

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“Efecto de la subnutrición durante la gestación y la lactación  
sobre la mitosis, la apoptosis y la expresión de receptor de  
andrógeno en testículo de rata”**

**Por**

**Emiliano Andrés Herrera Hernández**

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

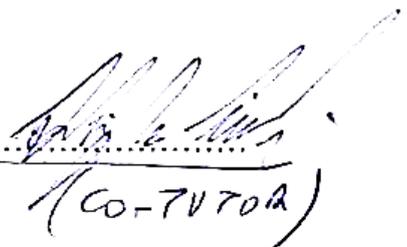
Orientación: Tecnología de los Alimentos.

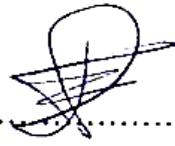
MODALIDAD: Ensayo experimental.

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2022**

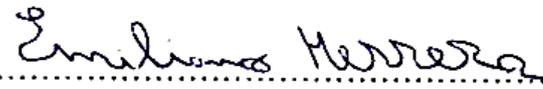
PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:.....  GRACELA PEDRAZA

Segundo Miembro (Tutor):.....    
(CO-TUTOR)

Tercer Miembro:.....  D. Fil

Fecha:..... 8/12/2022

Autor:.....   
Bach. Emiliano Herrera Hernández

### **AGRADECIMIENTOS:**

Agradezco a la Universidad de la República por esta carrera que pude realizar, por la beca que me permitió participar en un intercambio de estudiantes y ampliar mi visión del mundo y de la carrera.

A la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEDEC) de la Facultad de Veterinaria, que me contrató durante un año, en el cual me aproximé por primera vez a la ciencia y a la actividad docente, que hoy en día, y espero que siga así, son mi trabajo.

Agradezco a la Dra. Patricia Genovese, quien fue en el año 2011, junto al Dr. Bielli, mi tutora CIDEDEC y hoy en día lo es nuevamente en esta tesis. Gracias por las muchas lecciones, palabras de aliento y por ser una verdadera fuerza de la naturaleza que me ha impulsado en esta carrera.

Al Dr. Alejandro Bielli, jefe de la unidad académica de Histología y Embriología en la que trabajo, gracias a él es que tantos hemos sido “inventados” en este mundo de la investigación y la docencia, por tantos consejos y palabras sabias.

Gracias a mi familia, y en especial a mis padres, Héctor y Sandra, no solo por darme una infancia feliz, un hermano con el cual nunca aburrirme, sino que además me enseñaron desde temprano lo importante de estudiar, estimulando mi curiosidad, mis ganas de aprender y que además, y esto no es menor, fueron mis benefactores desinteresados durante la mayoría de mi carrera.

Agradezco a mi pareja, Stefanía, con quien tuvimos nuestra segunda hija hace tan solo 24 días. Es casi imposible expresar lo agradecido que estoy del día en que nuestros caminos se cruzaron, y de todos los días desde entonces, gracias por compartir tu vida conmigo y por el hogar que formamos juntos.

Agradezco a mis hijas, Emma y Belén por llegar a mi vida y enseñarme que no sabía nada, por hacerme feliz al decirme papá o cualquier sonido que salga de sus bocas, porque sus voces me encantan, por estudiar junto a mí, sobre todo a Emma, a la que le tocó estudiar legislación con tan solo unos pocos meses de vida.

Por último, me gustaría agradecer a mis mascotas, a las que están y a las que ya no, gracias, Diana, Doly, Lana, Oso, Batman, Lina, Mini, Tana, Tina, Leia, Calabaza, y en particular gracias Loli, la cual estoy seguro, es una gran responsable de que yo eligiera la Veterinaria como mi carrera.

## TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PAGINA DE APROBACION.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
1. LISTA DE FIGURAS.....	5
2. RESUMEN.....	6
2.1. SUMMARY.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
5. HIPÓTESIS.....	16
6. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES.....	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
8. RESULTADOS .....	20
9. DISCUSIÓN.....	28
10. CONCLUSIONES.....	30
11. BIBLIOGRAFÍA.....	31

## 1. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

**Figura 1:** Diagrama que resume la fase experimental.

**Tabla 1:** Pesos corporales y testiculares

**Tabla 2:** Índice de positividad a la reacción de inmunohistoquímica para el receptor de andrógenos.

**Figura 2:** Cortes histológicos de testículos tratados con la técnica de inmunohistoquímica anti receptor de andrógenos.

**Tabla 3:** Porcentaje de células positivas a la reacción de inmunohistoquímica anti caspasa 3.

**Figura 3:** Cortes histológicos de testículos tratados con la técnica de inmunohistoquímica anti caspasa 3.

**Tabla 4:** Porcentaje de células positivas a la reacción de inmunohistoquímica para PCNA

**Figura 4:** Cortes histológicos de testículos tratados con la técnica de inmunohistoquímica anti PCNA.

## 2. RESUMEN

El objetivo planteado en esta tesis fue evaluar si la subnutrición materna durante la gestación y la lactación, produce programación fetal y a consecuencia de ello se ve afectada la histofisiología testicular. Con este fin se realizó un experimento utilizando ratas como modelo y fueron subnutridas durante la gestación y la lactación. Se registró peso corporal y testicular de animales controles y tratados. Sobre cortes histológicos de todos los testículos se aplicó las técnicas de inmunohistoquímica en testículos de animales de 2, 25 y 100 días de vida. Se evaluó la proporción de apoptosis y proliferación en células: de Sertoli (CS), Leydig (CL), mioides (CM) y gonocitos (G) (estas últimas solo a los dos días de vida). Por otra parte, se evaluó también por la misma técnica la abundancia relativa de receptor de andrógenos en los tipos celulares antes mencionados. El peso corporal y testicular se vio afectado negativamente por el tratamiento a todas las edades. No se encontraron diferencias en la tasa de apoptosis o de proliferación en las edades estudiadas en CS, G, ni CL. Por otro lado los animales tratados, a los 100 días de vida tuvieron un mayor número de CM en proceso de apoptosis que sus controles. Con respecto a la positividad del AR, fue menor en los animales tratados a los 2 y 25 días de vida en las CS y CM, pero esta diferencia no se mantuvo a los 100 días. Estos resultados mostraron que nuestro tratamiento produce programación fetal del testículo en la rata, no solo por producir testículos menos pesados, sino por aumentar el número de células mioides en apoptosis, las cuales cumplen un rol importante en el metabolismo de los andrógenos y en la fertilidad.

## 2.1. SUMMARY

The objective set out in this thesis was to evaluate whether maternal undernutrition during pregnancy and lactation produces fetal programming and as a result testicular histophysiology was affected. To this end, immunohistochemical techniques were performed on 5 µm thick histological sections of testicles from animals at 2, 25 and 100 days old, in order to evaluate the proportion of apoptosis and proliferation in Sertoli cells (SC), Leydig cells (LC), myoid cells (MC) and gonocyte (G), the latter only at two days of age. The relative abundance of androgen receptor in the aforementioned cell types which is essential for androgens to fulfill their fundamental role in testicular development and fertility was also evaluated. Body and testicular weight were negatively affected by treatment at all ages. No differences were found in the rate of apoptosis or proliferation at the ages studied in SC, G, or LC. The treated animals, at 100 days old, had a higher number of MC in the process of apoptosis than their controls. Regarding RA positivity, it was lower in treated animals at 2 and 25 days old in SC and MC, but this difference was not maintained at 100 days. These results showed that our treatment produces fetal programming of the testis in the rat, not only by producing lighter testes, but also by increasing the number of apoptotic myoid cells, which play an important role in androgen metabolism and fertility.

### **3. INTRODUCCIÓN:**

Los sistemas de producción animal se basan en tres pilares: la nutrición, la reproducción y la salud.

La alimentación es de los insumos más caros y limitantes para un sistema de producción. Por otra parte, la rentabilidad implica entre otros factores la obtención de la mayor cantidad de crías en la menor cantidad de tiempo posible, siempre y cuando los costos para lograrlo no sean excesivos. Esto implica que la selección genética realizada por el ser humano ha ido principalmente dirigida hacia los caracteres productivos. Un buen ejemplo de esto es la vaca lechera, la cual gesta y produce leche incluso cuando se encuentra en balance energético negativo. En este modelo productivo la madre, con su capacidad de ingestión de alimento restringida mecánicamente, debe distribuir la energía de los alimentos entre su feto en crecimiento y una alta producción de leche. Esto se puede agravar más en el caso de animales jóvenes que aún no terminaron de crecer. En este tipo de modelo parece inevitable generar un impacto sobre la cría que se está gestando y el efecto que se observa es el centro de numerosos trabajos de investigación.

El objetivo de esta tesis es conocer el impacto que tiene la subnutrición de las crías mientras dependen de la madre (durante la vida fetal y mientras son lactantes), sobre la histofisiología de los testículos de sus hijos en diferentes etapas de la vida ya sea como recién nacidos, prepúberes o adultos jóvenes, utilizando como modelo la rata.

### **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

#### **4.1. Definición de programación fetal**

Durante la gestación, tanto el ambiente uterino (determinado en gran medida por el ambiente en el que se encuentra la madre) como el ambiente durante las primeras etapas de vida (luego de nacer) tienen la capacidad de producir cambios duraderos que se observan en etapas posteriores de la vida. Este fenómeno es conocido como “programación fetal” (Desai y Hales, 1997).

Cuando un individuo es expuesto a condiciones adversas durante etapas críticas de su desarrollo, se producen respuestas adaptativas en donde se va a priorizar el crecimiento de órganos clave en detrimento de otros. Esto provoca alteraciones a nivel metabólico, las cuales deberían preparar a ese animal para sobrevivir en un ambiente nutricionalmente pobre. Estas alteraciones pueden tener consecuencias negativas cuando la nutrición postnatal se vuelve más abundante que la que recibió en el periodo prenatal (McMillen y Robinson, 2005). Algunos de los eventos que tienen la capacidad de alterar el desarrollo en etapas tempranas son la nutrición materna, ya sea en exceso o por ser deficitaria, los desórdenes endocrinos y las infecciones (Langley-Evans y McMullen, 2010).

Los efectos de la subnutrición durante periodos clave de la vida intrauterina o posnatal temprana (ya sea por restricción de algún nutriente o por restricción calórica) no solo retrasan el crecimiento, sino que producen cambios duraderos o incluso permanentes en el metabolismo, así como en la sensibilidad de los tejidos corporales a distintas hormonas. Estos cambios resultan en desarrollo anormal del individuo y en la aparición de enfermedades en etapas tardías de la vida. En humanos se ha demostrado que dichos cambios se vinculan a la aparición de diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, enfermedades renales, obesidad, hipertensión, osteoporosis y síndrome metabólico (Barker, 1995; Mandy y Nyirenda, 2018).

Los primeros indicios de estos fenómenos se observaron al realizar estudios epidemiológicos que correlacionaban la aparición de enfermedades cardíacas y respiratorias en personas adultas con la mortalidad maternal puerperal y la mortalidad neonatal prevalentes en los años en los que esas personas nacieron (Barker y Osmond, 1987; Barker, Osmond y Law, 1989). Esto se observó muy marcadamente en zonas empobrecidas de Europa y durante la segunda guerra mundial, cuando la dieta de las personas fue afectada fuertemente (Langley-Evans, 2006).

En ganado vacuno, la subnutrición materna durante la gestación temprana mostró terneros más livianos al comienzo de la etapa de cría, pero esta diferencia desapareció cuando llegaron a la pubertad. En el mismo experimento encontraron que el desarrollo ovárico también se vio afectado por la nutrición materna, con reducción de la cantidad de folículos antrales a los 16 meses de vida (Noya, Casasús, Ferrer y Albina, 2019).

En ovinos, la restricción nutricional materna en la gestación avanzada afectó negativamente los niveles de glucosa e IGF-1 en la etapa neonatal de los corderos. Los bajos niveles de IGF-1 durante la vida fetal y los primeros días de la vida posnatal afectaron el desarrollo reproductivo a los 60 días de vida (Hoffman et al., 2017).

En cuanto a la histofisiología del músculo, se observó que la subnutrición durante 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).

Por todo lo anterior sabemos entonces que la subnutrición durante las etapas tempranas de la vida, y en particular durante la gestación, provoca cambios duraderos o permanentes en parámetros metabólicos, fisiológicos y estructurales que en algunos casos son solo observables en etapas adultas.

#### **4.1.1. La rata como modelo para estudiar la programación fetal:**

La rata es utilizada hace décadas como modelo de subnutrición. En los ´70 ya encontraron diferencias en el tamaño corporal en ratas que mamaron en camadas pequeñas de 3 cachorros contra aquellas que lactaron en camadas grandes de 15 animales. Estos investigadores no solo descubrieron en la rata

efectos que hoy en día se describirían como programación por subnutrición temprana, sino que dependiendo del momento en el que se produjera el tratamiento dichos efectos negativos podían o no ser compensados más adelante en la vida (Widdowson y McCance, 1975).

Tras la alimentación materna durante la gestación y/o la lactación con una dieta hipo-proteica, se encontró que sus hijos presentaban retardo permanente en el crecimiento del hígado, los músculos, el páncreas y el bazo. Por otro lado se observó que otros órganos como el cerebro y el pulmón no fueron afectados (Desai y Hales, 1996).

En ratas, la subnutrición durante etapas tempranas de la vida retrasa el comienzo de la pubertad en machos y hembras (Engelbregt et al., 2000). Posteriormente se observó que cuando la restricción nutricional se realiza al final de la gestación (días 17 a 21) también ocurre un retraso en el comienzo de la pubertad en ratas macho (Matsuzaki et al., 2017).

En cuanto al sistema reproductor específicamente, está demostrado que el sistema reproductor de la rata es sensible a la programación fetal. En animales adultos subnutridos durante la gestación y la lactación se encontró menor desarrollo corporal, testicular y menor número de células de Sertoli, tanto por corte transversal de túbulo seminífero como total por testículo (Genovese, Núñez, Pombo y Bielli, 2010). Posteriormente se encontró este mismo efecto en neonatos a los que se subnutrió durante la gestación (Genovese, Riaño, Alzugaray, Pombo y Bielli, 2011), viéndose afectados diferentes parámetros de la histofisiología testicular. En este sentido, se encontró que los animales que son subnutridos durante la gestación y la lactación expresan menos receptores testiculares de IGF-1 cuando son adultos (Pedrana et al., 2020).

## **4.2. La gónada masculina**

Los órganos reproductores 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 el embrión se originan los esbozos de los órganos reproductivos y persisten en el estadio indiferenciado de la organogénesis (estadio de la gónada indiferenciada). Finalmente se desarrollan las características sexuales específicas, y degeneran 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 y de Lahunta, 1990). La diferenciación del testículo comienza en la rata entre los días 12 y 13,5 de gestación (Magre y Jost, 1991; Kuopio, Tapanainen, Pelliniemi y Huhtaniemi, 1989). Cuando el feto llega a 15,5 días comienza la actividad esteroideogénica y por lo tanto produce testosterona (Huhtaniemi y Pelliniemi, 1992). En el testículo fetal los gonocitos son los precursores de las espermatogonias, que son las células adultas a partir de las cuales se van a formar los espermatozoides. En la rata entre los días 3 y 4 post parto, los gonocitos migran desde el centro del cordón testicular (precursor del túbulo seminífero) hacia la membrana basal y se diferencian en espermatogonias tipo A (Thuillier et al., 2010). La capacidad de producir espermatozoides aparece en la pubertad; esto ocurre en la rata, pasados los 30 días de vida (Abd El-Meseeh, El-Shaarawy, AlDomairy y Sehly, 2016), y mantiene estas funciones endocrinas y exocrinas a lo largo de toda la vida. El parénquima seminífero testicular se organiza en el adulto en túbulos seminíferos (donde se producen los espermatozoides a partir de la pubertad) y en tejido intersticial ubicado entre los túbulos, que es un tejido conjuntivo con células especializadas en producir esteroides sexuales (desde la edad fetal).

#### **4.2.1. Células testiculares y sus funciones**

#### **4.2.2. Células sustentaculares o de Sertoli (CS)**

Las células de Sertoli forman parte del epitelio seminífero. Este epitelio constituye la mayor parte de la pared del túbulo seminífero. Las células sustentaculares se extienden desde el compartimiento basal del antedicho epitelio hasta la luz de túbulo. Las primeras CS aparecen sobre el día 13,5 de gestación en la rata (Magre y Jost, 1991). Estas células, que deben su nombre al médico italiano Enrico Sertoli quien las describió (Sertoli, 1865), sólo se reproducen normalmente durante la vida fetal y postnatal hasta poco antes de iniciarse la pubertad. Se sabe que, en la rata, pierden la capacidad de dividirse entre 16 (Steinberger y Steinberger, 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). Esto implica que una injuria que afecte a las CS durante este período puede alterar el número posterior de células y sus funciones.

Las CS tienen un rol esencial dirigiendo el proceso de espermatogénesis (Dimitiadis et al., 2015). Existe una alta correlación entre el número de CS y el tamaño testicular adulto en gran variedad de mamíferos (Sharpe, McKinnell, Kivlin y Fisher, 2003). Cada célula de Sertoli puede establecer contacto y estimular la diferenciación de un número limitado de células de la línea germinal, por esta razón es que hay una relación entre el número de células de Sertoli y la capacidad diaria de producción de espermatozoides del testículo (Russell y Peterson, 1984; Orth, Gunsalus y Lamperti, 1988; Brendtson y Thompson, 1990; da Silva et al., 2006). De igual manera se sabe que el número de espermátidas alargadas en el adulto está correlacionado con el número de CS existentes en el período perinatal (Orth, Gunsalus y Lamperti, 1988). De lo antedicho podemos concluir que alterar la multiplicación de estas células en estos periodos tempranos puede generar alteraciones en su número

o función en el futuro del animal, y deja tan sólo un periodo corto donde se pueda compensar una disminución en el número normal de CS.

Por otro lado, las CS determinan el número de células mioides (CM) y estimulan el desarrollo de células de Leydig (CL) adultas a partir de sus precursoras en la etapa pre púber (Rebourcet et al., 2014a). Además, mantienen el número de CL y CM y su actividad en el testículo adulto (Rebourcet et al., 2014b; Wen, Wang, Tang, Cheng y Liu, 2016). Parte de estas acciones las realiza mediante su comprobada capacidad de fagocitosis (McClusky, 2022). Sumado a lo antes mencionado, la célula de Sertoli produce hormonas como la inhibina B y la hormona anti Mülleriana, que son indispensables para el desarrollo sexual, siendo su ausencia causa de alteraciones en dicho desarrollo (Lucas-Herald, 2022). Además, las CS secretan proteína ligadora de andrógenos (ABP) que aumenta la concentración de testosterona a nivel del túbulo seminífero, imprescindible para la espermatogénesis (Wong y Khan, 2021).

Dentro de los factores que regulan la actividad de estas células se incluyen los andrógenos (Escott, da Rosa y Loss Eda, 2014). Las CS presentan receptores para andrógenos y la ausencia de éstos altera la capacidad de las CS de “dirigir” la diferenciación de las células germinales (Tan et al., 2005). Además, la expresión de receptor de andrógeno (RA) en la CS es esencial para la normal espermatogénesis y la posterior fertilidad (Chang, Lee, Wang, Yeh y Chang, 2013), incluso desde etapas fetales (Rey, Musse, Venara y Chemes, 2009).

#### **4.2.3. Células intersticiales o de Leydig (CL)**

El testículo funciona también como una glándula endocrina productora de andrógenos. Las células de Leydig son las encargadas de esta producción desde la vida fetal, aumentando su actividad a partir de la pubertad (Smith y Walker, 2014). Las CL, también llamadas células intersticiales debido a su ubicación, mantienen su capacidad de dividirse durante toda la vida del animal (Vornberger, Prins, Musto y Suarez-Quian, 1994). En las ratas, las células intersticiales fetales se comienzan a diferenciar en el día 13,5 de gestación a partir de células mesenquimales intersticiales (Kuopio, Tapanainen, Pelliniemi y Huhtaniemi, 1989).

Las células de Leydig adultas se diferencian a partir de las células de Leydig fetales (Roosen-Runge y Anderson, 1959). Las CL funcionales en el adulto comienzan a aparecer luego que se diferencian a partir de estas precursoras en la pubertad. En la rata esto ocurre a partir de las dos semanas de vida (Mendis- Handagama y Ariyaratne, 2001). Por lo anteriormente dicho un evento que dañe las CL fetales va a resultar en un desarrollo anormal de las CL adultas (SU et al., 2018). Sin embargo, el testículo conserva toda la vida en el intersticio una población de células progenitoras con alta capacidad mitótica y recurre a ellas en caso de necesitar CL o andrógenos (Benton, Xin Shan y Hardy , 1995; Stanley et al., 2012).

Para la proliferación y maduración correctas de células de Leydig normales es necesario que éstas presenten RA (O'Shaughnessy et al., 2019). En el adulto, las CL responden a estímulos de la hormona LH produciendo andrógenos (Tran, Servos y Haider, 2006), y tienen la capacidad de multiplicarse para aumentar su número y así aumentar la producción de hormonas (Hardy et al., 2005).

Los andrógenos no solo son esenciales para la espermatogénesis (McKinnell y Sharpe, 1995; O'Shaughnessy, 2014), sino que en su ausencia no ocurren ni los procesos de maduración en el epidídimo, ni la posterior fertilidad (Simanainen, McNamara, Davey, Zajac y Handelsman, 2008). Esta hormona solo cumple su función cuando se une a su receptor celular específico. La producción de RA está regulada principalmente de forma paracrina por la presencia de la hormona en el testículo (Nastiuk Clayton, 1994; Zhu et al., 2000). Para que la gametogénesis ocurra es fundamental que las CS y las células mioideas expresen los RA (O'Hara et al., 2015). La expresión de RA por las CL también es regulada de forma autócrina por la presencia de andrógenos (Wang et al. 2009; Griffin et al. 2010).

Los RA se encuentran en los núcleos de las células de Sertoli, Leydig y mioideas, y son evidenciables por inmunohistoquímica (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, y sin embargo mantienen su capacidad para producir andrógenos (Ye, Li, Li, Chen y Ge, 2017).

#### **4.2.4. Células mioideas (CM)**

Las CM se diferencian en las primeras etapas de la vida a partir de células que se encuentran en el intersticio testicular (Combes et al., 2009). Las CM se encuentran dispuestas en una monocapa de células unidas entre sí, alrededor del túbulo seminífero (Lacy y Rotblat., 1960). No forman parte del epitelio seminífero sino del denominado tejido limitante, y están en estrecho contacto con el endotelio de los vasos intersticiales (Maekawa, Kamimura y Nagano, 1996). Presentan capacidad de contraerse debido a la presencia de actina y miosina en su citoplasma (Fernandez et al., 2008) y su función es disminuir transitoriamente la luz del túbulo seminífero para provocar el avance de los espermatozoides hacia la rete testis, siendo éste un rol crítico en la función testicular (Ellis, Groesbeck, Farr y Tesi, 1981; Zang et al., 2006). Además, las células mioideas están relacionadas con la fertilidad, ya que intervienen en el control del microambiente de los túbulos seminíferos mediante la producción de factor neurotrófico derivado de la glía (Chen, Brown, Willis y Eddy, 2014). Por último y sumado a lo anterior, participan en el metabolismo de los andrógenos dentro del testículo (Wang, Yeh, Tzeng y Chang, 2009).

#### **4.2.5. Gonocitos**

Alrededor del día 6 post concepción, células del epiblasto proximal, próximo al ectodermo extraembrionario, se diferencian en células germinales primordiales (CGP). En los roedores las CGP migran al surco genital alrededor del día 7,5, para volverse residentes y ser rodeadas por CS, formando los cordones espermáticos alrededor del día 12,5 post concepción. Una vez formados los cordones espermáticos nos referimos a las células germinales como gonocitos. (Manku et al., 2015)

Los gonocitos fetales y neonatales se localizan en el centro de los cordones espermáticos, son células grandes y redondeadas, con núcleos prominentes. Su importancia radica en que a partir de ellas se van a diferenciar las espermatogonias, que llegado el momento serán las células germinales a partir de las cuales se producirá la espermatogénesis (Culty, 2013).

Las fases del desarrollo de las células germinales no están sincronizadas, en lugar de eso en un mismo momento la misma sección de cordón espermático puede presentar varios estadios de diferenciación de estas células. De este modo alrededor de los días 4 y 5 post parto podemos encontrar gonocitos, localizados tanto en el centro como en la periferia del cordón, con los primeros por migrar hacia el compartimiento basal o por entrar en apoptosis y los últimos en proceso de diferenciarse a espermatogonias. A partir del día 5 post parto el destino de los gonocitos que permanecieron en el centro del cordón será eventualmente la apoptosis (Culty et al., 2009).

#### **4.3. La apoptosis y la proliferación celular**

En general podemos afirmar que los tejidos animales no están constituidos por un número fijo de células, sino que se constituyen poblaciones celulares que establecen un equilibrio entre la división y la muerte celular. 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), ambas vías activando la caspasa 3. A su vez, la caspasa 3 provoca que la apoptosis entre en una etapa irreversible (Ola, Nawaz y Ahsan, 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 (Fadeel, Ottosson y Pervaiz, 2008).

Hay una amplia variedad de situaciones a las que una madre se puede enfrentar y que van a resultar en una alteración del ambiente uterino. Como respuesta a este ambiente uterino alterado, en el feto aumenta la cantidad de células que entran en apoptosis en algunos tejidos. Un ejemplo de este fenómeno es la subnutrición en el primer tercio de la gestación y cómo provoca en el ovario de la cordera un aumento en la expresión de genes que estimulan la apoptosis (Lea et al., 2006). Sustancias tóxicas y cancerígenas

administradas a las madres durante la gestación y la lactación producen crías en cuyos testículos se observa un aumento en la expresión de la proteína caspasa 3 (Liu, Chen, Wang, Shen y Zhao, 2013). Por ejemplo, en el último tercio de la gestación, al subnutrir madres de la misma especie animal, las crías presentan un mayor número de timocitos en proceso de apoptosis (Qu et al. 2017). Además, la caspasa 3 se ve aumentada en el testículo a causa del estrés oxidativo ocasionado por la reperfusión tras la resolución de una torsión testicular (Shamsi-Gamchi, Razi y Behfar 2018). Por último, es sabido que el etanol a nivel testicular aumenta la expresión de caspasa 3 en las CS (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 (PCNA). Este antígeno ha sido identificado como una proteína no histona presente en los núcleos de células en proliferación (Miyachi, Fritzler y Tan, 1978; Mathews, Bernstein, Franza y Garrels, 1984). El 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 del ADN, en el ensamblaje de la cromatina, y en varias instancias se ha demostrado que participa en la transcripción del ARN (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; Tian P et al., 2019). Por ejemplo, anticuerpos primarios contra esta proteína son utilizados para evaluar cambios estacionales en la proliferación de las células germinales del testículo en mamíferos silvestres del continente asiático (*Tupaia belangeri chinensis*) (Tang J et al., 2022).

#### **4.4. La programación fetal y su efecto sobre el parénquima testicular.**

En ratas de ambos sexos ocurren cambios selectivos en el crecimiento relativo de sus órganos con relación a su peso corporal a causa de la subnutrición en la vida intrauterina y durante la lactación (Woodall, Breier, Johnston y Gluckman, 1996). La nutrición en las primeras etapas de la vida es uno de los factores que influyen en la cantidad y calidad seminal del toro y del carnero (Foote, 1978). En ovinos, la subnutrición de la madre gestante produce un menor número de CS cuando sus crías son neonatos (Bielli et al., 2002) y el efecto también se vio en machos jóvenes adultos, lo que implica un menor número de CS de forma permanente (Kotsampasi, Balaskas, Papadomichelakis y Chadio, 2009).

En animales de experimentación, la subnutrición en etapas tempranas de la vida (gestación más lactación), produjo efectos cuantificables en ratas macho adultas, las cuales presentaron menor número de células de Sertoli totales por testículo y por corte de túbulo seminífero. Además, los pesos corporal y testicular de los animales subnutridos fueron menores en los animales tratados que en sus controles (Genovese et al., 2010). Al estudiar el efecto que tiene la subnutrición durante la gestación en los neonatos, se vio que 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 restringir el aporte proteico de una madre durante la lactancia va a impactar negativamente en el peso testicular y corporal de sus crías, así como también su número de células de Sertoli a los 21 días de vida (Ramos, da Silva, Costa y Sampaio, 2006). Complementariamente se vio que la restricción proteica materna durante la lactación, produce efectos negativos que se ven también cuando las crías llegan a la vida adulta, viéndose cambios en la estructura testicular que perduran aun cuando el estímulo que los produjo haya finalizado hace tiempo (Toledo, Perobelli, Pedrosa, Anselmo-Franci y Kempinas, 2011). Cuando se impone de forma conjunta una restricción proteica y energética materna durante la lactación, tiene como consecuencia una menor concentración de andrógenos en sangre y menor producción de RA en sus células testiculares (Texeira et al., 2007). Por lo tanto, es pertinente el estudio de los efectos de la programación fetal sobre la distribución y la abundancia del RA.

Por último, una alteración del ambiente testicular afecta la función testicular en el adulto. Los machos gestados con restricción materna de proteína alimentaria producen un menor número de espermatozoides cuando llegan a adultos y estos gametos 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). Se sabe que afecta diferentes parámetros de la histofisiología testicular.

## **5. HIPÓTESIS**

La subnutrición durante las etapas de gestación y lactación de ratas macho afecta su histofisiología testicular en diferentes etapas de la vida luego del nacimiento y hasta la vida adulta.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 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.

## 6.2 Objetivos Específicos

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

2) Determinar si el número de CS, CL, CM y gonocitos 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.

3) Determinar si el número de CS, CL, CM y gonocitos 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.

## 7. 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 (Protocolo 573-17) y a partir de su autorización se llevó adelante los experimentos que a continuación se detallan.

En el presente trabajo se utilizó ratas (hembras y machos) de la cepa Sprague-Dawley. Se realizó un experimento principal del que se desprenden 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.

### 7.1. 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 utilizó 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 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 obtuvo 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.

## 7.2. 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 de la 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).

### 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 organizó 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 que las hembras adultas (madres gestantes) accedieran al alimento y al agua pero evitaba que las crías tuvieran acceso al alimento de forma anticipada.

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

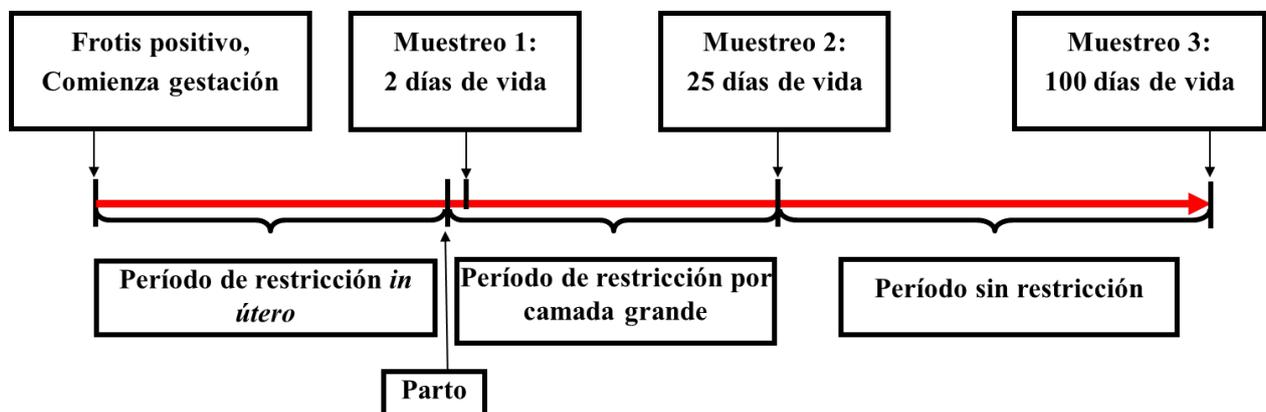
Desde el día del parto (día 22 del experimento) ambos grupos de madres pasaron a tener alimento y agua *ad libitum*. Las camadas del grupo C estaban compuestas por 8 crías (retirando o agregando crías marcadas de otras

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.

**Figura 1: el experimento se puede resumir con el siguiente esquema:**



### **7.3. Muestras y procesamiento histológico**

Se tomó 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.

## 7.4. 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 histológico sin aplicarle anticuerpo primario. Se describió la abundancia relativa de AR como la intensidad relativa presente en células de Sertoli, de Leydig, mioides y gonocitos, evaluando la positividad de 300 células de cada tipo e individuo 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 CS, CL, CM 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.

## 7.5. Análisis estadísticos:

Todas las variables cuantitativas fueron expresadas como medias  $\pm$  sem y analizadas por ANOVA. Se estudió las diferencias entre grupos en las siguientes variables: scores de positividad, peso corporal y testicular. Se estudió los efectos de grupo 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, USA).

## 8. RESULTADOS

Ninguna madre murió durante la gestación ni durante la lactación, tampoco se observó patologías durante el transcurso del experimento. Luego del destete las madres fueron sacrificadas. Los valores de mortalidad en las crías recién nacidas no fueron diferentes entre grupos durante el transcurso del experimento y los descartes que se realizaron tuvieron el objetivo de equilibrar el número de crías lactando por camada.

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

### 8.1. Peso corporal, testicular.

Tanto los pesos corporales como los testiculares de los animales tratados (grupo R), fueron menores a los controles a todas las edades en que se muestreó (tabla 1).

**Tabla 1** - Peso corporal y testicular a los 2, 25 y 100 días de vida (media  $\pm$  ds)

<b>Edad</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Peso corporal (g)</b>	<b>Peso testicular (g)</b>
<b>2 Días</b>	<b>T</b>	6.43 $\pm$ 1.07*	0.0260 $\pm$ 0.0005**
	<b>C</b>	7.63 $\pm$ 0.56	0.0350 $\pm$ 0.0005
<b>25 Días</b>	<b>T</b>	36.36 $\pm$ 3.2***	0.06 $\pm$ 0.02**
	<b>C</b>	61.39 $\pm$ 6.28	0.12 $\pm$ 0.04
<b>100 Días</b>	<b>T</b>	254.0 $\pm$ 26.9***	1.29 $\pm$ 0.16*
	<b>C</b>	342.4 $\pm$ 10.2	1.45 $\pm$ 0.13

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

## 8.2. Variables estudiadas por inmunohistoquímica

### 8.2.1. 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 con respecto a las otras edades estudiadas. 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 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 II). 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 II** – 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).

Edades						
	2 días		25 días		100 días	
<b>Células</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>
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	-	-	-	-

\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$  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.

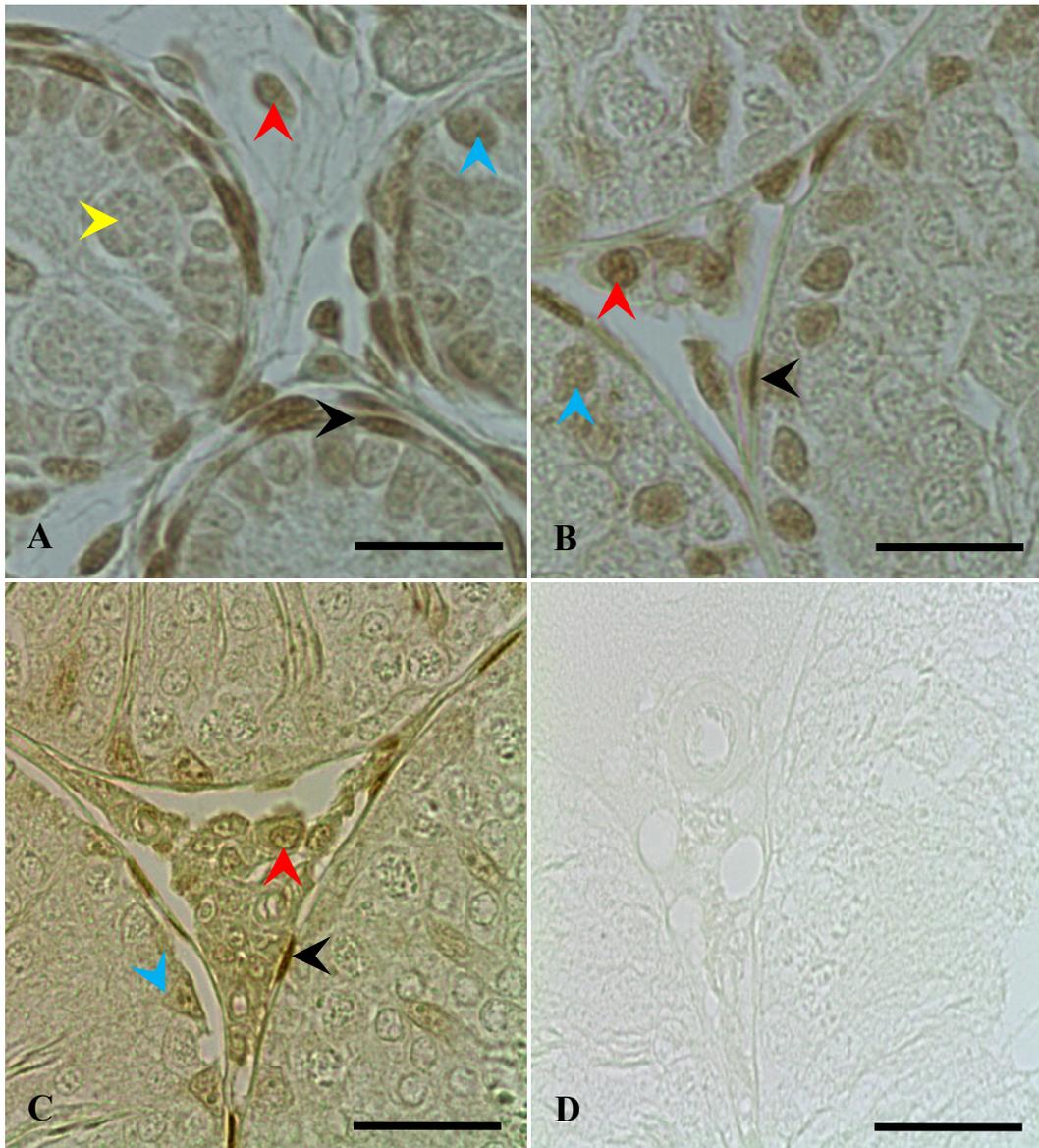


Figura 2: En A, B y C se muestran cortes histológicos de testículos con 2, 25 y 100 días de vida tratados con la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpo primario anti receptor de andrógenos. En D testículo de 100 días de vida utilizado como control negativo de la técnica al que no se le colocó el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

### 8.2.2. Células en apoptosis (caspasa 3 positivas)

Estudiada por inmunohistoquímica la proporción de células en apoptosis 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, sí hubo interacción grupo\*edad en el porcentaje de células mioides positivas a caspasa 3, con mayor número de estas células en apoptosis en el grupo tratado en los adultos (100 días de vida, Tabla III). 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 III** – 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.

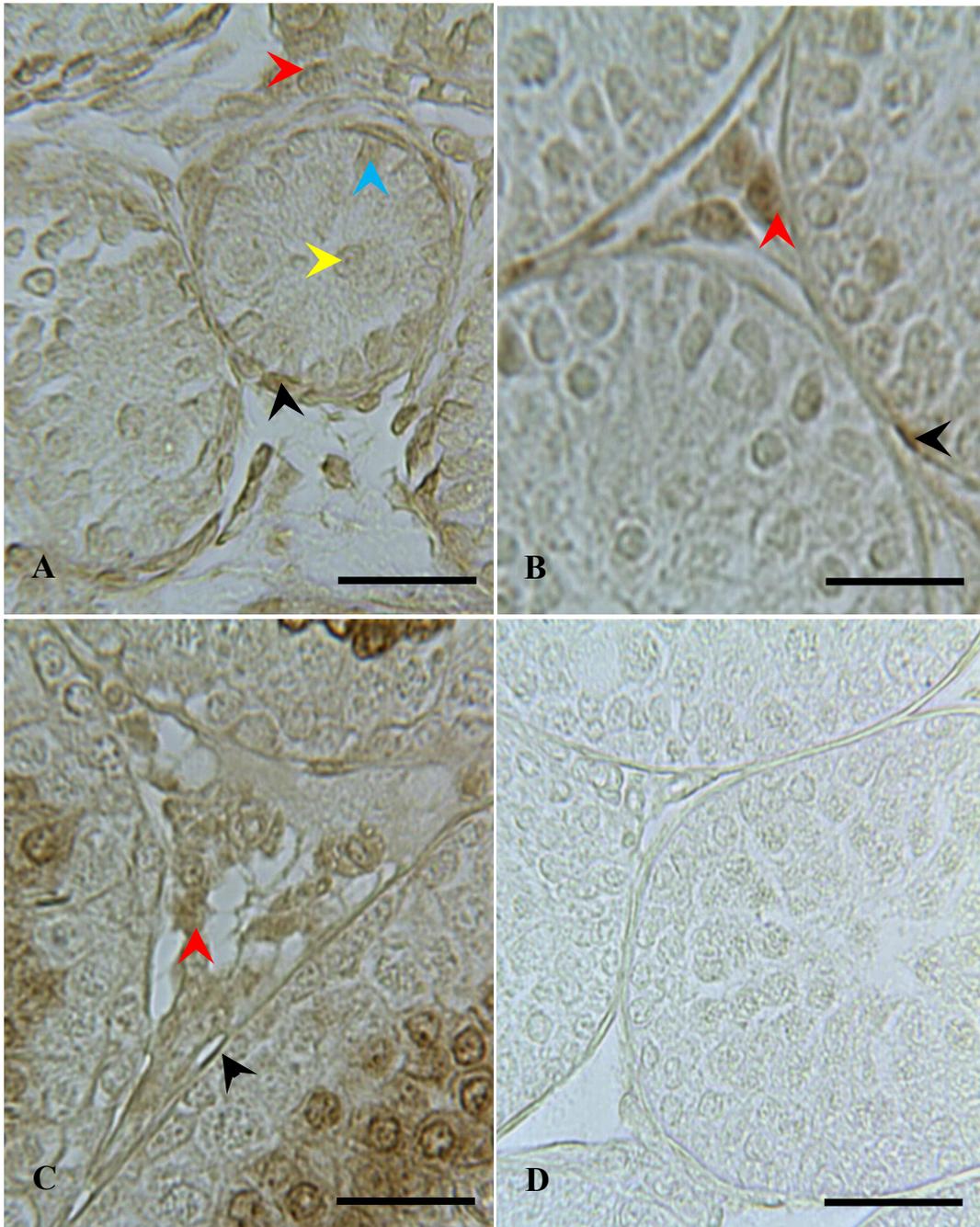


Figura 3: En A, B y C se muestra cortes histológicos de testículos con 2, 25 y 100 días de vida tratados con la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpo primario anti caspasa 3. En D: testículo de 25 días de vida utilizado como control negativo de la técnica, al que no se le colocó el anticuerpo 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.

### 8.2.3. 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 IV). Sin embargo encontramos que la proliferación de las células de Leydig y mioides fue diferente según la edad en la que fueron estudiadas. 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 IV** – 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 <sup>a</sup>	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 <sup>a</sup>	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.

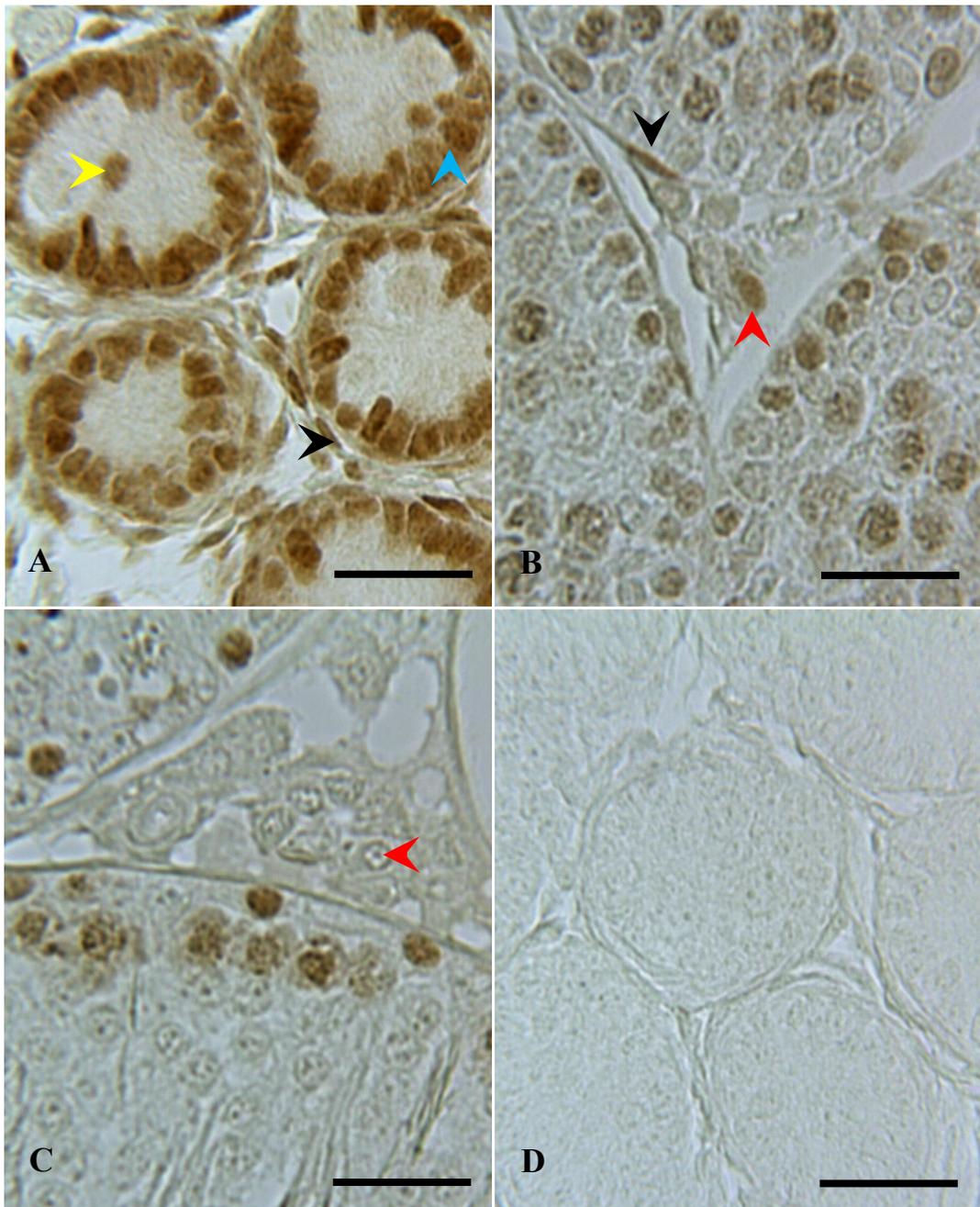


Figura 4: En A, B y C se muestra cortes histológicos de testículos con 2, 25 y 100 días de vida tratados con la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpo primario anti PCNA. En D: testículo de 2 días de vida utilizado como control negativo de la técnica, al que no se le colocó el anticuerpo primario.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

## 9. DISCUSIÓN

La presente tesis aporta información original que suma al conocimiento previamente existente sobre los efectos duraderos de la programación por subnutrición durante la vida uterina y posnatal temprana sobre la histofisiología testicular.

### 9.1. Peso corporal, testicular.

Los animales de dos días de vida del grupo tratado presentaron pesos corporales menores al nacimiento que sus controles. Esto nos dice que alcanzó con la subnutrición en el periodo de gestación, a los niveles aplicados en el presente experimento, para provocar un retraso en el crecimiento de los animales, lo cual coincide con los datos publicados anteriormente (Genovese et al., 2011). Al estudiar a los animales de 25 días de vida (prepuberales), los tratados continuaron siendo menos pesados. Esta diferencia no fue solo ocasionada por el tratamiento durante la gestación, sino que se sumó la subnutrición a la que fueron expuestos durante la lactación. El mayor indicio de la existencia de programación fetal se vio en los animales de 100 días de vida, en los cuales el peso corporal continuó siendo menor en los animales tratados mucho tiempo después (75 días) de terminar el periodo de subnutrición, y a pesar de esto los animales no lograron compensar las diferencias generadas en la vida temprana. Esto también coincide con hallazgos anteriores (Genovese et al., 2010). Conjuntamente al peso corporal, se vio afectado el peso testicular en las tres edades (2, 25 y 100 días de vida), lo cual confirma lo encontrado por otros equipos donde se observó una correlación entre el peso corporal y el peso testicular en otra especie (Bredd y Taylor, 2000).

Hasta donde sabemos, este es el primer reporte que estudia los efectos de la programación fetal sobre la dinámica de proliferación y la apoptosis en las CS y CM, a pesar de no haber encontrado diferencias entre los grupos experimentales a causa del tratamiento. En animales de 100 días de vida se encontró una mayor positividad a caspasa 3 (indicando un mayor nivel de apoptosis) en los animales del grupo subnutrido. De lo anterior se desprende que la subnutrición en etapas tempranas de la vida incrementa la apoptosis de las CM en las ratas adultas del grupo tratado hasta en cuatro veces según su expresión de caspasa 3, al menos en nuestras condiciones de trabajo.

En relación al RA sabemos que para que el testículo pueda cumplir sus funciones con normalidad, es fundamental la expresión normal de este receptor especialmente en las SC y las CM (O'Hara y Smith, 2015). Por otro lado, la producción del RA es estimulada a nivel local por los andrógenos producidos por las CL (Wang, Yeh, Tzeng y Chang, 2009). No encontramos diferencias en la intensidad con la que se expresó el RA en las CM de los animales adultos tratados, lo cual sugiere que estos animales pueden responder a los niveles de andrógenos locales de la manera similar a sus controles. Las diferencias halladas en los animales neonatos y púberes pueden indicar que en etapas tempranas las CM no son capaces de producir RA normalmente. Aunque este

mismo fenómeno ocurrió en las SC de neonatos, cuando estos se convirtieron en adultos esas diferencias desaparecieron. Esto podría indicar que tanto las SC como las CM en adultos tratados son capaces de sintetizar RA en cantidad similar a sus controles, y por lo tanto, su espermatogénesis no estaría afectada por la falta de este receptor. Al comparar el IP entre las distintas edades, encontramos que para las CS y CM los mismos tienen pequeñas variaciones a lo largo de la vida, sobre todo en comparación con el IP de las CL, y particularmente en la pubertad. Esta diferencia entre las CS y CL en la forma en la que expresan AR de forma estable durante la vida y en forma de pico en la pubertad respectivamente, ya había sido encontrada por otros equipos en el pasado (Abd El-Meseeh et al., 2016).

Considerando el efecto del tratamiento en su totalidad se vuelve aparente que causó efectos más marcados durante la gestación que después de ésta, lo cual podría explicar por qué la mayoría de las diferencias aparecen a los dos días de vida y no en etapas posteriores. También podría formar parte de la explicación de este fenómeno el hecho de que durante la lactación los animales con problemas serios en su desarrollo fueron descartados. La explicación podría encontrarse en la alimentación de los animales. Los cachorros en la camada lactan estableciendo un orden que no puede ser manipulado. Sumado a esto, a medida que se vuelven progresivamente capaces de comer ración a partir de los 15 días de vida y las madres les proveen acceso a la misma es posible que tanto el comportamiento de la madre como el de las crías favorezca el crecimiento compensatorio a medida que aumentan su consumo de ración a expensas de la lactación.

Paradójicamente se observó que mientras el porcentaje de positividad a caspasa 3 de las células de Sertoli y de Leydig (pero especialmente en las de Sertoli) disminuyó a medida que los animales envejecían, se observó que la variabilidad (expresada como desviación estándar de la media) de esas variables aumentó en relación a la cifra de las medias absolutas. Esto indica que la mortalidad celular es mucho más variable en los animales adultos que en los jóvenes, y que tal vez, no todos los animales responden de forma similar a los efectos de la programación fetal de las células de sus testículos por subnutrición, incrementando de esta forma la variabilidad entre individuos. Parece ser que los efectos a largo plazo de nuestro tratamiento se vuelven paulatinamente más variables a medida que los animales envejecen.

Las variables estudiadas no fueron diferentes en las células de Leydig; esto podía esperarse, teniendo en cuenta que las CL mantienen su capacidad de dividirse durante toda la vida, y que además, en el intersticio existen células precursoras con la capacidad de diferenciarse en CL en respuesta a las necesidades endocrinas del testículo y el organismo (Hardy, Zirkin y Ewing, 1989).

Las CM son similares a las CL en que son capaces de dividirse durante toda la vida y pueden compensar los efectos del tratamiento en etapas posteriores. A pesar de esto demostramos que a consecuencia de nuestro tratamiento las CM de los animales tratados fueron menos sensibles a los andrógenos que sus controles. Los andrógenos permiten la contractilidad y la secreción de estas células, por lo tanto esas funciones podrían estar afectadas en animales que

fueron subnutridos durante las etapas tempranas de la vida.

## **10. CONCLUSIONES**

La expresión del RA en las CS y las CM del testículo de ratas de 2 y de 25 días de vida fue afectada por la subnutrición durante la gestación y durante la gestación y la lactación respectivamente. A los 100 días de vida no se observó efecto del tratamiento en la expresión de este receptor en ninguno de los tipos celulares observados.

A los 100 días de vida la subnutrición durante la gestación y posteriormente durante la lactación produjo un incremento en el porcentaje de CM positivas a la CASPASA 3 (en apoptosis).

No detectamos diferencias en el porcentaje de células en proliferación entre los animales tratados y controles, en ninguna de las células estudiadas y a ninguna de las tres edades.

En conclusión, el presente trabajo demuestra que a diferencia de lo que ocurre con las SC y las CL, las dinámicas poblacionales de las CM son pasibles de programación fetal mediante la subnutrición, teniendo como resultados tasas de apoptosis más altas, y en consecuencia afectando la histofisiología testicular de estos animales en la vida adulta.

## 11. Bibliografía

- Abd El-Meseeh, N.A., El-Shaarawy, E.A., AlDomairy, A.F., y Sehly, R.A. (2016). Changes in rat testis morphology and androgen receptor expression around the age of puberty. *Annals of Anatomy*, 205, 37-44.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J.D. (1996). *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Omega.
- Angelopoulou, R., Balla, M., Lavranos, G., Chalikias, M., Kitsos, C., Baka, S., y Kittas, C. (2008). Sertoli cell proliferation in the fetal and neonatal rat testis: a continuous phenomenon? *Acta Histochemica*, 110(4), 341-7.
- Barker, D.J., Osmond, C., y Law, C.M. (1989). The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 43(3), 237-40. doi: 10.1136/jech.43.3.237
- Barker, D.J., y Osmond, C. (1987). Death rates from stroke in England and Wales predicted from past maternal mortality. *British Medical Journal*, 295(6590), 83-6. doi: 10.1136/bmj.295.6590.83
- Barker, D.J. (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *British Medical Journal*, 311(6998), 171-4. doi: 10.1136/bmj.311.6998.171
- Benton, L., Xin Shan, M., y Hardy, P. (1995). Differentiation of adult Leydig cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53, 661-68.
- Berndtson, W.E., y Thompson, T.L. (1990). Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. *Journal of Andrology*, 11, 429-35.
- Bielli, A., Pérez, R., Pedrana, G., Milton, J.T., Lopez, A., Blackberry, M.A., ...Martin, G.B. (2002). Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reproduction, Fertility and Development*, 14, 333-7.
- Breed, W.G., y Taylor, J. (2000). Body mass, testes mass, and sperm size in murine rodents. *Journal of Mammalogy*, 81, 758-768.
- Chang, C., Lee, S. O., Wang, R. S., Yeh, S., y Chang, T. M. (2013). Androgen receptor (AR) physiological roles in male and female reproductive systems: lessons learned from AR-knockout mice lacking AR in selective cells. *Biology of Reproduction*, 89(1), 21-1.
- Chen, L. Y., Brown, P. R., Willis, W. B., y Eddy, E. M. (2014). Peritubular myoid cells participate in male mouse spermatogonial stem cell maintenance. *Endocrinology*, 155(12), 4964-4974.
- Combes, A.N., Wilhelm, D., Davidson, T., De-jana, E., Harley, V., Sinclair, A., y Koopman, P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Developmental Biology* 326:112–120.
- Culty, M. (2009). Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 87(1):1-26. doi: 10.1002/bdrc.20142. PMID: 19306346.

- Culty, M. Gonocytes, from the fifties to the present: is there a reason to change the name? (2013). *Biology of Reproduction*. 29;89(2):46. doi: 10.1095/biolreprod.113.110544. PMID: 23843237.
- da Silva, V.A. Jr., Vieira, A.C., Pinto, C.F., de Paula, T.A., Palma, M.B., Lins Amorim M.J., ... Manhães-de-Castro R. (2006). Neonatal treatment with naxolone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. *reproduction nutrition development journal* 46(2):157-66.
- Desai, m y Hales, C.N.. (1996). Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 72(2):329-48. doi: 10.1017/s0006323196005026. PMID: 9155245.
- Dimitriadis, F., Tsiampali, C., Chaliasos, N., Tsounapi, P., Takenaka, A., y Sofikitis, N. (2015). The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones (Athens)* 14:479-503. doi: 10.14310/horm.2002.1633. PMID: 26732153.
- D.M, Noden. (1990). Embriología de los animales domésticos. *Ed. Acribia, S.A.* 1a ed. Zaragoza.
- Ellis, L.C., Groesbeck, M.D., Farr, C.H., y Tesi R.J. (1981). Contractility of seminiferous tubules as related to sperm transport in the male. *Archives of Andrology* 6(4):283-94.
- Engelbregt, M.J., Houdijk, M.E., Popp-Snijders, C., y Delemarre-van de Waal H.A. (2000). The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatric Research* 48:803-7.
- Escott, G.M., da Rosa, L.A., y Loss, Eda S. (2014). Mechanisms of hormonal regulation of Sertoli cell development and proliferation: a key process for spermatogenesis. *Current Molecular Pharmacology* 7:96-108.
- Fadeel, B., Ottosson, A., y Pervaiz, S. (2008). Big wheel keeps on turning: apoptosome regulation and its role in chemoresistance. *Cell Death & Differentiation* 15(3):443-52.
- Fernández, D., Bertoldi, M.V., Gómez, L., Morales, A., Callegari, E., y Lopez, L.A. (2008). Identification and characterization of Myosin from rat testicular peritubular myoid cells. *Biology of Reproduction* 79(6):1210-8.
- Foote, R.H. (1978). Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions. *Journal of Animal Science* 47 Suppl 2:1-11. PMID: 400773.
- Genovese, P., Núñez, M.E., Pombo, C., y 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.
- Griffin, D.K., Ellis, P.J., Dunmore, B., Bauer, J., Abel, M.H., y Affara, N.A. (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. *biology reproduction journal*. 82(6):1139-50.

- Hardy, M.P., Gao, H.B., Dong, Q., Ge, R., Wang, Q., Chai, W.R. Sottas, C. (2005). Stress hormone and male reproductive function. *cell tissue research journal* 322(1):147-53.
- Hardy, M.P., Zirkin, B.R., y Ewing, L.L. (1989). Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology*, 124, 762-70. doi: 10.1210/endo-124-2-762
- Hoffman, F., Boretto, E., Vitale, S., Gonzalez, V., Vidal, G., Pardo, M.F., ... Rabaglino, M.B. (2017). Maternal nutritional restriction during late gestation impairs development of the reproductive organs in both male and female lambs. *Theriogenology* 1;108:331-338. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.023.
- Huhtaniemi, I., y Pelliniemi, L.J. (1992). Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 201(2):125-40.
- Ithurralde, J., Genovese, P., Abud, M.J., Pérez, R., López, A., y Bielli, A. (2017). Oferta de forraje de campo natural durante la gestación en ovinos: inmunoposividad de PCNA en los músculos Psoas major, gluteobiceps y Semimembranoso de fetos ovinos de 70 días de desarrollo. Jornadas Técnicas Veterinarias, 16-17 nov. 2017.
- Kelman, Z. (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14(6):629-40.
- Kotsampasi, B., Balaskas, C., Papadomichelakis, G., y Chadio, S.E. (2009). Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Animal Reproduction Sci* 114:135-47.
- Kuopio, T., Tapanainen, J., Pelliniemi, L.J., y Huhtaniemi, I. (1989). Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development* 107(2):213-20.
- Lacy, D., y Rotblat, J. (1960). Study of normal and irradiated boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat. *Experimental Cell Research* 21:49-70.
- Langley-Evans, S.C. (2006). Developmental programming of health and disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65(1), 97-105. doi:10.1079/PNS2005478
- Langley-Evans S.C. (2007). Developmental programming of health and disease. *Proceedings of the Nutrition Society*. 65(1): 97–105.
- Langley-Evans, S.C., y McMullen, S. (2009). Developmental Origins of Adult Disease. *UK Medical Principles and Practice* 2010;19:87–9 DOI: 10.1159/000273066
- Langley-Evans, S.C., y McMullen, S. (2010) Developmental origins of adult disease. *Medical Principles and Practice*. 2010;19(2):87-98. doi: 10.1159/000273066. Epub 2010 Feb 4. PMID: 20134170.
- Lea, R.G., Andrade, L.P., Rae, M.T., Hannah, L.T., Kyle, C.E., Murray, J.F., ... Miller DW. (2006). Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. *Reproduction*, 131:113-24.
- Liu, X.L., Chen, X.Y., Wang, Z.C., Shen, T., y 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. *biomedical reports* 1(3):420-424.

- Lucas-Herald, A.K., y Mitchell, R.T. (2022) Testicular Sertoli Cell Hormones in Differences in Sex Development. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 14;13:919670. doi: 10.3389/fendo.2022.919670. PMID: 35909548; PMCID: PMC9329667.
- Maekawa, M., Kamimura, K., y Nagano, T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of Histology and Cytology*. ;59(1):1-13. doi: 10.1679/aohc.59.1. PMID: 8727359.
- Magre, S., y Jost, A. (1991). Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *J electron microscopy techniques* 19(2):172-88.
- Mandy, M., y Nyirenda, M. (2018). Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. *International Health*. 1;10(2):66-70. doi: 10.1093/inthealth/ihy006. PMID: 29528398; PMCID: PMC5856182.
- Manku, G., y Culty, M. (2015). Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges. *Reproduction*. 149(3):R139-57. doi: 10.1530/REP-14-0431. PMID: 25670871
- Mathews, M.B., Bernstein, R.M., Franza, B.R. Jr., y Garrels, JI. (1984). Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309(5966):374-6.
- Matsuzaki, T., Munkhzaya, M., Tungalagsuvd, A., Mayila, Y., Iwasa, T., Yano, K., Yanagihara, R., ... Irahara, M. (2017). Prenatal undernutrition disrupted the sexual maturation, but not the sexual behavior, in male rats. *Reproductive Medicine and Biology*. 16;16(4):325-329. doi: 10.1002/rmb2.12045. PMID: 29259485; PMCID: PMC5715893.
- McClusky, L.M. (2022). Several routes of cell death to secondary necrosis in the elasmobranch testis. *Apoptosis*. 2022 Aug;27(7-8):454-464. doi: 10.1007/s10495-022-01733-0. Epub 2022 Jun 7. PMID: 35672487; PMCID: PMC9308584.
- McKinnell, C., y Sharpe, R.M. (1995). Testosterone and spermatogenesis: evidence that androgens regulate cellular secretory mechanisms in stage VI-VIII seminiferous tubules from adult rats. *Journal of Andrology* 16:499-509.
- McMillen, C., y Robinson, J.S. (2005). Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. *Physiological Reviews*, 85, 571–633. doi:10.1152/physrev.00053.2003
- Mendis-Handagama, S.M., y Ariyaratne, H.B. (2001). Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of Reproduction* 65:660-71.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., ... Sariola H. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*. 25;287(5457):1489-93. doi: 10.1126/science.287.5457.1489. PMID: 10688798.
- Mirembe, M., y Moffat, N. (2018). Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. *International Health*. 10: 66–70 doi:10.1093/inthealth/ihy006.
- Miyachi, K., Fritzler, M.J., y Tan, E.M. (1978). Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *The Journal of Immunology* 121(6):2228-34.

- Muzi-Filho, H., Souza, A.M., Bezerra, C.G., Boldrini, L.C., Tayika, C.M., Oliveira, F.L., ... Cunha VM. (2015). Rats undernourished in utero have altered Ca<sup>2+</sup> signaling and reduced fertility in adulthood. *Physiological Reports* 3(10):e12587.
- Nastiuk, K.L., y Clayton, D.F. (1994). Seasonal and tissue-specific regulation of canary androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*, 134:640-9.
- Noya, A., Casasús, I., Ferrer, J., y Sanz, A. (2019). Effects of Developmental Programming Caused by Maternal Nutrient Intake on Postnatal Performance of Beef Heifers and Their Calves. *Animals (Basel)*. 3;9(12):1072. doi: 10.3390/ani9121072. PMID: 31816876; PMCID: PMC6940779.
- O'Hara, L., y Smith, L.B. (2015). Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 29, 595-605. doi:10.1016/j.beem.2015.04.006
- Ola, M.S., Nawaz, M., y Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 351(1-2):41-58.
- Orth, J.M., Gunsalus, G.L., y Lamperti, A.A. (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.
- O'Shaughnessy, P.J., Mitchell, R.T., Monteiro, A., O'Hara, L., Cruickshanks, L., der Grinten, H.C., ... Smith, L.B. (2019). Androgen receptor expression is required to ensure development of adult Leydig cells and to prevent development of steroidogenic cells with adrenal characteristics in the mouse testis. *BMC Developmental Biology*. 17;19(1):8. doi: 10.1186/s12861-019-0189-5. PMID: 30995907; PMCID: PMC6472051.
- O'Shaughnessy, P.J. (2014). Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *seminars in cell & developmental biology* 29:55-65.
- P, Genovese., V. Riaño., S, Alzugaray., C, Pombo., y A, Bielli. (2011). En Jason E.Lee (Ed.), Undernutrition from fetal life to puberty, fetal programming and compensatory growth in rat testes. En: *Undernutrition: Effects, Causes and Management (2011)*. 1er ed. New York, Cap. 4, pp.73-86.
- Pedrana, G., Viotti, H., Lombide, P., Cavestany, D., Martin, G.B., Vickers, M.H., y Sloboda, D.M. (2020). Maternal undernutrition during pregnancy and lactation affects testicular morphology, the stages of spermatogenic cycle, and the testicular IGF-I system in adult offspring. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 11(5):473-483. doi: 10.1017/S2040174420000306.
- Pelletier, G., Labrie, C., y Labrie, F. (2000). Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology* 165:359-70.
- Pourhassanali, N., Roshan-Milani, S., Kheradmand, F., Motazakker, M., Bagheri, M., y Saboory, E. (2016). Zinc attenuates ethanol-induced Sertoli cell toxicity and apoptosis through caspase-3 mediated pathways. *Reproductive Toxicology* 61:97-103.
- Qu, W., Ma, L.P., Yan, H.Y., Liu, S., Liu, H.X., Chen, T., ... Ping, J. (2017). Enhanced thymocyte apoptosis induced by maternal undernutrition in late gestation results

in declined mature T cells in rat fetal thymus. *Environmental Toxicology Pharmacology* 56:50-55.

- Ramos, Cd,F., da Silva, A.M., Costa, W.S., y Sampaio, F.J. (2006). Stereological evaluation of the seminiferous tubules of rats after maternal undernutrition during the lactation period. *Urologia Internationalis* 76:63-6.
- Rebourcet, D., O'Shaughnessy, P.J., Monteiro, A., Milne, L., Cruickshanks, L., Jeffrey, N., Smith, L.B. (2014). Sertoli cells maintain Leydig cell number and peritubular myoid cell activity in the adult mouse testis. *PLoS One*, 9 (8):e105687.
- Rebourcet, D., O'Shaughnessy, P.J., Pitetti, J.L., Monteiro, A., O'Hara, L., Milne, L., Smith, L.B. (2014). Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis. *Development*, 141:2139-49.
- Rey, R.A., Musse, M., Venara, M., y Chemes, H.E. (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. *Microscopy Research and Technique* 72:787-95.
- Rodríguez-González, G.L., Reyes-Castro, L.A., Vega, C.C., Boeck, L., Ibáñez, C., Nathanielsz, P.W., ... 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.
- Roosen-Runge, E.C., y Anderson, D. (1959). The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. *Acta Anatomica (Basel)* 37:125-37.
- Russell, L.D., Peterson, R.N. (1984). Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *Journal of reproduction and fertility* 70:635-641.
- Sar, M., Lubahn, D.B., French, F.S., y Wilson, E.M. (1990). Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 127: 3180-6.
- Sertoli E. (1865). Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. *Morgagni* 7:31-40.
- Shamsi-Gamchi, N., Razi, M., y Behfar, M. (2018). Testicular torsion and reperfusion: evidences for biochemical and molecular alterations. *Cell Stress Chaperones*. 23(3):429-439. doi: 10.1007/s12192-017-0855-0.
- Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C., y Fisher, J.S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125:769-84.
- Shi, S.H., Jiang, L., Xie, H.Y., Xu, J., Zhu, Y.F., y Zheng, S.S. (2015). The effect of secondary cholestasis on the CD68-positive and CD163-positive macrophage population, cellular proliferation, and apoptosis in rat testis. *Journal of Reproductive Immunology* 110:36-47.
- Simanainen, U., McNamara, K., Davey, R.A., Zajac, J.D., y Handelsman, D.J. (2008). Severe subfertility in mice with androgen receptor inactivation in sex accessory organs but not in testis. *Endocrinology*, 149:3330-8.
- Smith, LB., y Walker, W.H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 30:2-13.

- Stanley, E., Lin, C.Y., Jin, S., Liu, J., Sottas, C.M., Ge, R., ... Chen, H. (2012). Identification, proliferation, and differentiation of adult Leydig stem cells. *Endocrinology* 153(10):5002-10.
- Steinberger, A., y Steinberger, E. (1971). Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biology of Reproduction* 4:84-7.
- Su, D.M., Feng, Y., Wang, L., Wu, Y.L., Ge, R.S., y Ma, X. (2018). Influence of fetal Leydig cells on the development of adult Leydig cell population in rats. *Journal of Reproduction and Development*. 2018 Jun 22;64(3):223-231. doi: 10.1262/jrd.2017-102.
- Tan, K.A., De Gendt, K., Atanassova, N., Walker, M., Sharpe, R.M., Saunders, P.T., ... 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.
- Tang, J., He, G., Yang, Y., Li, Q., He, Y., Yu, C., y Luo, L. (2022). Histological analysis of spermatogenesis and the germ cell seasonal development within the testis of domesticated tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). *folia morphologica (warsz)*. 81(2):412-420. doi: 10.5603/FM.a2021.0048.
- Teixeira, C.V., Silandre, D., de Souza Santos, A.M., Delalande, C., Sampaio, F.J., Carreau, S., y da Fonte Ramos, C. (2007). Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *Journal of Endocrinology*. 192:301-11.
- Thuillier, R., Mazer, M., Manku, G., Boisvert, A., Wang, Y., y Culty, M. (2010). Interdependence of platelet-derived growth factor and estrogen-signaling pathways in inducing neonatal rat testicular gonocytes proliferation. *biology reproduction*. 82(5):825-36. doi: 10.1095/biolreprod.109.081729.
- Tian, P., Lv, P., Shi, W., Zhu, M., Cong, B., y Wen, B. (2019). Chronic stress reduces spermatogenic cell proliferation in rat testis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 1;12(5):1921-1931. PMID: 31934015; PMCID: PMC6947124.
- Toledo, F.C., Perobelli, J.E., Pedrosa, F.P., Anselmo-Franci, J.A., y Kempinas, W.D. (2011). In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. *Reproductive Biology Endocrinology* 24;9:94. doi: 10.1186/1477-7827-9-94. PMID: 21702915; PMCID: PMC3141647.
- Tran, N., Servos, G., y Haider, S.G.. (2006). Ultrastructure of cell contacts of fetal and adult Leydig cells in the rat: a systematic study from birth to senium. *Anatomy and embryology (Berl)*. 211(4):273-82.
- Vornberger, W., Prins, G., Musto, N.A., y Suarez-Quian, C.A. (1994). Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134:2307-16.
- Wang, R.S., Yeh, S., Tzeng, C.R., y Chang, C. (2009). Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*. 30(2):119-32. doi: 10.1210/er.2008-0025.

- Wen, Q., Wang, Y., Tang, J., Cheng, C.Y., y Liu, Y.X. (2016). Sertoli Cell Wt1 Regulates Peritubular Myoid Cell and Fetal Leydig Cell Differentiation during Fetal Testis Development. *PLoS One*, 11, e0167920.
- Widdowson y McCance. (1975). A Review: New Thoughts on Growth. *Pediatric Research*. 9: 154-156 (1975)
- Wong, W.J., y Khan, Y.S. (2021). Histology, Sertoli Cell. *StatPearls Publishing*. PMID: 32809466.
- Woodall, S.M., Breier, B.H., Johnston, B.M., y Gluckman, P.D. (1996). A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: effects on the somatotrophic axis and postnatal growth. *Journal of Endocrinology* 150:231-42.
- Yang, Z., Wreford, N.G., y de Kretser, D.M. (1990). A quantitative study of spermatogenesis in the developing rat testis. *Biology of Reproduction* 43(4):629-35.
- Ye, L., Li, X., Li, L., Chen, H., y Ge, R.S. (2017). Insights into the Development of the Adult Leydig Cell Lineage from Stem Leydig Cells. *Frontiers in Physiology* 28;8:430
- Zhang, C., Yeh, S., Chen, Y.T., Wu, C.C., Chuang, K.H., Lin, H.Y., ... Chang C. (2006). Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(47):17718-23.
- Zhu, L.J., Hardy, M.P., Inigo, I.V., Huhtaniemi, I., Bardin, C.W., y Moo-Young, A.J. (2000). Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biology of Reproduction* 63:368-76.