



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EFFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN DURANTE LA GESTACIÓN Y
LA LACTACIÓN SOBRE LA HISTOFISIOLOGÍA TESTICULAR
DE RATAS MACHO NEONATAS, PÚBERES Y ADULTAS**

por

Patricia Genovese Gonzalez

Área de Histología y Embriología.
Departamento de Morfología y Desarrollo.
Facultad de Veterinaria.

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY

2018

ESTA HOJA VA EN BLANCO



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EFFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN DURANTE LA GESTACIÓN Y LA
LACTACIÓN SOBRE LA HISTOFISIOLOGÍA TESTICULAR DE RATAS
MACHO NEONATAS, PÚBERES Y ADULTAS**

por

Patricia Genovese Gonzalez

Área de Histología y Embriología, Departamento de Morfología y
Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay

Director de Tesis: Prof. Dr. Alejandro Bielli

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

AÑO 2018

(Esta hoja se completará una vez se defienda la Tesis y se apruebe)

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

**Nombre; títulos
Instituto, Departamento o Facultad
Institución - País**

(ejemplo)

**John President; DVM, MS
Veterinary College
University of Cambridge – Reino Unido**

John

**Julia Verme; MS, PhD
Departamento de Agro Negocios
Universidad de Buenos Aires – Argentina**

Julia

**Clark Kent; MS
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay**

2018

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

**“EFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN DURANTE LA GESTACIÓN Y
LA LACTACIÓN SOBRE LA HISTOFISIOLOGÍA TESTICULAR DE
RATAS MACHO NEONATAS, PÚBERES Y ADULTAS”**

Por: Dra. Patricia Genovese González

Director de Tesis: Dr. Alejandro Bielli

Tribunal

Presidente: Dr. Marcelo Rodríguez Piñón

Segundo Miembro: Dr. Jorge Gil

Tercer Miembro: Dr. Álvaro López

Fallo del Tribunal *APROBADO CON MENCIÓN.*

Salón Producción
Jueves 25 de octubre de 2018

Calificaciones posibles: Aprobada (corresponde a B.B.B. – 6 en el Acta)
Aprobada con Mención (corresponde a S.S.S.-12 en el Acta)



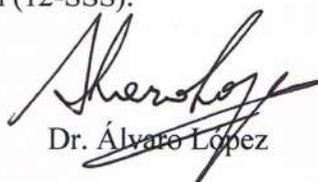
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Postgrados Académicos y Especializaciones

**Fundamentación de la Calificación del Tribunal
Defensa de Tesis de Maestría de la Dra. Patricia Genovese**

El Tribunal considera que la Dra. Genovese desarrolló un trabajo de tesis muy sólido, a partir de 2 experimentos (uno preliminar) cuyos resultados son originales y aportan al conocimiento del impacto de la subnutrición sobre el desarrollo histofisiológico del testículo de la rata hasta la adultez, como modelo de programación fetal. Los experimentos dieron lugar a un artículo publicado en una revista arbitrada de alto prestigio internacional y otro artículo en corrección. Durante la defensa de tesis, cumplió con los tiempos estipulados y realizó mejoras en el contenido del trabajo. Además, respondió con solvencia las preguntas realizadas por los integrantes del tribunal. Por lo anteriormente expuesto, el Tribunal por unanimidad califica el trabajo de tesis de la Dra. Patricia Genovese "EFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTACIÓN SOBRE LA HISTOFISIOLOGÍA TESTICULAR DE RATAS MACHO NEONATAS, PÚBERES Y ADULTAS" como aprobado con mención (12-SSS).



Dr. Jorge Gil



Dr. Álvaro López



Dr. Marcelo Rodríguez
Presidente del Tribunal

A mi familia, pilares de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Para la presente tesis fue imprescindible utilizar animales que donaron lo más importante que tienen, sus vidas. Ellos dejan su huella en mí, y aunque no lo comprenden, les agradezco infinitamente.

A las comisiones que permitieron la financiación de la presente tesis: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República y a la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEDEC) de la Facultad de Veterinaria.

Dr. Alejandro Bielli, mi jefe en el Área de Histología y Embriología, mi orientador en el camino de las ciencias y una gran persona. Ejemplo de voluntad y de positivismo que me ha contagiado en momentos donde las cosas se complican, un agradecimiento enorme por la paciencia y dedicación en general y especialmente en el presente trabajo.

Emiliano Herrera, segundo observador de las variables de inmunohistoquímica, que con gran responsabilidad y dedicación estuvo a la altura de las circunstancias.

Paul Ruiz, un gran amigo, de los que en las que hay que escuchar, está siempre. En esta tesis fue un apoyo, y sacó de esa galera que tiene, una pasantía memorable en Córdoba.

A mis amigos Rodrigo y Claudia, que disfrutaban de resultados así como propios y hacen el aguante muchas veces.

Nelly y Waltin (mi madre y padre), de las mejores personas del mundo, los responsables directos de estimular la curiosidad y la búsqueda de respuestas. Especialmente a mi madre que desde hace muchos, muchos años es ambos, y no para de dar clase de valentía, orgullo y fuerza.

Leticia y Eva, mis hermanas, esas amalgamas que apoyan hasta el final. De esa gente que uno necesita para vivir y para avanzar. Grandes mujeres, especialistas en poner cara de “qué interesante” solo para brindar apoyo en mis inquietudes.

Victoria, mi pareja, mi compañera y mi hada. Incansable luchadora, imparables maquina que apoyan y da hasta las horas de sueño. Traductora principal de mis ideas, correctora de estilo y dadora de mañas. La utopía de mi mitad en la vida real.

A mis mascotas todas, pero especialmente a Thor...el mejor gato del mundo.

INDICE

A. INTRODUCCIÓN (pág.1)

1. Interacción entre reproducción y producción (pág.1)
2. Definición y generalidades de la “programación fetal” (pág.1)
3. La gónada masculina (pág.2)

B. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS (pág.3)

1. Células testiculares y sus funciones (pág.3)
2. Células sustentaculares o de Sertoli (CS) (pág.3)
3. Células intersticiales o de Leydig (CL) (pág.4)
4. Células mioideas (CM) (pág.5)
5. La apoptosis y la proliferación celular (pág.5)
6. La programación fetal y su efecto sobre el parénquima testicular (pág.6)

C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA (pág.7)

D. HIPÓTESIS (pág.7)

E. OBJETIVOS (pág.7)

F. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN (pág.8)

G. MATERIALES Y MÉTODOS (pág.9)

1. Experimento preliminar (pág.9)
2. Experimento definitivo (pág.9)
3. Histología cuantitativa (pág.11)
4. Inmunohistoquímica (pág.12)
5. Análisis estadísticos (pág.13)

H. RESULTADOS (pág.14)

I. DISCUSIÓN (pág.23)

J. CONCLUSIONES (pág.27)

Perspectivas futuras (pág.28)

K. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (pág.29)

Anexos- publicación I Genovese et al. 2010, publicación II (manuscrito) Genovese et al. 2018 (pág.34)

RESUMEN

El objetivo de la tesis fue estudiar la sensibilidad de la rata al fenómeno conocido como programación fetal, en este caso por ambiente nutritivo desfavorable en etapas tempranas de la vida, es decir estudiar el impacto de la subnutrición durante la gestación y la lactación sobre la histofisiología testicular en ratas machos neonatos, púberes y adultos. Con este fin, utilizamos técnicas de morfometría para estudiar el número de células de Sertoli (CS), mioides (CM) y gonocitos (G). Por otra parte se aplicó la técnica de inmunohistoquímica para estudiar -por un lado- la proporción existente entre proliferación y apoptosis de las células antes mencionadas junto con las células de Leydig (CL) -y por otro lado-, la abundancia relativa del receptor de andrógenos (RA) en todas las células antes mencionadas. En todas las edades estudiadas, encontramos que los individuos tratados tuvieron menor peso corporal y testicular que sus controles. Al estudiar el número de CS, encontramos que hubo un menor número por corte transversal de túbulo seminífero (sólo en el adulto) y total por testículo (en todas las edades), pero no encontramos diferencias en la tasa de proliferación o de apoptosis en CS entre los grupos experimentales. Tampoco encontramos diferencias ni en número, ni en tasa de proliferación o apoptosis ni en gonocitos ni en CL. Sin embargo, a pesar de que no hubo a ninguna edad estudiada diferencias en el número de CM por corte transversal de túbulo seminífero, sí se observó un mayor número de CM en proceso de apoptosis en los testículos de animales adultos del grupo tratado. En cuanto a la intensidad de la positividad del RA, encontramos que los animales tratados neonatos y púberes mostraron menor intensidad del RA en las CS y CM. Los datos en su globalidad mostraron que el testículo es muy sensible a los efectos de la programación fetal y en conclusión, la capacidad máxima de producción de espermatozoides fue afectada por la programación fetal por subnutrición, porque disminuyó el peso testicular, disminuyó el número de CS total y por corte en adultos. Por otra parte la dinámica poblacional de las CM fue afectada por la programación fetal, con tasas más altas de CM en apoptosis, y por tanto, la histofisiología testicular de esos animales en edad madura puede ser afectada por los tratamientos estudiados.

SUMMARY

The aim of the present work was to study rat's sensitivity to fetal programming due to unfavourable nutritional environment in early life stages. That is to say, to study the impact of subnutrition during pregnancy and lactation on testicular histophysiology in neonatal, pubertal and adult male rats. To fulfill this aim, morphometry techniques were used to study Sertoli cell (SC), myoid (MC) and gonocyte (G) numbers. Furthermore, immunohistochemistry techniques were applied to study- on the one hand- the existent proportion between proliferation and apoptosis of all cells types named earlier along with Leydig cells (LC)- and on the other hand-, the relative abundance of androgen receptor (AR) in all these cells types. At all ages studied, we found that treated individuals were lighter both, in terms of their corporal and testicular weights, than their controls. We found that there were fewer SC both per cross section of seminiferous tubule (in adults) and total SC per testicle (at all ages), but there was no difference in SC proliferation or apoptosis rates among the experimental groups. We didn't find any differences neither in number nor in proliferation nor apoptosis rates of gonocytes and LC. However, even though there were not differences in any of the studied ages in MC per cross section of seminiferous tubule, we observed higher numbers of MC in process of apoptosis in adult testicles of animals from the treated group. Regarding positiveness intensity of AR, we found that treated neonates and pubertal animals showed less intensity of AR in both SC and MC. All the data globally considered showed that the testicle is very sensitive to fetal programming effects and, in conclusion, maximum sperm production capacity was affected by fetal programming effects due to subnutrition. This happens as testicular weight decreased and therefore, total CS number and per section in adults decreased. MC population dynamics were affected by fetal programming, with higher rates of MC in apoptosis, and therefore, the testicular histophysiology of those animals in mature age might be affected due to the treatments studied.

INTRODUCCIÓN

Interacción entre reproducción y producción

La reproducción animal es uno de los factores más importantes en la eficiencia de los sistemas productivos animales. En términos generales, cuantas más crías se obtenga por hembra en edad reproductiva, más eficiente es el sistema. Es importante estudiar desde múltiples aspectos los procesos histofisiológicos que inciden en la reproducción. Este proceso normal puede tener influencias que no dependen directamente del animal y que pueden provenir de las estrategias de adaptación que los animales desarrollan según el contexto ambiental que los rodea. Por lo tanto tiene gran importancia estudiar la influencia de los factores ambientales sobre los órganos reproductivos y su funcionamiento.

Si bien los factores ambientales que afectan a los animales pueden ser variados, la nutrición es un aspecto muy importante en reproducción y en producción, ya que se trata en general de un recurso escaso y costoso y es claro que el objetivo en estas actividades es obtener el mejor resultado al menor costo. En muchos casos la eficiencia productiva implica manipular negativamente aspectos fisiológicos de los animales, ejemplo de esto son muchos de los sistemas de producción de leche (en donde las hembras gestan y producen leche con balance energético negativo) o en lanares, en donde es habitual adjudicar los peores potreros a los ovinos, por lo que frecuentemente las ovejas gestan en condiciones de subnutrición más o menos intensa. En estos modelos muchas veces los reemplazos son animales que también fueron gestados y lactaron dentro de este manejo.

Por último, generar información que ayude a mejorar la eficiencia de la reproducción es de gran importancia, pero utilizar como modelo especies productivas conlleva una gran inversión de tiempo y un gran costo económico. Está claro que utilizar modelos sustitutos (como en el presente trabajo con ratas) no permite una extrapolación exacta a otras especies. Sin embargo a nivel mundial es común utilizar modelos con animales de laboratorio para aproximarse a la comprensión de diversos problemas de salud en diferentes especies, incluso en humanos. Otro aspecto positivo de hacer trabajos con animales de laboratorio es que permite generar información preliminar que aumenta la precisión con la que se abordan experimentos con especies productivas, más costosos en tiempo y dinero.

Definición y generalidades de la “programación fetal”

La malnutrición de la madre durante las etapas en las que las crías son dependientes provoca problemas en el crecimiento postnatal y en el desarrollo, y determina efectos permanentes. Este efecto es denominado “programación fetal” (revisión: Desai & Hales, 1997; Wu et al. 2006); es importante tener presente que los efectos de la mala nutrición fetal o neonatal se observan incluso en etapas adultas (Engelbregt, et al. 2000).

El origen de estas líneas de investigación se remonta a la detección de patologías en adultos que vivieron sus etapas fetales y prepúberes en condiciones desfavorables, como por ejemplo las guerras. En humanos, la subnutrición durante la gestación está asociada a retraso en el crecimiento postnatal, desarrollo de enfermedades cardíacas o incluso diabetes tipo 2 en la vida adulta (Barker et al. 1993; Gluckman et al. 2005). El feto se

adapta a la falta de nutrientes u oxígeno con la disminución de la tasa mitótica, y este efecto es más marcado en los tejidos que están en rápida división celular en el momento de la carencia del nutriente (Cooper et al. 2002).

Desde hace mucho tiempo se utilizan diferentes especies animales para estudiar efectos de programación fetal, tanto para extrapolar en procesos productivos como en salud humana.

Se ha encontrado efectos en casi todos los aparatos y sistemas del organismo animal. En ovinos (utilizados como modelo de crecimiento intrauterino restringido por subnutrición durante la gestación) el timo sufrió una pérdida de estructura tridimensional y una reducción del número de timocitos por disminución de su proliferación (Liu et al. 2015); además, se afectó la presión arterial predisponiendo a hipertensión (revisión: McMillen et al. 2001). En otro experimento, en la misma especie, se afectó el área de miofibrillas de músculos esqueléticos durante la vida fetal (revisión: Hay et al. 2016). Por último nuestro equipo, estudiando la histofisiología del músculo, observó que la subnutrición en los primeros 70 días de gestación disminuyó la tasa de proliferación de los mioblastos del feto, e incluso afectó algunos músculos más que otros, en forma diferencial según el sexo del cordero (Ithurralde et al. 2017).

En las ratas y a modo general se sabe desde hace mucho tiempo que la subnutrición durante la gestación y la lactación causan en animales prepúberes cambios selectivos en el crecimiento de sus órganos con relación a su peso corporal, tanto en machos como en hembras (Desai et al. 1996). Incluso, cuando sólo se disminuye la concentración de caseína en el alimento durante la gestación y la lactación se obtienen crías más livianas y con cerebros menos pesados (Resnick et al. 1982), y cuando llegan a adultos los machos muestran alteraciones en los parámetros espermáticos (Toledo et al. 2011).

Por otra parte, las ratas crías nacidas de madres subnutridas durante la gestación tienen problemas de crecimiento post natal (Woodall et al. 1996; Herring et al. 2018). En ratas púberes hembras que lactan de madres malnutridas (con baja concentración de proteínas) hay cambios en la angiogénesis, el depósito de colágeno y la expresión de receptor de estrógenos alfa del endometrio (Brasil et al. 2005).

En Uruguay hay (según MGAP) 6.561.491 de ovinos y 11.732.201 de bovinos (SNIG, 2017), de los que un porcentaje importante han vivido sus primeras etapas de la vida en sistemas de cría extensiva, en condiciones desfavorables o al menos no óptimas. Por lo tanto es importante generar información que ayude a entender los efectos pasajeros y permanentes que causa el manejo sobre el desarrollo de los animales.

La gónada masculina

Los órganos de la reproducción se originan junto con las estructuras exocrinas del mesodermo intermedio vinculadas al aparato urinario, y en particular al mesonefros (riñón primitivo). En el techo del celoma se organiza la cresta urogenital, que corre longitudinalmente al cuerpo del embrión. Esta cresta urogenital se subdivide longitudinalmente, con un largo borde lateral que corresponde a la cresta urinaria, y un corto y relativamente grueso borde medial, que corresponde a la cresta genital. La cresta genital sólo se desarrolla a nivel de la porción abdominal más craneal. En cada embrión se originan los esbozos de los órganos reproductivos y persisten durante un tiempo en el

estadio indiferenciado de la organogénesis (estadio de la gónada indiferenciada). Luego aparecen características específicas de cada sexo, así como la degeneración de las estructuras inapropiadas. En el estadio indiferenciado (en el cual no es posible distinguir, morfológicamente, un embrión macho de uno hembra), primero se desarrolla la cresta gonadal en la cara medial de cada mesonefros. Este estadio se caracteriza por la formación de los cordones sexuales primarios a nivel gonadal (Noden & de Lahunta, 1990). En la rata comienza la diferenciación de la gónada entre los días 12 y 13,5 de gestación (Magre & Jost, 1991; Kuopio et al. 1989). Cuando el feto llega a 15,5 días comienza la actividad esteroideogénica y por lo tanto produce testosterona (Huhtaniemi & Pelliniemi, 1992). Ya en la pubertad es que el órgano adquiere la capacidad de producir espermatozoides; esto ocurre en la rata, pasados los 30 días de vida (Abd El-Meseeh et al. 2016), y mantiene estas funciones endocrinas y exocrinas a lo largo de toda la vida. El parénquima testicular seminífero se organiza en el adulto en túbulos seminíferos (donde se producen los espermatozoides a partir de la pubertad) y tejido intersticial entre los túbulos, que es un tejido conjuntivo con células especializadas en producir esteroides sexuales (desde la edad fetal).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Células testiculares y sus funciones

Células sustentaculares o de Sertoli (CS)

Estas células fueron descritas por primera vez por el médico italiano Enrico Sertoli (Sertoli, 1865). Se encuentran formando parte del epitelio seminífero que constituye el túbulo seminífero. Las primeras CS aparecen sobre el día 13,5 de gestación en la rata (Magre & Jost 1991). Estas células sólo se reproducen normalmente durante la vida fetal y postnatal hasta poco antes de iniciarse la pubertad. En la rata, la proliferación de células de Sertoli se detiene en un rango entre 16 (Steinberger et al. 1971) y 17,5 días de vida pos nacimiento (Angelopoulou et al. 2008), siendo su máximo pico de proliferación a los 20 días de post concepción (Zhengwei et al. 1990)

Las CS son fundamentales para que ocurra la espermatogénesis, son el “director de la orquesta de la espermatogénesis” (revisión: Dimitiadis et al. 2015). Existe una alta correlación entre el número de CS y el tamaño testicular adulto en gran variedad de mamíferos (revisión: Sharpe et al. 2003). El número de espermatozoides producidos diariamente está altamente correlacionado con el número de células de Sertoli por testículo, dado que cada célula de Sertoli individual sólo puede apoyar metabólicamente a un número limitado de células germinales (Russell & Peterson. 1984; Orth et al. 1988; Brendtson & Thompson 1990; da Silva et al. 2006). Por último se sabe que el número de espermátidas alargadas en el adulto está correlacionado con el número de CS existentes en el período perinatal (Orth et al. 1988). Por lo tanto es claro que en la rata un momento crítico en cuanto al desarrollo testicular y su futuro es el período perinatal.

Por otro lado, las CS controlan mediante factores tróficos el número de células mioideas (CM) y estimulan el desarrollo de células de Leydig (CL) adultas a partir de sus precursoras en la etapa prepúber (Rebourcet et al. 2014a), pero además mantienen el número de CL y CM y su actividad en el testículo adulto (Rebourcet et al. 2014b; Wen et al. 2016).

Existen múltiples factores que inciden sobre el normal funcionamiento de estas células, la presencia de andrógenos es uno de ellos y muy importante (Escott et al. 2014). Las CS expresan receptores para andrógenos (RA) desde etapas fetales y la ausencia de estos determina un menor número de CS por testículo y déficit de su función en el soporte de células germinales (Tan et al. 2005). Además los RA son esenciales en la CS para la normal espermatogénesis y la posterior fertilidad (Chang et al. 2013), incluso desde etapas fetales (Rey et al. 2009).

Células intersticiales o de Leydig (CL)

Como se menciona anteriormente, el testículo es una glándula mixta (exócrina y endócrina), de hecho es la principal glándula productora de andrógenos en el macho y son estas células las responsables de producirlos desde etapas fetales (Smith et al. 2014). Las CL se encuentran en el intersticio y pueden dividirse durante toda la vida del animal (Vornberger et al. 1994).

Desde hace décadas se sabe que las CL fetales y posnatales constituyen poblaciones celulares diferentes (Roosen-Runge et al. 1959). Las CL funcionales en el adulto comienzan a aparecer luego que se diferencian a partir de precursoras fetales en la prepubertad. En la rata este proceso comienza de forma sostenida a las dos semanas de vida (revisión: Mendis- Handagama & Ariyaratne, 2001). El testículo conserva en el intersticio una población de células progenitoras con alta capacidad mitótica toda la vida y recurre a ellas en caso de necesitar CL (Benton et al. 1995; Stanley et al. 2012).

En las ratas macho las células intersticiales fetales se comienzan a diferenciar en el día 13,5 de gestación a partir de células mesenquimales intersticiales (Kuopio et al. 1989). En el adulto las CL responden a estímulos de la hormona LH produciendo andrógenos (Tran et al. 2006), y en caso de ser necesario estas células pueden aumentar su número para aumentar la producción de hormonas (Hardy et al. 2005).

Los andrógenos son fundamentales en el testículo para mantener la espermatogénesis (McKinnell et al. 1988; O'Shaughnessy et al. 2014), y en este sentido se sabe que no solo son importantes para producir los espermatozoides, sino también para los procesos de maduración que ocurren en el epidídimo, y la posterior fertilidad (Simanainen et al. 2008). Para que esta hormona cumpla su función, las células blanco deben presentar receptores específicos. La producción de receptor a andrógenos (RA) está regulada principalmente por la presencia de la hormona en el testículo de forma paracrina (Nastiuk et al. 1994; Zhu et al. 2000). Para que la gametogénesis ocurra es fundamental que las CS y las CM expresen los RA (revisión: O'Hara et al. 2015). Las CL también son estimuladas a aumentar la expresión de sus RA por la presencia de andrógenos, por mecanismos autocrinos (revisión: Wang et al. 2009; Griffin et al. 2010).

Desde hace tiempo es conocida la localización de los receptores de andrógenos, (especialmente por la técnica de inmunohistoquímica), observándose en gran cantidad en los testículos de rata normal adulta, localizados en los núcleos de las células de Sertoli, Leydig y mioides (CM) (Pelletier et al. 2000; Sar et al. 1990).

Existe una interacción entre las CS, CM y CL, y en este sentido se ha encontrado que animales “knock out” para la expresión de RA en CS y CM, presentan menos CL, sin embargo mantienen su capacidad para producir andrógenos (revisión: Ye et al. 2017).

Células mioides (CM)

Son células que se diferencian en las primeras etapas de la vida del macho a partir de células que se encuentran en el intersticio testicular (Combes et al. 2009). En los testículos de rata, las CM se encuentran en una monocapa de células unidas entre sí, alrededor del túbulo seminífero (Lacy & Rotblat 1960). En base a la capacidad contráctil que presentan y al parecido con células de músculo liso Fawcett et al (1969) las denominaron células mioides. Se encuentran por fuera del epitelio seminífero, no forman parte de éste y están en estrecho contacto con el endotelio de los vasos intersticiales (Revisión: Maekawa et al. 1996). Posteriormente se ha reconocido actina y miosina en el citoplasma de estas células, estas proteínas le permiten modificar su forma y contraerse (Fernandez et al. 2008) disminuyendo la luz del túbulo seminífero y provocando el avance de los espermatozoides hacia la rete testis, siendo éste un rol crítico en la función testicular (Ellis et al. 1981; Zang et al. 2006).

La apoptosis y la proliferación celular

Todos los tejidos al menos en algún momento de la vida están sujetos a proliferación y muerte celular de forma alternada para obtener el equilibrio adecuado en las poblaciones celulares. La apoptosis es la muerte celular programada y ocurre según un patrón absolutamente predecible, el núcleo se condensa, puede fragmentarse y la célula es reabsorbida (Alberts et al. 1996) Este proceso tiene dos vías: la vía extracelular (la vía del receptor de la muerte) y la ruta intracelular (mediada por las mitocondrias y la vía del retículo endoplasmático), con ambas vías activando la caspasa 3. A su vez la caspasa 3 provoca que la apoptosis entre en una etapa irreversible (Ola et al. 2011). Por lo tanto, la caspasa 3 se considera uno de los ejecutores de apoptosis más importantes en la familia de las caspasas y el principal factor de efecto en el proceso apoptótico (Faddeel et al. 2008).

Hay numerosos trabajos que vinculan ambientes negativos durante la gestación con el aumento de la muerte celular por apoptosis. En este sentido se ha encontrado que la subnutrición en el primer tercio de la gestación provoca en el ovario de la cordera un aumento en la expresión de genes que estimulan la apoptosis (Lea et al. 2006). En ratas cuyas madres han sido expuestas a sustancias tóxicas y cancerígenas durante la gestación y la lactación se observa un aumento en la expresión de la proteína caspasa 3 en sus células testiculares (Liu et al. 2013). Subnutriendo durante el último tercio de gestación a la misma especie animal, encuentran que las crías presentan un mayor número de timocitos en proceso de apoptosis (Qu et al. 2017). Ya en el testículo, se ha demostrado el aumento en la expresión de caspasa 3 en las CS por efecto del etanol (Pourhassanali et al. 2016).

En cuanto a la proliferación celular, es fundamental que existan mecanismos que mediante la multiplicación celular repongan y mantengan las poblaciones celulares. Hay muchos marcadores de proliferación celular. Uno de estos marcadores es el antígeno nuclear de proliferación celular también conocido por su sigla en inglés como PCNA.

Este antígeno ha sido identificado como una proteína no histona presente en los núcleos de células en proliferación (Miyachi et al. 1978; Mathews et al., 1984). PCNA juega un papel importante en el metabolismo de los ácidos nucleicos.

La proteína es esencial para la replicación del ADN, está involucrada en la reparación de ADN, en el ensamblaje de la cromatina, y en varias instancias se ha demostrado que participa en la transcripción del ARN (revisión: Kelman 1997). Actualmente se utiliza para evidenciar células en proliferación por inmunohistoquímica, y esto ya está descrito para el testículo de la rata (Shi et al. 2015).

La programación fetal y su efecto sobre el parénquima testicular

La subnutrición durante la gestación y la lactación causa en ratas prepúberes cambios selectivos en el crecimiento relativo de sus órganos con relación a su peso corporal, tanto en machos como en hembras (Woodall et al. 1996). Desde hace décadas se sabe que la nutrición en etapas tempranas de la vida es uno de los factores que influyen en la cantidad y calidad seminal del toro y del carnero (Foote et al. 1978). En ovinos, la subnutrición durante la gestación determina un menor número de CS en neonatos (Bielli et al. 2002) y en machos jóvenes adultos, lo que implica un menor número de CS de forma permanente (Kotsampasi et al. 2009).

En animales de experimentación, la subnutrición en etapas tempranas de la vida (gestación más lactación) provoca que ratas macho adultas tengan menor número de células de Sertoli, tanto en total como por corte de túbulo seminífero, además de menor peso corporal y testicular (Genovese et al. 2010). En este sentido, neonatos que han sido subnutridos durante toda su gestación (por restricción de alimento a sus madres) también presentan un número menor de estas células, tanto en número absoluto como por corte de cordón testicular (Genovese et al. 2011). Por otra parte, se sabe que crías macho lactantes cuyas madres han sido alimentadas con dietas bajas en proteína (durante el período de lactación) tienen menor número de células de Sertoli y menor peso testicular y corporal a los 21 días de vida que las alimentadas sin restricción (Ramos et al. 2006). A su vez, la alimentación materna con dietas bajas en proteína durante el período de lactación determina cambios en la estructura testicular de los lactantes cuando llegan a adultos (Toledo et al. 2011). Por otra parte, restricciones proteicas y energéticas maternas durante la lactación, traen aparejado en ratas prepúberes, menor concentración de andrógenos en sangre y menor producción de receptores a andrógenos en sus células testiculares (Texeira et al. 2007). De esto se desprende la importancia de estudiar la distribución y la abundancia del receptor a andrógenos en el testículo junto al efecto de programación fetal.

Por último, está claro que el ambiente testicular temprano alterado trae como consecuencia una alteración en la función testicular en el adulto. De esto son ejemplo (también en ratas) los machos que han sido gestados con restricción materna de proteína, que producen un menor número de espermatozoides cuando llegan a adultos y éstos a su vez tienen un índice de normalidad menor que sus controles (Toledo et al. 2011; Rodriguez et al. 2014). Por otra parte, ratas que fueron subnutridas durante la gestación con dietas hipoproteicas, cuando llegan a adultos presentan baja fertilidad y fecundidad con respecto a sus controles (Muzi-Filho et al. 2015).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En base a los antecedentes descritos, resulta claro que la subnutrición en etapas tempranas de la vida altera la actividad reproductiva del macho adulto en varias especies, afectando el testículo. Como resultado final, el testículo es más liviano, por lo tanto hay un menor número de células de Sertoli, lo que resulta en un menor número de espermatozoides.

Resulta interesante establecer si este menor número es la resultante de una menor tasa de mitosis de las células de Sertoli en alguna o varias etapas de la vida, o si es debido a que dichas células mueren más tempranamente, esto último especialmente importante tratándose de células muy longevas.

A su vez la citoarquitectura normal del túbulo seminífero depende de estas células, por lo que otro aspecto a estudiar de las CS es su capacidad de mantener la proliferación y apoptosis de otras células que dependen de ella, es decir de las CM, CL y gonocitos.

Por último, es importante determinar si todas las células que son el objeto de estudio (CS, CL, CM, gonocitos) en este trabajo, son capaces de expresar RA, ya que de esto depende (entre otros factores) su normal funcionamiento y desarrollo.

HIPÓTESIS

La subnutrición durante las etapas de gestación y lactación de ratas macho altera la morfología y la histofisiología testiculares en diferentes etapas luego del nacimiento y hasta la vida adulta.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si existen efectos de la subnutrición durante la gestación y la lactación de ratas macho sobre el desarrollo histológico del testículo, afectando la dinámica celular (proliferación/apoptosis) y la expresión de receptores de andrógenos en animales neonatos, púberes y adultos.

Objetivos Específicos

1 Determinar si el número de células (de Sertoli, de Leydig, gonocitos, y mioides) de ratas macho subnutridas *in utero* y hasta los 25 días de edad es igual al de sus controles a los 2, 25 y 100 días de nacidos.

2 Determinar si la distribución y abundancia relativa del receptor de andrógenos (AR) de los testículos en las células (de Sertoli, de Leydig, gonocitos, y mioides) de ratas macho subnutridas *in utero* y hasta los 25 días de edad es igual al de sus controles a los 2, 25 y 100 días de nacidos.

3 Determinar si el número de células (de Sertoli, de Leydig, gonocitos y mioides) destinadas a la apoptosis (positivas a la caspasa 3) de los testículos de ratas macho

subnutridas *in utero* y hasta los 25 días de edad es igual al de sus controles a los 2, 25 y 100 días de nacidos.

4 Determinar si el número de células (de Sertoli, de Leydig, gonocitos y mioides) en proliferación (PCNA positivas) de los testículos de ratas macho subnutridas *in utero* y hasta los 25 días de edad es igual al de sus controles a los 2, 25 y 100 días de nacidos.

ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

La rata como modelo animal

Se optó por esta especie animal ya que (como se trató en antecedentes) está comprobado que es sensible a los efectos de la subnutrición en etapas tempranas de la vida en general y en particular sobre los órganos reproductivos. En este sentido, tenemos trabajos previos utilizando este modelo animal con publicaciones que son antecedentes de la presente tesis.

Si bien, los resultados obtenidos con este modelo no se pueden extrapolar con exactitud a las condiciones de mamíferos de mayor tamaño (animales productivos, seres humanos, etc.), la bibliografía sugiere que permite conocer e interpretar lo que ocurre en otras especies. El hecho de tener ciclos fisiológicos más cortos hace a la rata ideal para culminar en pocos meses lo que en especies productivas llevaría algunos años. Otra fortaleza por la que se eligió este modelo se encuentra en la estabilidad genética y la homogeneidad que existe entre individuos. Esto permite disminuir la variación individual pudiendo así obtener datos con mayor precisión.

Con este modelo animal (en esta línea de investigación) publicamos hace algunos años datos sobre la morfometría de muestras que luego se utilizaron para esta tesis. Si bien estos datos fueron publicados en trabajos anteriores (Genovese et al. 2010 y 2011), son importantes para comprender en su globalidad las implicancias de esta tesis y para el posterior análisis de la discusión.

Sobre el diseño experimental

En el diseño experimental se plantearon tres edades de estudio, a los 2, 25 y 100 días de nacidos. El grupo de neonatos fue pensado para obtener datos del efecto de la subnutrición durante la gestación. Con el grupo de 25 días de vida se obtuvo un grupo de animales que sufrió subnutrición durante la gestación y la lactación, y en especial se pretendió subnutrir todo el periodo de la vida en el que las CS se dividen. Finalmente en el grupo de 100 días de vida (considerando que a esta edad a los individuos de esta especie animal se los considera adultos) buscamos efectos o secuelas del tratamiento que se hizo en tempranas etapas de la vida. Es decir, con el último grupo de muestreo buscamos encontrar efectos de programación fetal sobre las variables que figuran en nuestros objetivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las maniobras descritas sobre los animales fueron informadas previamente al comité de ética en el uso de animales (CEUA) de la Facultad de Veterinaria y a partir de su autorización se llevaron adelante los experimentos que a continuación se detallan.

En el presente trabajo se utilizaron ratas (hembras y machos) de la cepa Sprague-Dawley. Se realizó un experimento principal del que se desprenderán los resultados de este trabajo y un experimento preliminar que se utilizó como puesta a punto de algunas variables que se utilizaron en el experimento definitivo.

Experimento preliminar:

Con el objetivo de generar datos día a día sobre el consumo de los animales durante la gestación, se llevó adelante un ensayo preliminar. Se utilizaron 6 hembras similares en edad (3 meses de vida) a las del experimento definitivo, primíparas, de la misma cepa (Sprague-Dawley) y cubiertas por el mismo macho. Las condiciones ambientales fueron las mismas que se utilizaron posteriormente (en el experimento definitivo) incluyendo quién (PG) manipuló los animales y el alimento. Luego de determinar efectivamente la preñez, se registró el peso corporal y el consumo de alimento día a día a lo largo de toda la gestación. De este experimento se obtuvieron valores promedio de consumo *ad libitum* por día a lo largo de la gestación. A este valor se le calculó el 40%, que fue el consumo diario durante la gestación del grupo tratado en el experimento definitivo.

Experimento definitivo:

El experimento abarcó la restricción alimentaria de las crías durante la gestación (restringiendo la alimentación materna) y la lactación (aumentando el número de crías lactantes por camada) y se llevó a cabo en el laboratorio de experimentación animal del Área de Histología y Embriología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.

Se trabajó con 20 ratas Sprague-Dawley primíparas, servidas por un mismo macho, con pesos corporales de $246 \pm 4,0$ gramos, y 3 meses de vida al inicio del experimento. Fueron asignadas al azar a uno de dos grupos experimentales según se describe a continuación.

Los animales fueron alojados con 12hs de luz, a 22°C y 50% de humedad ambiente. Se utilizó siempre el mismo tipo de ración balanceada para laucha (23% proteína; 8% fibra; 2,5% calcio; 1,25% fosforo).



Fig. 1: Jaula con doble piso para ratas tratadas.

Período de gestación del experimento

Se diagnosticó gestación por frotis vaginal diario (Marcondes et al. 2002), implicó colocar y retirar en la misma maniobra 100 microlitros de suero fisiológico intra-vaginal con cuentagotas. Se observó al microscopio el líquido resultante extendido en un portaobjetos y se tomó como día 1, al día de la aparición de espermatozoides en el frotis.

Con las hembras positivas se organizaron los siguientes grupos experimentales:

Grupo control (grupo C, n=10): alimentado *ad libitum* con agua y ración.

Grupo restringido (grupo R, n=10): alimentado durante toda la gestación y hasta el parto con 40% del consumo *ad libitum* diario materno (obtenidos en un experimento preliminar); los consumos fueron ajustados con el registro de consumo de los animales ya adjudicados al grupo control, diariamente a lo largo de la gestación.

Las ratas gestadas tratadas fueron alojadas en jaulas que contaban con un entrepiso que permitía acceder a las hembras adultas (madres gestantes) al alimento y al agua pero evitaba que las crías tuvieran acceso al alimento de forma anticipada (Fig. 1).

En ambos grupos se tomó diariamente el peso corporal materno y se estableció como punto final en los animales tratados la pérdida de más del 10 % del peso corporal inicial.

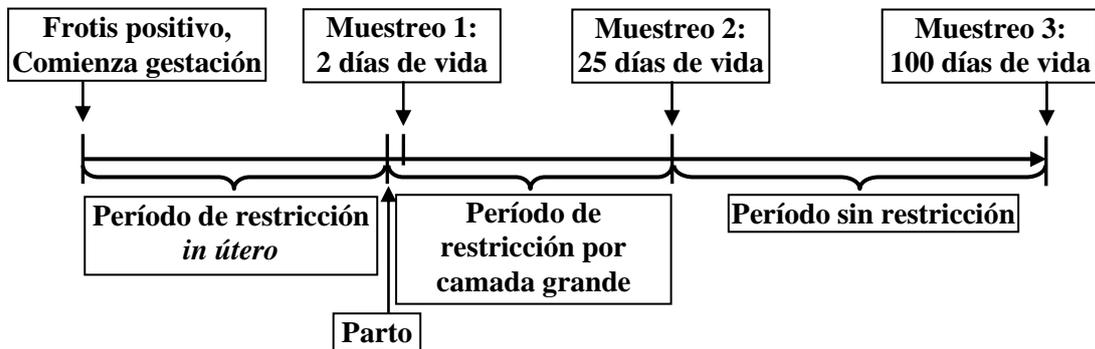
Período de lactación del experimento

Desde el día del parto (día 22 del experimento) ambos grupos de madres pasaron a tener alimento y agua *ad libitum*. Las camadas del grupo C estaban compuestas por 8 crías (retirando o agregando crías marcadas de otras madres si era necesario) hasta el destete, mientras que en el grupo R tuvieron 14 crías por camada durante la lactación. Las madres fueron pesadas cada 7 días durante este período, que duró 25 días. Los cachorros fueron identificados de manera individual por perforaciones en el pabellón auricular a los 20 días de vida.

Período de crecimiento adulto

Una vez destetados los animales (25 días de vida) se los colocó en cajas de a 5 individuos, con alimento y agua *ad libitum* hasta llegar a los 100 días de vida.

El experimento se puede resumir con el siguiente esquema:



Muestreos y procesamiento histológico

Se tomaron muestras a tres edades diferentes, 2, 25 y 100 días. A esas edades, todos los animales fueron pesados y sacrificados. Los neonatos de 2 días de vida (C, n= 10, R, n= 10) fueron decapitados con tijera mientras que los pertenecientes a los muestreos de 25 (C, n= 10, R, n= 10) y 100 (C, n= 10, R, n= 10) días de vida, fueron anestesiados con tiopental sódico intraperitoneal (40 mg/kg) previo a la decapitación.

Sus testículos derechos e izquierdos fueron disecados, pesados y fijados por inmersión con solución fijadora de Bouin durante 12 horas y almacenados en etanol 70° (v/v). Posteriormente, fueron procesados con pasajes en concentraciones crecientes de etanol, impregnados en cloroformo y finalmente en parafina líquida para confeccionar bloques que luego se cortaron en secciones de 5 micrómetros de espesor.

Histología cuantitativa

Sobre un juego de cortes histológicos tratados con Hematoxilina y Eosina se tomaron imágenes con un sistema de análisis de imágenes: microscopio óptico Olympus BX50, (Olympus, Tokio, Japón), video cámara (SSC-C158P; Sony, Tokio, Japón) y computadora personal con el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA) a un aumento final de 2500 x en el monitor de la pc. El volumen testicular se estimó a partir del peso testicular, asumiendo que la densidad testicular es 1. La densidad de volumen de los túbulos seminíferos y del intersticio testicular se determinaron por conteo de puntos (Weibel, 1979): se aplicó sobre cada imagen una grilla de 100 puntos, se contaron los puntos que cayeron sobre cada estructura histológica de interés en 30 imágenes seleccionadas al azar de cada animal y se calculó la densidad de volumen de la estructura (Vv) como:

$Vv = Pn/Pt$, donde Pn es el número de puntos de la grilla que cayeron sobre dicha estructura y Pt es el número total de puntos por imagen.

El diámetro de los túbulos seminíferos se determinó midiendo dos diámetros perpendiculares en 50 cortes transversales de túbulo seminífero por testículo.

El número total de células mioideas y gonocitos (estos últimos a los 2 días de vida únicamente, ya que no existen una vez iniciada la pubertad) por testículo se estimó con la siguiente ecuación:

Nro. total de células = $N_s \times (L/\text{espesor del corte histológico})$, donde N_s es el número medio de núcleos de células por corte transversal de túbulo seminífero y L es la longitud total de los túbulos seminíferos de un determinado testículo.

El número de células de Sertoli en cada edad de este experimento fue contado y forma parte de los resultados obtenidos y publicados anteriormente por este equipo (Genovese et al. 2010 y Genovese et al. 2011)

Los túbulos seminíferos fueron asumidos como cilíndricos y sus longitudes fueron estimadas a partir de las siguientes ecuaciones (Marshall & Plant, 1996):

$L = V_s / (\pi [D_s/2]^2)$, y **$V_s = (V_v \text{ de túbulos seminíferos}) \times \text{vol. absoluto testicular}$** , donde V_s es el volumen total de túbulos seminíferos y D_s es el diámetro de dichos túbulos. El número de células por corte transversal de túbulo seminífero se multiplicó por la longitud total de los túbulos seminíferos para obtener el número de células (mioideas y gonocitos) por testículo. El volumen testicular intersticial se obtuvo restando el volumen absoluto de los túbulos seminíferos y de los artefactos.

En el caso de los testículos neonatales, al tener éstos cordones sexuales y no túbulos seminíferos se midieron los diámetros de los cordones y se determinó el número de células por corte transversal de cordón.

Inmunohistoquímica

Para el receptor de andrógenos (AR)

Los cortes fueron tratados con un anticuerpo primario de ratón anti AR humano (AR N-20 SC-816, Santa Cruz, USA), kit amplificador Mach 2 Double (Mouse-HRP + Rabbit-AP, Polymer detection kit, Biocare medical, USA) y cromógeno DAB. Se utilizó como control negativo un corte sin aplicarle anticuerpo primario. Se describió la abundancia relativa de AR como la intensidad relativa presente en células de Sertoli, de Leydig, mioideas y gonocitos, evaluando la positividad de 300 células de cada tipo por medio de una escala semicuantitativa de intensidad de color (IC): 0- sin color, 1- débil, 2- moderado, 3- intenso. Se cuantificó la positividad calculando el score de positividad (SP) de la siguiente forma:

$SP = 1 \times n(IC1) + 2 \times n(IC2) + 3 \times n(IC3)$, donde n = número de células exhibiendo IC = 1, 2 o 3, expresado en % (Boos et al. 1996).

Para células en proliferación (PCNA) y en apoptosis (caspasa 3)

Se utilizó en láminas diferentes, obtenidas de cada animal, ya fuera anticuerpo primario compuesto anti caspasa 3 (AB 4051, Abcam, UK) o anti PCNA (Dako M0879, USA). Se utilizó el mismo kit amplificador que para el AR. Se contó así el número de células de Sertoli, de Leydig, mioideas y gonocitos positivas para cada antígeno y edad en 300

células ubicadas en cortes transversales de túbulo seminífero y sus intersticios elegidos al azar y fue expresado luego como porcentaje.

Análisis estadísticos:

Todas las variables cuantitativas fueron expresadas como medias \pm sem y analizadas por ANOVA. Se estudió las diferencias entre grupos en las variables histológicas cuantitativas, incluyendo scores de positividad, así como el peso testicular comparadas por anova. Se estudió los efectos de grupo, edad e individuo dentro de grupo, así como la interacción entre grupo y edad. Los valores fueron considerados diferentes a $P \leq 0.05$ y se estudió las diferencias *post hoc* entre grupos con tests de Tukey. Para dichos análisis se utilizó el programa Statistica versión 6 (Palo Alto CA, U.S.A).

RESULTADOS

Durante la fase experimental ninguna madre murió durante la gestación y/o la lactación ni experimentó patologías clínicamente evidentes; estos animales fueron sacrificados luego de destetadas las crías. Las crías nacidas vivas no presentaron diferencias en mortalidad entre grupos a lo largo del experimento y solo se descartaron animales para equilibrar el número de lactantes por camada.

En ninguna de las variables se encontró efecto de individuo (n.s.).

Peso corporal, testicular y número de células de Sertoli

Tanto los pesos corporales como los testiculares de los animales tratados (grupo R), fueron menores a los controles en todas las edades en que se muestreó (tabla 1). Las CS por corte de túbulo seminífero solo fueron diferentes entre grupos en animales de 100 días de vida, siendo menores en los animales del grupo tratado. Sin embargo cuando se calculó el número de células de Sertoli por testículo (en el que influye el peso testicular) en todas las edades se observó un menor número en los grupos tratados (Tabla I). Hubo interacción grupo*edad en el número de células de Sertoli/corte (*), el cual sólo fue diferente entre grupos a los 100 días de edad.

Tabla I - Peso corporal y testicular. Número de células de Sertoli por corte transversal de túbulo seminífero y total por testículo a los 2, 25 y 100 días de vida (media \pm ds).

Edad	Tratamiento	Peso corporal (g)	Peso testicular (g)	N° Células Sertoli por corte	N° Células Sertoli por testículo
2 Días	T	6.43 \pm 1.07*	0.026 \pm 0.0005**	19.09 \pm 0.70	0.50 \pm 0.09x10 ⁴ **
	C	7.63 \pm 0.56	0.035 \pm 0.0005	19.47 \pm 0.82	0.74 \pm 0.15x10 ⁴
25 Días	T	36.36 \pm 3.2***	0.06 \pm 0.02**	30.64 \pm 1.13	7.73 \pm 2.11**
	C	61.39 \pm 6.28	0.12 \pm 0.04	31.50 \pm 0.77	12.22 \pm 1.86
100 Días	T	254.0 \pm 26.9***	1.29 \pm 0.16*	18.2 \pm 1.2**	30.5 \pm 4.2x10 ⁶ *
	C	342.4 \pm 10.2	1.45 \pm 0.13	20.2 \pm 1.3	36.0 \pm 5.5x10 ⁶

*: P \leq 0.05; **: 0.001<P<0.01; ***: P<0.001 comparados con el grupo control.

Número de células mioides y gonocitos

El número de células mioides totales solo fue menor en animales del grupo tratado de 2 días de vida. Por otra parte el número de gonocitos por testículo fue menor en animales del grupo tratado a los dos días de vida (Tabla II). Hubo interacción grupo*edad en el número total de células mioides (*), el cual sólo fue diferente entre grupos a los 2 días de edad. Es importante tener en cuenta que los gonocitos solo se contaron y evaluaron por inmunohistoquímica en la primera edad de muestreo (2 días de vida), dado que estas células no existen como tales una vez iniciada la pubertad, ya que son precursoras de las espermatogonias en el adulto.

Tabla II - Número de células de mioides por corte transversal de túbulo seminífero y total por testículo a los 2, 25 y 100 días de vida. Número de gonocitos por corte transversal de cordón seminífero a los 2 días de vida (media \pm ds).

Edad	Tratamiento	Mioides /corte	N°Mioides total	Gonocitos /corte	N°Gonocitos total
2 Días	T	5,01 \pm 0,67	0,086 \pm 0,086 *	2,16 \pm 0,2	0,047 \pm 0,028 *
	C	4,89 \pm 0,29	0,2 \pm 0,033	2,02 \pm 0,26	0,082 \pm 0,01
25 Días	T	4,18 \pm 0,76	1,03 \pm 0,37		
	C	4,35 \pm 0,89	1,18 \pm 0,78		
100 Días	T	3,95 \pm 1,02	6,93 \pm 1,13		
	C	2,96 \pm 0,77	5,43 \pm 1,46		

*: $P \leq 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ comparados con el grupo control.

VARIABLES ESTUDIADAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Receptor de andrógenos

El índice de positividad (IP) al RA en células de Sertoli solo mostró diferencias entre subnutridos y sus controles en los animales neonatos siendo notorio el mayor IP en los animales de 25 días. En cuanto al IP al RA de las células de Leydig, no hubo diferencias entre grupos de la misma edad; sin embargo los animales de 25 días fueron diferentes a los neonatos y adultos, destacándose un muy mayor número en el IP. Las células mioides mostraron diferencias en el IP al RA a los 2 y 25 días de vida cuando se los comparó con sus controles y se mostraron las tres edades diferentes entre sí en su IP (Tabla III). Los gonocitos no mostraron diferencias entre subnutridos y sus controles. Hubo interacción grupo*edad en el IP al RA en células de Sertoli (*), el cual sólo fue diferente entre grupos a los 2 días de edad, y en el IP al RA en células mioides, el cual fue diferente entre grupos a los 2 y 25 días de edad y no a los 100. Las imágenes resultantes de la corrida de inmunohistoquímica contra RA y su control negativo así como las células evaluadas se muestran en la Figura 2.

Tabla III – Índice de positividad a la reacción de inmunohistoquímica para el receptor de andrógenos estudiado en varias células del testículo a los 2, 25 y 100 días de vida en animales tratados y controles (media \pm ds).

Células	Edades					
	2 días		25 días		100 días	
	T	C	T	C	T	C
Sertoli	1.26 \pm 0.21**a	1.65 \pm 0.17b	1.96 \pm 0.13c	2.07 \pm 0.11c	1.14 \pm 0.13a	1.46 \pm 0.22ab
Leydig	2.07 \pm 0.15a	2.23 \pm 0.10a	26.92 \pm 3.58b	28.85 \pm 3.75b	1.24 \pm 0.08a	1.25 \pm 0.08a
Mioides	2.69 \pm 0.04**d	2.80 \pm 0.05d	1.34 \pm 0.097***a	1.56 \pm 0.10b	2.28 \pm 0.12c	2.30 \pm 0.17c
Gonocitos	1.09 \pm 0.09	1.14 \pm 0.14	-	-	-	-

*: $P \leq 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ comparados con el grupo control de la misma edad. Los literales indican diferencias entre los grupos controles y tratados con igual y con diferente edad.

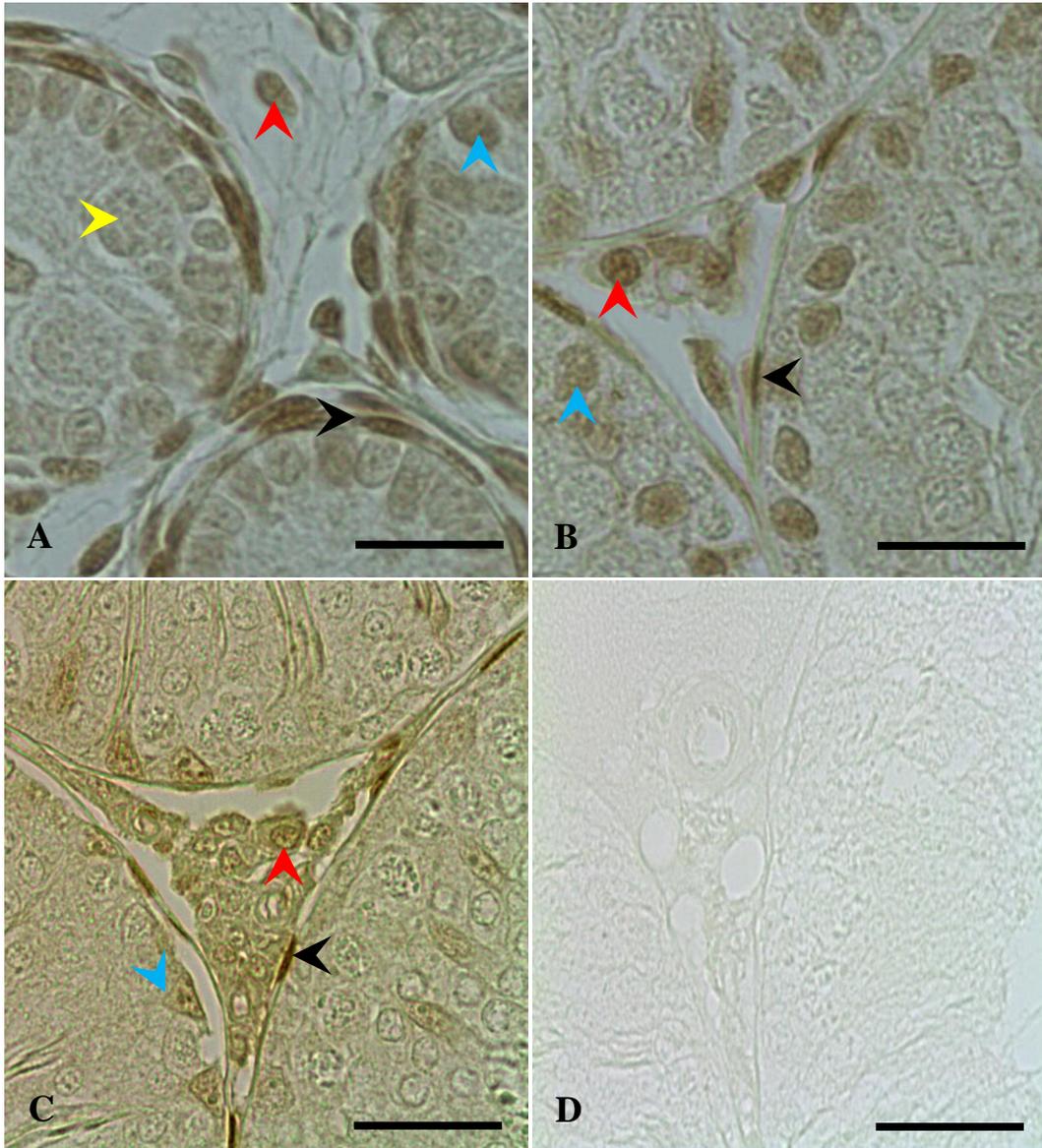


Figura 2: En A, B y C se muestran cortes histológicos de testículos con 2, 25 y 100 días de vida tratados con la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpo primario anti receptor de andrógenos. En D testículo de 100 días de vida utilizado como control negativo de la técnica al que no se le colocó el primario. Con flechas de color se señalan las siguientes células: amarilla, gonocitos; rojas, células de Leydig; celestes, células de Sertoli y negras, células mioides. Las barras representan 50 µm.

Células en apoptosis (caspasa 3 positivas)

Estudiada la proporción de células en apoptosis por inmunohistoquímica positivas contra caspasa 3 encontramos que tanto las células de Sertoli como las de Leydig no mostraron diferencias entre tratadas y controles a las mismas edades (no hubo efecto de grupo) y sí se encontraron diferencias comparando animales de diferentes edades (hubo efecto de edad). En cambio hubo interacción grupo*edad en el porcentaje de células mioides positivas a caspasa 3, donde hubo mayor número de estas células en apoptosis en el grupo tratado en los adultos (100 días de vida, Tabla IV). En cuanto a los gonocitos, no hubo diferencia a las edades estudiadas. Las imágenes resultantes de la corrida de inmunohistoquímica contra caspasa 3 así como las células evaluadas se muestran en la Figura 3.

Tabla IV – Porcentaje de células positivas a la reacción de inmunohistoquímica para caspasa 3 en varias células del testículo a los 2, 25 y 100 días de vida en animales tratados y controles (media \pm ds).

Células	Edades					
	2 días		25 días		100 días	
	T	C	T	C	T	C
Sertoli	8.57 \pm 0.60c	8.51 \pm 0.86c	5.83 \pm 0.60b	5.06 \pm 1.08b	0.15 \pm 0.13a	0.14 \pm 0.013a
Leydig	8.81 \pm 0.12c	8.77 \pm 0.15c	2.05 \pm 0.10a	2.10 \pm 0.15a	4.44 \pm 0.44b	4.21 \pm 0.47b
Mioides	9.61 \pm 0.11c	9.64 \pm 0.14c	4.95 \pm 0.92b	5.13 \pm 0.76b	8.49 \pm 0.39***c	2.41 \pm 0.45a
Gonocitos	7.76 \pm 0.32	7.77 \pm 0.55	-	-	-	-

*: $P \leq 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ comparados con el grupo control. Los literales indican diferencias entre los grupos controles y tratados con igual y diferente edad.

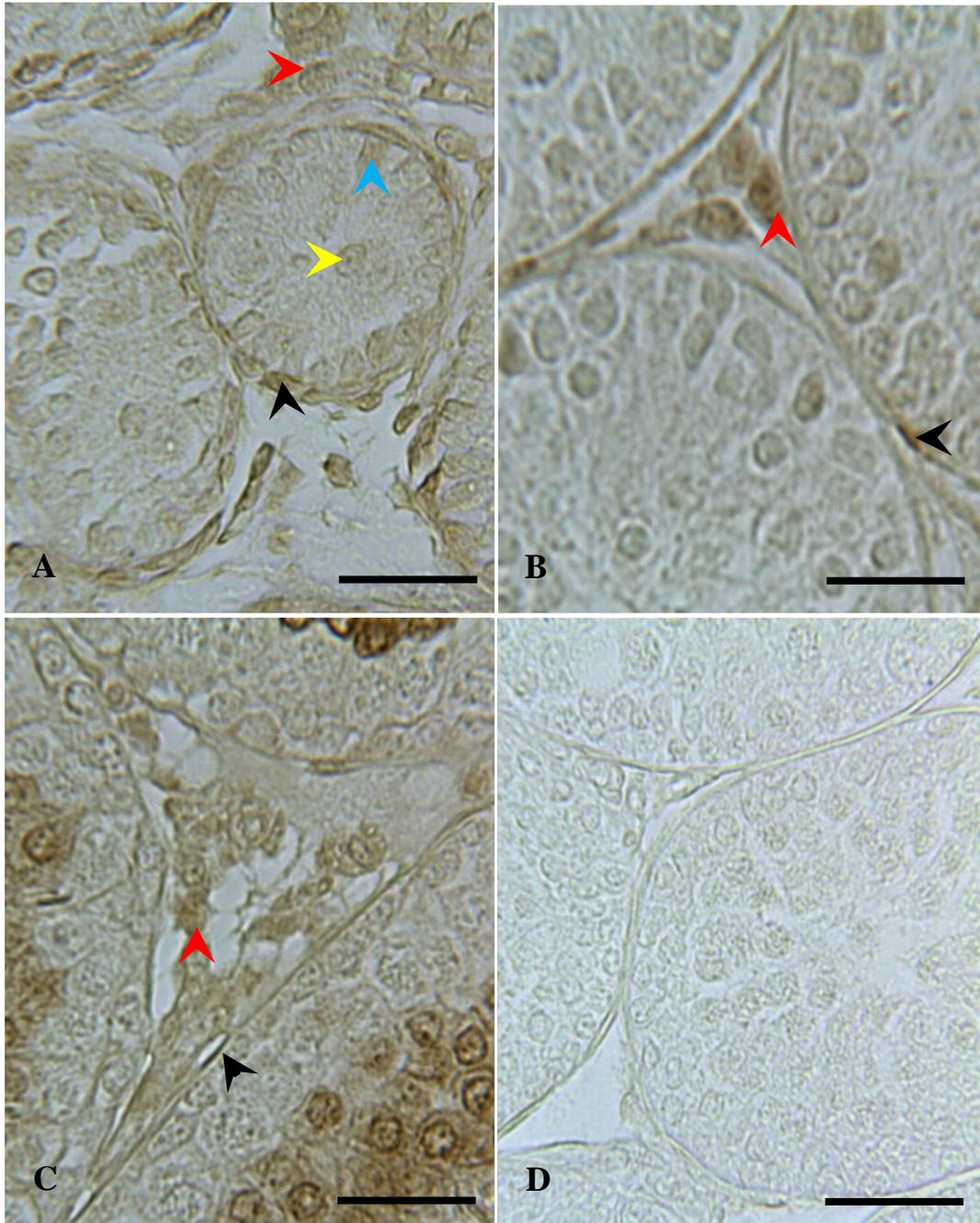


Figura 3: En A, B y C se muestran cortes histológicos de testículos con 2, 25 y 100 días de vida tratados con la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpo primario anti caspasa 3. En D: testículo de 25 días de vida utilizado como control negativo de la técnica, al que no se le colocó el anticuerpo primario. Con flechas de color se señalan las siguientes células: amarillas, gonocitos; rojas, células de Leydig; celestes, célula de Sertoli y negras, células mioides. Las barras representan 50 μm .

Células en proliferación (PCNA positivas)

Ninguna de las células estudiadas por inmunohistoquímica contra PCNA mostró diferencias entre los grupos tratados y controles a los 2, 25 y 100 días de vida (Tabla V). Sin embargo encontramos que la proliferación de las células de Leydig y mioides fue diferente según la edad en la que se las estudió. No hubo interacción grupo*edad (n.s.). Las imágenes resultantes de la corrida de inmunohistoquímica contra PCNA así como las células evaluadas se muestran en la figura 4.

Tabla V – Porcentaje de células positivas a la reacción de inmunohistoquímica para PCNA en varias células del testículo a los 2, 25 y 100 días de vida en animales tratados y controles (media \pm ds).

Células	Edades					
	2 días		25 días		100 días	
	T	C	T	C	T	C
Sertoli	86.40 \pm 7.14	88.52 \pm 8.48	-	-	-	-
Leydig	62.71 \pm 1.70c	62.02 \pm 1.82c	20.87 \pm 2.56b	21.07 \pm 2.54b	3.46 \pm 0.25 ^a	3.48 \pm 0.19a
Mioides	80.81 \pm 6.09c	84.42 \pm 6.09c	57.61 \pm 4.92b	50.74 \pm 3.62b	3.45 \pm 0.19 ^a	3.53 \pm 0.23a
Gonocitos	16.36 \pm 1.29	16.78 \pm 1.11	-	-	-	-

*: P<0.05; **: 0.001<P<0.01; ***: P<0.001 comparados con el grupo control. Los literales indican diferencias entre los grupos controles y tratados con igual y diferente edad.

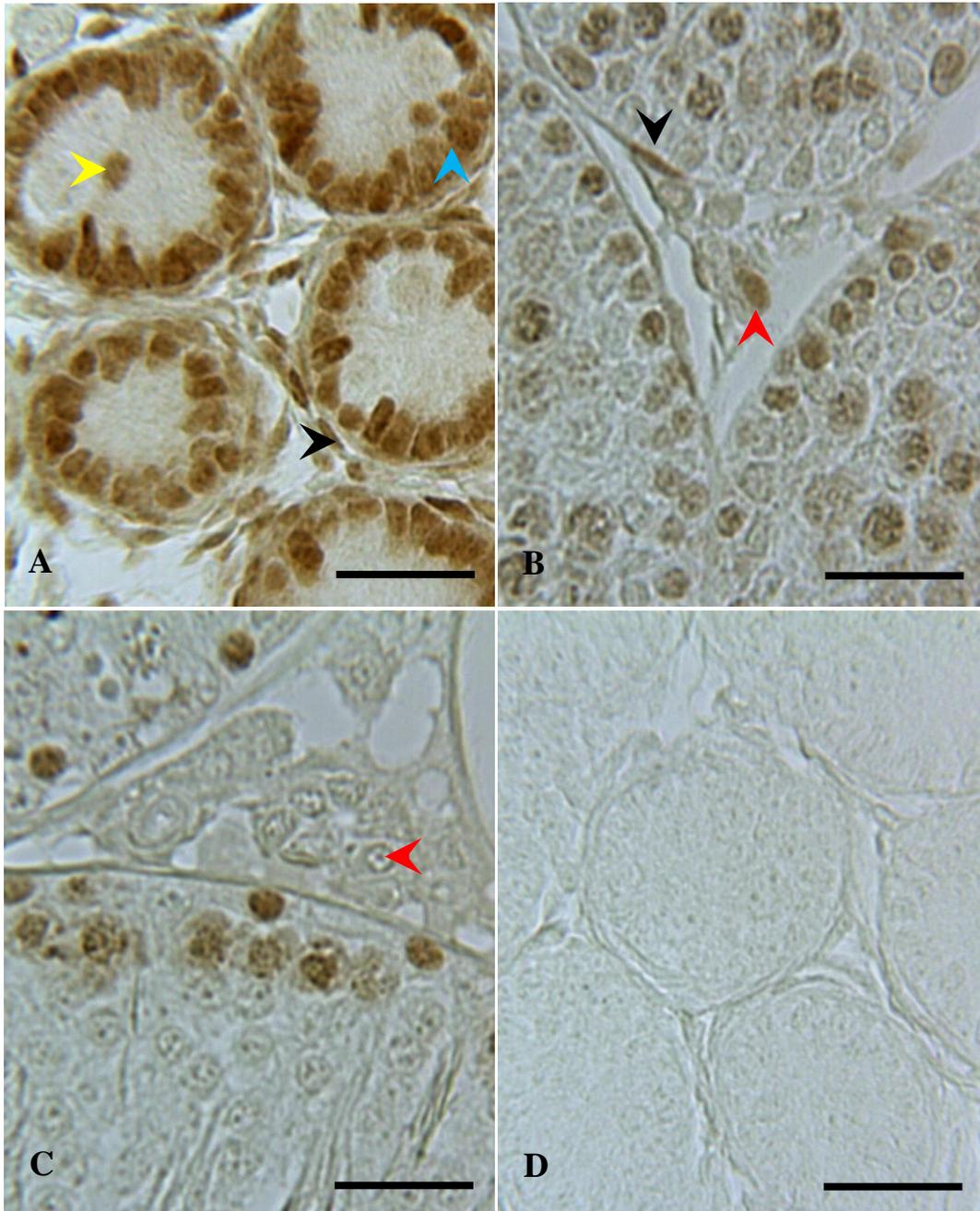


Figura 4: En A, B y C se muestran cortes histológicos de testículos con 2, 25 y 100 días de vida tratados con la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpo primario anti PCNA. En D: testículo de 2 días de vida utilizado como control negativo de la técnica, al que no se le colocó el anticuerpo primario. Con flechas de color se señalan las siguientes células: amarilla, gonocitos; rojas, células de Leydig; celeste, células de Sertoli y negras, células mioides. Las barras representan 50 μm .

Correlaciones

Encontramos que en el adulto hubo una correlación positiva entre el número de células de Sertoli y la expresión de AR por parte de ellas mismas y por las células mioides. También encontramos una correlación negativa entre el número de células de Sertoli y la proporción de células mioides en apoptosis (Tabla VI).

Tabla VI – Tabla de correlaciones. Número de células de Sertoli por corte y edad versus índice de positividad del receptor a andrógenos (IPAR) de células de Sertoli y mioides en esa misma edad; células de Sertoli por corte y edad versus porcentaje de células mioides expresando caspasa 3 (%CAS) en células mioides.

Sertoli / corte / edad	IPAR Sertoli	IPAR mioides	%CAS mioides
2	-0,3966 p=,436	0,2569 p=,623	-0,6720 p=,144
25	0,3108 p=,279	0,5477 p=,043	0,3227 p=,261
100	0,8533 p=,031	0,8833 p=,020	-0,9464 p=,004

Se consideran significativas las $P \leq 0.05$.

DISCUSIÓN

En líneas generales en el presente trabajo se obtuvo información que ayuda a comprender y a profundizar en el conocimiento sobre los efectos de la programación fetal por subnutrición de la histofisiología testicular en ratas. Si bien ya habíamos obtenido información en adultos en cuanto a los efectos del tratamiento sobre las células de Sertoli (Genovese et al. 2010), en esta tesis se buscó obtener información vinculada al posible mecanismo que lleva a un menor número de estas células. El tratamiento (subnutridos en la gestación mas la lactación) sumado a las edades de muestreo (neonatos, púberes y adultos) permitió generar conocimiento original sobre la sensibilidad del testículo como órgano a los efectos de la programación fetal y demuestra por primera vez hasta donde sabemos, que en nuestras condiciones experimentales las células mioides también son sensibles a estos efectos.

Peso corporal, testicular y número de células de Sertoli

Cuando estudiamos el peso corporal se observó que los animales del grupo tratado ya nacen (muestreo de 2 días de vida) con bajo peso. Esto indicaría que el período de gestación es suficiente para provocar un retraso en el crecimiento de los animales. Pero, cuando trabajamos con los animales peripuberales (muestreo de 25 días de vida) los del grupo tratado continúan con menor peso corporal. Sin embargo debe considerarse que ya no es solo por el efecto de la gestación sino por la suma de efectos a lo largo de la vida porque también los animales tratados se alimentaron menos que sus controles durante la lactación (aunque con menor control sobre el consumo individual). Esta diferencia se continúa en el tiempo ya que los animales adultos (100 días de vida) también presentan diferencias de peso corporal, lo cual indica un efecto de programación fetal. Hay que tener en cuenta que se trata de animales adultos que tuvieron 75 días de alimentación *ad libitum* para compensar eventuales efectos de programación fetal y no lo lograron (Genovese et al. 2010). Además del peso corporal, el tratamiento siempre afectó el peso testicular a las diferentes edades estudiadas. Es decir que fueron animales más livianos y que sus testículos también lo fueron, siendo esto consistente con trabajos anteriores que establecen una alta correlación entre el peso corporal y el peso testicular en otras especies y se corrobora en el presente (Bredd & Taylor, 2000).

Desde el punto de vista histológico encontramos un menor número de CS totales en los animales tratados a todas las edades muestreadas. En este punto es importante tener en cuenta que el cálculo del número de CS totales es proporcional al peso testicular, por lo tanto es esperable que animales livianos tengan testículos más livianos y por lo tanto, menos CS en total. Además, existe una alta correlación entre el número de CS y el número de espermatozoides producidos diariamente (Russell & Peterson, 1984; Brendtson & Thompson et al. 1990), por lo que este hallazgo indica un menor número de espermatozoides producidos por animal adulto que sufrió un tratamiento nutricional negativo en etapas tempranas de la vida. Un hallazgo más interesante es que en los animales adultos también encontramos un menor número de CS por corte transversal de túbulo seminífero (Genovese et al. 2010); en este sentido mencionamos en antecedentes la importancia de estas células para mantener la arquitectura del túbulo seminífero e inducir la diferenciación de otras células en el testículo, como por ejemplo las células mioides. Sin embargo, al estudiar la morfometría testicular de los animales neonatos y púberes no encontramos menor número de CS por corte. Esto indicaría que entre los

muestreos de pubertad (25 días de vida) y de adultos (100 días de vida) podrían haber habido más cambios, en una etapa en la que los animales ya estaban comiendo *ad libitum*. Una explicación alternativa sería que las CS tuvieron alterada su longevidad. En suma, son necesarios otros estudios, con otras herramientas, para explicar las antedichas diferencias. Más adelante se discutirán los datos concernientes a la proliferación y muerte de estas y otras células.

Número de células mioides y gonocitos

Analizando los datos de las CM, encontramos que la subnutrición durante la gestación afectó el número de células mioides totales a los 2 días de vida. Este dato se explica en parte porque los animales tratados tienen menor peso testicular, y esto influye en el cálculo de las CM totales. Sin embargo, en las otras edades no hay diferencias en el número de estas células aun cuando el testículo de los animales tratados fue más liviano. Por un lado hay que recordar que las células mioides se diferencian de sus precursoras, presentes en el testículo, a lo largo de toda la vida del animal (Nurmio et al. 2012), por lo que sería razonable pensar que a lo largo de la vida este posible desbalance se puede corregir diferenciando nuevas células mioides. Este proceso está mediado por factores diferenciadores paracrinos que producen las CS (Wen et al., 2016). Y si bien el número de CS es menor en animales tratados en todas las edades estudiadas (Genovese et al. 2010 y 2011), es posible que a los 2 días de vida la célula que esté priorizada en su división sea la CS y no otra estirpe celular. Las CS se multiplican durante un corto período de la vida, y su pico máximo es en el entorno de los 20 días de gestación en la rata (Orth, 1982), por lo que en el primer muestreo (2 días de vida) la prioridad de recursos para multiplicarse la tendrían las CS.

En cuanto al número de gonocitos, es claro que la diferencia entre los grupos tratados y controles de igual edad está influida por el peso testicular, y esto no es menor teniendo en cuenta que los animales tratados presentan menos peso testicular y corporal al nacer. Estas células a los 2 días de vida no tienen mucha actividad de multiplicación, principalmente se encuentran migrando con el correr de los días hacia su posición final en las regiones basales del epitelio seminífero. A los dos días se ubican centralmente en el cordón seminífero.

VARIABLES ESTUDIADAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Receptor de andrógenos

No encontramos diferencias en el índice de positividad (IP) del RA en las células estudiadas en adultos, lo que sugiere que ellas responden a los niveles de andrógenos locales en la misma forma que sus controles, sin que influya demasiado la historia previa en la expresión del receptor.

Un parámetro interesante para medir podría haber sido la concentración de andrógenos (testosterona) en sangre, y de hecho esta variable podría haber sido complementaria al IP de los RA. Lamentablemente en nuestras condiciones experimentales fue muy difícil medir la concentración de estas hormonas. En el muestreo de 2 días de vida es prácticamente imposible tomar suero suficiente para hacer medidas. Si bien a los 25 y 100 días los volúmenes de sangre en los animales son mayores, la naturaleza pulsátil en

la producción hormonal habría hecho necesario tomar muchas muestras de sangre a lo largo del tiempo en cada animal (o, en su defecto, tener un número de animales más elevado) y lamentablemente no fue posible la antedicha colecta. Sin embargo, sabemos que la producción de RA es estimulada a nivel local por andrógenos producidos por las CL (revisión: Wang et al. 2009). Por lo tanto, una forma indirecta de estudiar la concentración de esta hormona es estudiando la abundancia relativa del receptor específico que aparece en respuesta a los andrógenos. Queda claro que al no disponer de datos sobre la concentración hormonal, eventuales diferencias en la relación entre concentración de andrógenos e IP de su receptor no fueron estudiables, y esto fue una limitación en nuestro estudio. Estos receptores son fundamentales para que el testículo cumpla la función gametogénica normal, y especialmente deben presentarlos las CS y CM (O'Hara & Smith, 2015).

La diferencia encontrada en neonatos y púberes podría indicar que en etapas tempranas de la vida las CM no son capaces de producir RA normalmente. Esto podría tener consecuencias futuras sobre el testículo y sus funciones ya que en otros órganos se ha establecido la relación entre la expresión del RA y el desarrollo (por ejemplo) del cerebro en el macho (Yamada et al. 2015), por lo tanto podría haber alteraciones futuras que no logramos medir con nuestras herramientas.

Por otra parte, el mismo fenómeno ocurre en CS en neonatos, pero cuando llegan a adultos las diferencias desaparecen en las células estudiadas. Esto podría indicar que ambas células (CS y CM) en adultos tratados, pueden sintetizar RA en abundancia similar a los animales controles. Por lo tanto desde el punto de vista teórico esto indicaría que la espermatogénesis no estaría perjudicada por una falta de sensibilidad a los andrógenos, al menos en los niveles de intensidad reportados en nuestro experimento.

Cuando estudiamos la evolución del IP a lo largo del experimento, es decir, comparando entre edades estudiadas, encontramos que los IP en las CS y mioides presentan variaciones a lo largo de la vida pero que estas son muy menores, si las comparamos con el IP de las CL, especialmente durante la pubertad. En este sentido, está establecido que las CS muestran expresión relativamente estable de AR a lo largo de la vida, mientras que las células de Leydig muestran un pico a la edad de la pubertad (Abd El-Meseeh et al. 2016).

Células en apoptosis y proliferación (caspasa 3 y PCNA positivas)

Hasta donde sé, este es el primer trabajo que estudia los efectos de la programación fetal en la dinámica de proliferación/apoptosis en las células de Sertoli (CS) y células de Leydig (CL), sin embargo con las técnicas utilizadas ningún efecto del tratamiento fue encontrado.

En cuanto a las CS, la expectativa estaba en que el menor número de estas células por corte transversal de túbulo seminífero a los 100 días se explicara con la muerte prematura o la falta de proliferación celular. Teniendo en cuenta que el pico de proliferación de estas células se da a los 20 días de gestación, es posible que la disminución de la proliferación estuviera afectada en etapas fetales, incluso antes (posiblemente entre los 14 y los 20 días de gestación). Por lo que estudios similares al

presente pero en torno a los 20 días de gestación podrían ser útiles para estudiar más detalladamente la proliferación de las CS.

La otra alternativa que exploramos fue que hubiera más CS en apoptosis y, aunque no encontramos efecto del tratamiento en ambos grupos, vimos que el porcentaje de CS caspasa 3 positivas disminuyó a medida que las crías envejecieron, lo que tiene mucho sentido si tenemos en cuenta que no hay multiplicación de CS posterior a los 17,5 días post nacimiento. Es decir, se trata de células muy longevas, casi tanto como el mismo animal. Esto parece indicar que la apoptosis de las CS durante etapas tempranas de la vida es un mecanismo utilizado en remodelar o moldear la arquitectura testicular y que recién en etapas adultas se alcanza una estabilidad morfofuncional en la población de CS y su vínculo con la estructura y la función del túbulo seminífero. Por otro lado, la mayor variabilidad en animales de 100 días de vida se podría deber a que no todos los animales responden similarmente a los efectos de la programación fetal por subnutrición en las células testiculares, y por lo tanto, aumenta la variabilidad entre individuos. Parece necesario estudiar estos efectos a más largo plazo, por ejemplo en animales adultos maduros.

En cuanto a la apoptosis de las CL, tampoco vemos diferencias entre grupos y sí vemos el mismo efecto que en las CS. En este caso para la interpretación hay que tener en cuenta que las CL se diferencian a partir de sus precursoras toda la vida. Esto explicaría la mayor proporción de células CL positivas a caspasa 3 aunque no haya diferencia en la dinámica poblacional de las CL.

En cuanto a las CM, encontramos efecto del tratamiento en el porcentaje de células en apoptosis en animales de 100 días, donde la proporción de células expresando caspasa 3 es mucho mayor en el grupo tratado. Esto se vincularía directamente con el menor número de células de Sertoli por corte de túbulo seminífero en los animales de la misma edad, ya que está establecido que las CS son quienes mantienen el número de CM estimulando la diferenciación a partir de sus células precursoras (Rebourcet et al. 2014a).

Por otra parte, se estima que las ratas macho (al menos en la cepa Wistar) alcanzan su madurez sexual entre los 90 y 100 días de vida (Robb et al. 1978; Lucio et al 2013). Esto quiere decir que en cuanto alcanzan la madurez sexual en nuestras condiciones presentan menos CS y más CM en proceso de apoptosis, lo que confirmaría un efecto de programación fetal, no en el número de CM por corte (a esta edad) pero sí en la proporción de células en proceso de muerte.

Correlaciones

En referencia al estudio de correlaciones, encontramos que el número de CS por corte transversal de túbulo seminífero estaba positivamente correlacionado con el índice de positividad del RA en estas mismas células, tanto a los 25 como a 100 días de vida. Esto puede ser explicado por el efecto positivo que las CS tienen sobre la proliferación y la función de las CM. Quizá, un número mayor de CS a nivel local estimula la sensibilidad de las CM a los andrógenos. Igualmente, la correlación inversa entre CS y el % de CM caspasa 3 positivas (y, por lo tanto, cercanas a la apoptosis), puede ser explicada porque las CS estimulan la sobrevivencia de las CM. Estas correlaciones no demuestran que

estos mecanismos ocurran, pero al menos sugieren lineamientos de experimentos futuros para poder determinarlo.

Las variables de las CL no fueron afectadas; eso no sorprende si se considera que las CL preservan su capacidad proliferativa a lo largo de la vida y que, además, hay células precursoras en el intersticio testicular que pueden diferenciarse a CL en respuesta a las necesidades endocrinas del testículo y del organismo (Hardy et al., 1989).

Consideraciones finales

Considerando el efecto del tratamiento como un todo, podría ser que el tratamiento termine siendo más intenso durante la gestación que después, lo que podría explicar que la mayor parte de las diferencias ocurren a los 2 y 25 días de vida y no posteriormente. En este sentido hay trabajos que muestran que los efectos de programación fetal por subnutrición entre el nacimiento y la pubertad no superan en importancia a los efectos de dichas influencias ambientales durante la gestación en el impacto sobre el peso del testículo (Hlinak et al. 1977)

Parte de este fenómeno podría ser explicado por el manejo alimentario de los animales en nuestro experimento. Si bien durante la gestación los animales pasaron estrés nutricional, en la lactación no pudimos controlar lo que cada cría mamaba. Y por lo tanto, la precisión con la que se llevó a cabo la subnutrición fue algo menor: durante la gestación tampoco se puede controlar cuántos nutrientes recibe cada feto, y es sabido que existe competencia entre ellos por nutrientes, pero en términos generales, la competencia intrauterina parece implicar un acceso más homogéneo que la competencia durante la lactación, ya que si bien en el útero los animales reciben una irrigación diferente según la posición en que se encuentran, esto es constante a lo largo de toda la gestación. Por otra parte las crías en la misma camada lactan estableciendo un orden que no pudo ser manipulado para las condiciones de nuestro experimento, y esto implica en los hechos que los animales más dominantes ingieran más leche, consumiendo incluso la de sus hermanos subordinados. Además, como pueden comer ración progresivamente desde el día 15 en adelante y sus madres pueden y de hecho les proveen acceso a la misma, es posible que el comportamiento de los animales (madres y crías), favorezca el crecimiento compensatorio en la medida que comieran más ración cuando la leche no alcanzara para crecer según sus requerimientos.

Por lo tanto, si bien las CM son similares a las CL en cuanto a su capacidad para compensar su número en etapas relativamente avanzadas de la vida, hemos demostrado que las CM sí portan secuelas, ya que en el grupo T las CM fueron menos sensibles a los andrógenos que las del grupo C. El hecho que los andrógenos estén relacionados a la contractilidad y secreción de las CM, podría implicar que las funciones anteriormente mencionadas puedan estar afectadas durante la etapa adulta en animales que fueron subnutridos durante etapas tempranas de la vida.

CONCLUSIONES

1 La subnutrición durante la gestación y la lactación determinó un menor número de CS total por animal a todas las edades estudiadas y un menor número de CS por corte transversal de túbulo seminífero a los 100 días de vida. El número de CL no fue

afectado por el tratamiento y a su vez el número total de gonocitos fue menor en los animales 2 días de vida que fueron subnutridos durante la gestación.

2 La inmunoexpresión de RA fue afectada en los animales durante la gestación (2 días de vida) y la gestación más la lactación (25 días de vida) tanto en las CS como en las CM. Sin embargo a los 100 días de vida no hubo alteración de la inmunoexpresión de RA en ninguna célula en animales tratados con relación a sus controles.

3 La subnutrición durante la gestación y la lactación aumentó el porcentaje de células mioides en proceso de apoptosis animales de 100 días de vida.

4 La subnutrición durante la gestación y la lactación no alteró el porcentaje de células en proliferación a ninguna edad estudiada.

En conclusión, hubo programación fetal por subnutrición sobre la máxima capacidad potencial de producción de espermatozoides, porque disminuyó el peso testicular, disminuyó el número de CS total y por corte en adultos. Por otra parte la dinámica poblacional de las CM fue afectada por la programación fetal, con tasas más altas de CM en apoptosis, y por tanto, la histofisiología testicular de esos animales en edad madura puede ser afectada por los tratamientos estudiados.

Perspectivas futuras

En este trabajo centramos el estudio en los efectos de la restricción nutricional aplicada durante etapas tempranas de la vida sobre la vida adulta joven. Creemos que sería interesante estudiar el impacto de la subnutrición durante la vida fetal y prepuberal sobre animales machos adultos maduros. Con los resultados obtenidos hasta el momento es claro que más de una célula testicular es candidata a presentar alteraciones al menos en su número y posiblemente esté alterada la morfología y la histofisiología testicular.

En el mismo diseño podría ser interesante estudiar la fertilidad de los machos sometidos al tratamiento, y a diferentes edades. Este punto conlleva una gran cantidad de animales así como mucho más tiempo. Sin embargo podría arrojar datos contundentes y complementarios de las conclusiones presentadas en esta tesis, ya no del testículo como órgano, o de sus células puntualmente, sino de todo el tracto genital masculino en su conjunto y los aspectos epigenéticos que podrían estar en juego.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abd El-Meseeh NA, El-Shaarawy EA, AlDomairy AF, Sehly RA. (2016). Changes in rat testis morphology and androgen receptor expression around the age of puberty. *Ann Anat* 205:37-44.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1996). *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega S.A. Barcelona.
3. Angelopoulou R, Balla M, Lavranos G, Chalikias M, Kitsos C, Baka S, Kittas C. (2008). Sertoli cell proliferation in the fetal and neonatal rat testis: a continuous phenomenon? *Acta Histochem* 110 (4):341-7.
4. Barker DJ1, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. (1993). Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. 1993 Apr 10:341(8850):938-41.
5. Benton L, Xin Shan M, Hardy P. (1995). Differentiation of adult Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:661-68.
6. Berndtson WE, Thompson TL. (1990). Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. *J Androl* 11:429-35.
7. Bielli A, Pérez R, Pedrana G, Milton JT, Lopez A, Blackberry MA, Duncombe G, Rodriguez-Martinez H, Martin GB. (2002). Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod Fertil Dev* 14:333-7.
8. Bittencourt Brasil F, Silva Faria T, Barcellos Sampaio FJ, da Fonte Ramos C. (2010). The effect of maternal malnutrition during lactation on the endometrial ERalpha expression, collagen type, and blood vessels in the rats offspring at puberty. *Anat Rec* 293:162-70.
9. Boos A, Meyer W, Schwartz R, Grunert E. (1996). Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 44: 11-21.
10. Brasil FB, Faria TS, Costa WS, Sampaio FJ, Ramos CF. (2005). The pups' endometrium morphology is affected by maternal malnutrition during suckling. *Maturitas* 51:405-12.
11. Breed WG & Taylor J. (2000). Body mass, testes mass, and sperm size in murine rodents. *Journal of Mammalogy* 81: 758-768.
12. Chawnschang Chang, Soo Ok Lee, Ruey-Sheng Wang, Shuyuan Yeh, Ta-Min Chang. (2013). Androgen Receptor (AR) Physiological Roles in Male and Female Reproductive Systems: Lessons Learned from AR-Knockout Mice Lacking AR in Selective Cells. *Biol Reprod* 89(1): 21.
13. Combes AN, Wilhelm D, Davidson T, De-jana E, Harley V, Sinclair A, Koopman P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol* 326:112-120.
14. Cooper CR, Bhatia JK, Muenchen HJ, McLean L, Hayasaka S, Taylor J, Poncza PJ, Pienta KJ. (2002). The regulation of prostate cancer cell adhesion to human bone marrow endothelial cell monolayers by androgen dihydrotestosterone and cytokines. *Clin Exp Metastasis* 19(1):25-33.
15. da Silva VA Jr, Vieira AC, Pinto CF, de Paula TA, Palma MB, Lins Amorim MJ, Amorim AA Jr, Manhães-de-Castro R. (2006). Neonatal treatment with naxolone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. *Reprod Nutr Dev* 46(2):157-66.

16. Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales, C. N. (1996). Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr* 76:591-603.
17. Desai M, Hales CN. (1997). Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol Rev Camb Philos Soc* 72:329-48.
18. Dimitriadis F, Tsiampali C, Chaliasos N, Tsounapi P, Takenaka A, Sofikitis N. (2015). The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones* 14:479-503.
19. Ellis LC, Groesbeck MD, Farr CH, Tesi RJ. (1981). Contractility of seminiferous tubules as related to sperm transport in the male. *Arch Androl* 6(4):283-94.
20. Engelbregt MJ, Houdijk ME, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. (2000). The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatr Res* 48:803-7.
21. Escott GM, da Rosa LA, Loss Eda S. (2014). Mechanisms of hormonal regulation of Sertoli cell development and proliferation: a key process for spermatogenesis. *Curr Mol Pharmacol* 7:96-108.
22. Fadeel B, Ottosson A, Pervaiz S. (2008). Big wheel keeps on turning: apoptosome regulation and its role in chemoresistance. *Cell Death Differ* 15(3):443-52.
23. Fawcett, DW, Heidger PM, Leak LV. (1969). Lymph vascular system of the interstitial tissue of the testis as revealed by electron microscopy. *J. Reprod. Fertil.* 19:109-119.
24. Fernández D, Bertoldi MV, Gómez L, Morales A, Callegari E, Lopez LA. (2008). Identification and characterization of Myosin from rat testicular peritubular myoid cells. *Biol Reprod* 79(6):1210-8.
25. Foote RH. (1978). Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions. *J Anim Sci* 47 Suppl 2:1-11.
26. Gluckman PD, Hanson MA, Pinal C. (2005). The developmental origins of adult disease. *Matern Child Nutr* 1(3):130-41.
27. 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”. *Reproduction in Domestic Animals* 45:233–236.
28. Genovese P, Riaño V, Alzugaray S, Pombo C, Bielli A. (2011). Undernutrition from fetal life to puberty, fetal programming and compensatory growth in rat testes. En: *Undernutrition: Effects, Causes and Management* (2011). Ed. Jason E.Lee. 1er ed. New York, Cap. 4, pp.73-86.
29. Griffin DK, Ellis PJ, Dunmore B, Bauer J, Abel MH, Affara NA. (2010). Transcriptional profiling of luteinizing hormone receptor-deficient mice before and after testosterone treatment provides insight into the hormonal control of postnatal testicular development and Leydig cell differentiation. *Biol Reprod.* 82(6):1139-50.
30. Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL. (1989). Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* 124(2):762-70.
31. Hardy MP, Gao HB, Dong Q, Ge R, Wang Q, Chai WR, Feng X, Sottas C. (2005). Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res* 322(1):147-53.

32. Hay W, W Jr, Brown LD, Rozance PJ, Wesolowski SR, Limesand SW. (2016). Challenges in nourishing the intrauterine growth-restricted foetus - Lessons learned from studies in the intrauterine growth-restricted foetal sheep. *Acta Paediatr* 105:881-9.
33. Herring CM, Bazer FW, Johnson GA, Wu G. (2018). Impacts of maternal dietary protein intake on fetal survival, growth, and development. *Exp Biol Med*. 246:525-533.
34. Hlinák Z, Franková S. (1977). Sexual behaviour of male rats rehabilitated after early protein-calorie malnutrition. *Physiol Bohemoslov* 26(1):1-7.
35. Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ. (1992). Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med* 201(2):125-40.
36. Ithurralde J, Genovese P, Abud MJ, Pérez R, López A, Bielli A. (2017). Oferta de forraje de campo natural durante la gestación en ovinos: inmunopositividad de PCNA en los músculos Psoas mayor, gluteobiceps y Semimembranoso de fetos ovinos de 70 días de desarrollo. *Jornadas Técnicas Veterinarias*, 16-17 nov. 2017.
37. Jost A, Magre S, Angelopoulou R. (1981). Early stages of testicular differentiation in the rat. *Hum Genet* 58(1):59-63.
38. Kelman Z. (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14(6):629-40.
39. Kotsampasi B, Balaskas C, Papadomichelakis G, Chadio SE. (2009). Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Anim Reprod Sci* 114:135-47.
40. Kuopio T, Tapanainen J, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I. (1989). Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development* 107(2):213-20.
41. Lacy D, Rotblat J. (1960). Study of normal and irradiated boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat. *Exp Cell Res* 21:49-70.
42. Lea RG, Andrade LP, Rae MT, Hannah LT, Kyle CE, Murray JF, Rhind SM, Miller DW. (2006). Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. *Reproduction*, 131:113-24.
43. Liu XL, Chen XY, Wang ZC, Shen T, Zhao H. (2013). Effects of exposure to bisphenol A during pregnancy and lactation on the testicular morphology and caspase-3 protein expression of ICR pups. *Biomed Rep* 1(3):420-424.
44. Liu Y, He S, Zhang Y, Xia W, Li M, Zhang C, Gao F. (2015). Effects of Intrauterine Growth Restriction During Late Pregnancy on the Development of the Ovine Fetal Thymus and the T-Lymphocyte Subpopulation. *Am J of Reprod Immunol* 74:26-37.
45. Lucio RA, Tlachi-López JL, Eguibar JR, Ágmo A. (2013). Sperm count and sperm motility decrease in old rats. *Physiol Behav* 110-111:73-9.
46. Maekawa M, Kamimura K, Nagano T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol* 59(1):1-13.
47. Magre S, Jost A. (1991). Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *J Electron Microscop Tech* 19(2):172-88.
48. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62:609-14.
49. Marshall GR, Plant TM. (1996). Puberty occurring either spontaneously or induced precociously in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) is associated with a marked proliferation of Sertoli cells. *Biol Reprod* 54:1192-9.

50. Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR Jr, Garrels JI. (1984). Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309(5966):374-6.
51. McKinnell C, Sharpe RM. (1995). Testosterone and spermatogenesis: evidence that androgens regulate cellular secretory mechanisms in stage VI-VIII seminiferous tubules from adult rats. *J Androl* 16:499-509.
52. McMillen IC, Adams MB, Ross JT, Coulter CL, Simonetta G, Owens JA, Robinson JS, Edwards LJ. (2001). Fetal growth restriction: adaptations and consequences. *Reproduction* 122:195-204.
53. Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. (2001). Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65:660-71.
54. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. (1978). Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121(6):2228-34.
55. Muzi-Filho H, Souza AM, Bezerra CG, Boldrini LC, Tayika CM, Oliveira FL, Nesi RT, Valença SS, Silva AM, Zapata-Sudo G, Sudo RT, Einicker-Lamas M, Vieyra, A, Lara LS, Cunha VM. (2015). Rats undernourished in utero have altered Ca²⁺ signaling and reduced fertility in adulthood. *Physiol Rep* 3(10):e12587.
56. Nastiuk KL, Clayton DF. (1994). Seasonal and tissue-specific regulation of canary androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*, 134:640-9.
57. Noden DM. (1990). *Embriología de los animales domésticos*. Ed. Acribia, S.A. 1a ed. Zaragoza.
58. Nurmio M, Kallio J, Adam M, Mayerhofer A, Jahukainen K. (2012). Peritubular myoid cells have a role in postnatal testicular growth. *Spermatogenesis* 2: 79-87.
59. O'Hara L, Smith LB. (2015). Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29:595-605.
60. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 351(1-2):41-58.
61. O'Shaughnessy PJ. (2014). Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 29:55-65.
62. Orth JM. (1982). Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* (4):485-92.
63. Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, 122:787-94.
64. Pelletier G, Labrie C, Labrie F. (2000). Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 165:359-70.
65. Pourhassanali N, Roshan-Milani S, Kheradmand F, Motazakker M, Bagheri M, Saboory E. (2016). Zinc attenuates ethanol-induced Sertoli cell toxicity and apoptosis through caspase-3 mediated pathways. *Reprod Toxicol* 61:97-103.
66. Qu W, Ma LP, Yan HY, Liu S, Liu HX, Chen T, Hou LF, Ping J. (2017). Enhanced thymocyte apoptosis induced by maternal undernutrition in late gestation results in declined mature T cells in rat fetal thymus. *Environ Toxicol Pharmacol* 56:50-55.
67. Ramos CdF, da Silva AM, Costa WS, Sampaio FJ. (2006). Stereological evaluation of the seminiferous tubules of rats after maternal undernutrition during the lactation period. *Urol Int* 76:63-6.

68. Rebourcet D, O'Shaughnessy PJ, Pitetti JL, Monteiro A, O'Hara L, Milne L, Tsai YT, Cruickshanks L, Riethmacher D, Guillou F, Mitchell RT, van't Hof, R, Freeman TC, Nef S, Smith LB. (2014). Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis. *Development*, 141:2139-49.
69. Rebourcet D, O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Milne L, Cruickshanks L, Jeffrey N, Guillou F, Freeman TC, Mitchell RT, Smith LB. (2014). Sertoli cells maintain Leydig cell number and peritubular myoid cell activity in the adult mouse testis. *PLoS One*, 9 (8):e105687.
70. Resnick O, Morgane PJ, Hasson R, Miller M. (1982). Overt and hidden forms of chronic malnutrition in the rat and their relevance to man. *Neurosci Biobehav Rev* 6:55-75.
71. Rey RA, Musse M, Venara M, Chemes HE. (2009). Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc Res Tech* 72:787-95.
72. Robb GW, Amann RP, Killian GJ. (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil*. 54(1):103-7.
73. Rodríguez-González GL, Reyes-Castro LA, Vega CC, Boeck L, Ibáñez C, Nathanielsz PW, Larrea F, Zambrano E. (2014). Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. *Age (Dordr)* 36(6):9721.
74. Russell LD, Peterson RN. (1984). Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fertil* 70:635-641.
75. Roosen-Runge EC, Anderson D. (1959). The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. *Acta Anat (Basel)* 37:125-37.
76. Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM. (1990). Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 127: 3180-6.
77. Sertoli E. (1865). Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. *Morgagni* 7:31-40.
78. Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125:769-84.
79. Shi SH, Jiang L, Xie HY, Xu J, Zhu YF, Zheng SS. (2015). The effect of secondary cholestasis on the CD68-positive and CD163-positive macrophage population, cellular proliferation, and apoptosis in rat testis. *J Reprod Immunol* 110:36-47.
80. Simanainen U, McNamara K, Davey RA, Zajac JD, Handelsman DJ. (2008). Severe subfertility in mice with androgen receptor inactivation in sex accessory organs but not in testis. *Endocrinology*, 149:3330-8.
81. Smith LB, Walker WH. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell & Dev Biol* 30:2-13.
82. Stanley E, Lin CY, Jin S, Liu J, Sottas CM, Ge R, Zirkin BR, Chen H. (2012). Identification, proliferation, and differentiation of adult Leydig stem cells. *Endocrinology* 153(10):5002-10.
83. Steinberger A, Steinberger E. (1971). Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biol Reprod* 4:84-7.

84. Tan KA, De Gendt K, Atanassova N, Walker M, Sharpe RM, Saunders PT, Denolet E, Verhoeven G. (2005). The role of androgens in Sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology* 146(6):2674-83.
85. Teixeira CV, Silandre D, de Souza Santos AM, Delalande C, Sampaio FJ, Carreau S, da Fonte Ramos C. (2007). Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J Endocrinol* 192:301-11.
86. Tran N, Servos G, Haider SG. (2006). Ultrastructure of cell contacts of fetal and adult Leydig cells in the rat: a systematic study from birth to senium. *Anat Embryol (Berl)*. 211(4):273-82.
87. Toledo FC, Perobelli JE, Pedrosa FP, Anselmo-Franci JA, Kempinas WD. (2011). In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. *Reprod Biol Endocrinol* 9:94.
88. Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA. (1994). Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134:2307-16.
89. Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C. (2009). Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev*. 30(2):119-32.
90. Weibel ER. (1979). Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades. *Bull Eur Physiopathol Respir* 15:999-1013.
91. Wen Q, Wang Y, Tang J, Cheng CY, Liu YX. (2016). Sertoli Cell Wt1 Regulates Peritubular Myoid Cell and Fetal Leydig Cell Differentiation during Fetal Testis Development. *PLoS One*, 11, e0167920.
92. Woodall SM, Breier BH, Johnston BM, Gluckman PD. (1996). A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: effects on the somatotrophic axis and postnatal growth. *J Endocrinol* 150:231-42.
93. Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE. (2006). Board-invited revision: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. *J Anim Sci* 84:2316-37.
94. Yamada S, Ohoya M, Takanami K, Matsuda KI, Kawata M. (2015). Critical role of androgen receptor in the postnatal period in male sexual behavior in rats. *Neurosci Lett* 16;609:189-93.
95. Ye L, Li X, Li L, Chen H, Ge RS. (2017). Insights into the Development of the Adult Leydig Cell Lineage from Stem Leydig Cells. *Front Physiol* 28;8:430
96. Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, Wang RS, Chang YJ, Mendis-Handagama C, Hu L, Lardy H, Chang C. (2006). Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci* 103(47):17718-23.
97. Yang ZW, Wreford NG, de Kretser DM. (1990). A quantitative study of spermatogenesis in the developing rat testis. *Biol Reprod* 43(4):629-35.
98. Zhu LJ, Hardy MP, Inigo IV, Huhtaniemi I, Bardin CW, Moo-Young AJ. (2000). Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod* 63:368-76.



ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 25 de octubre de 2018

TRIBUNAL: Dr. Marcelo Rodríguez Piñón (Presidente), Dr. Jorge Gil, Dr. Álvaro López

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
2.924.423-9	GENOVESE, Patricia	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

FIRMA

Dr. Marcelo Rodríguez Piñón (Presidente)

Dr. Jorge Gil

Dr. Álvaro López

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Tesis de Maestría pueden ser:
B.B.B. - 6 , o S.S.S. - 12