrinsic Control Mechanisms, en: Knobil and Neill's, *Physiology of Reproduction*. 3 a ed, Saint Louis Missouri, Ed. Elsevier, v 1, pp. 827–947.
20. Knowlton A, Salfity M (2002). Nuclear localization and the heat shock proteins. *J. Biosci* 21: 123–132.
 21. Kretser DM De, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N (1998). Spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 13 (suppl1): 1-8.
 22. Lagarrigue M, Becker M, Lavigne R, Deininger S-O, Walch A, Aubry F, Suckau D, Pineau C (2011). Revisiting Rat Spermatogenesis with MALDI Imaging at 20- μ m Resolution. *Mol. Cell. Proteomics* 10: M110.005991.
 23. Lakshmy R (2013). Metabolic syndrome: Role of maternal undernutrition and fetal programming. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 14: 229–240.
 24. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C (2008). Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J. Cell. Mol. Med.* 12: 743–761.
 25. Li J, Buchner J (2012). Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomed. J.* 36: 106–117.
 26. Macphee D (2017). *The Role of Heat Shock Proteins in Reproductive System Development and Function*. Saskatchewan, Ed. Springer, 155 p.
 27. Maio A De, Santoro MG, Tanguay RM, Hightower LE (2012). Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress Chaperones* 17: 139–143.
 28. Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS (2000). The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum. Reprod. Update* 6: 149–159.
 29. O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI (2006). Endocrine regulation of spermatogenesis. En: Knobil and Neill's, *Physiology of Reproduction*. 3 a ed, Saint Louis Missouri, Ed. Elsevier, pp. 1017-1069.
 30. O'Hara L, Smith LB (2015). Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 29: 595–605.
 31. Ohsako S, Bunick D, Hayashi Y (1995). Immunocytochemical observation of the 90 KD heat shock protein (HSP90): high expression in primordial and pre-meiotic germ cells of male and female rat gonads. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 67–76.
 32. Parsell DA, Lindquist S (1993). The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance: Degradation and Reactivation of Damaged Proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27: 437–496.
 33. Pei Y, Wu Y, Qin Y (2012). Effects of chronic heat stress on the expressions of heat shock proteins 60, 70, 90, A2, and HSC70 in the rabbit testis. *Cell Stress Chaperones* 17: 81–87.
 34. Pennisi R, Ascenzi P, Masi A di (2015). Hsp90: A new player in DNA Repair *Biomolecules* 5: 2589–2618.
 35. Purandhar K, Jena PK, Prajapati B, Rajput P, Seshadri S (2014). Understanding the role of heat shock protein isoforms in male fertility, aging and apoptosis. *World J. Mens. Health* 32: 123–132.
 36. Rhind SM, Rae MT, Brooks AN (2001). Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122: 205–214.
 37. Rodríguez-González GL, Viguera-Villaseñor RM, Millán S, Moran N, Trejo R, Nathanielsz PW, Larrea F, Zambrano E (2012). Maternal protein restriction in

- pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 3: 321–326.
38. Rooij DG De, Russell LD (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* 6512: 776–798.
 39. Ross M, Pawlina (2013). *Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular*, Buenos Aires, Ed. Panamericana, 974p.
 40. Saribek B, Jin Y, Saigo M, Eto K, Abe S (2006). HSP90beta is involved in signaling prolactin-induced apoptosis in newt testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349: 1190–1197.
 41. Shang P, Baarends WM, Hoogerbrugge J, Ooms MP, Cappellen WA van, Jong AAW de, Dohle GR, Eenennaam H van, Gossen JA, Grootegoed JA (2010). Functional transformation of the chromatoid body in mouse spermatids requires testis-specific serine/threonine kinases. *J. Cell Sci.* 123: 331–339.
 42. Squires EJ (2006). *Endocrinología animal aplicada*. Zaragoza, Ed. Acribia. 265p.
 43. Sreedhar AS, Kalmár É, Csermely P, Shen YF (2004). Hsp90 isoforms: Functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 562: 11–15.
 44. Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 515–528.
 45. Tapia H, Morano KA (2010). Hsp90 nuclear accumulation in quiescence is linked to chaperone function and spore development in yeast. *Mol. Biol. Cell* 21: 63–72.
 46. Walker WH (2011). Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis* 1: 116–120.
 47. Walker WH, Easton E, Moreci RS, Toocheck C, Anamthathmakula P, Jeyasuria P (2015). Restoration of spermatogenesis and male fertility using an androgen receptor transgene. *PLoS One* 10: 1–20.
 48. Wang X, Chen M, Zhou J, Zhang X (2014). HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (review). *Int. J. Oncol.* 45: 18–30.
 49. Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE (2004). Maternal nutrition and fetal development. *J. Nutr.* 134: 2169–2172.
 50. Wu Y, Pei Y, Qin Y (2011). Developmental expression of heat shock proteins 60, 70, 90, and A2 in rabbit testis. *Cell Tissue Res.* 344: 355–363.
 51. Zambrano E, Guzman C, Rodriguez-Gonzalez GL, Durand-Carbajal M, Nathanielsz PW (2014). Fetal programming of sexual development and reproductive function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382: 538–549.
 52. Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Garcia-Becerra R, Boeck L, Diaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW (2005). A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 563: 275–284.
 53. Zoubeydi A, Zardan A, Beraldi E, Fazli L, Sowery R, Rennie P, Nelson C, Gleave ME (2007). Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. *Cancer Res.* 67: 10455–10465.