

## ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA EN TESTÍCULOS FETALES DE OVINOS TRATADOS IN UTERO CON BETAMETASONA.

Pedrana G<sup>1</sup>, Mernies B<sup>2</sup>, Pérez W<sup>1</sup>, Vitarella F<sup>1</sup>, Baravalle C<sup>3</sup>, Velásquez M<sup>3</sup>, Bielli A<sup>1</sup>, Martin GB<sup>4</sup>, Ortega H<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

<sup>2</sup>Departamento de Genética y Mejora Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República

<sup>3</sup>Cátedra de Biología Celular, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral

<sup>4</sup>School of Animal Biology, University of Western Australia, Australia.

### Resumen

El tratamiento prenatal con glucocorticoides (ej: betametasona) es una terapia común en mujeres embarazadas con riesgo de parto prematuro. Sin embargo, los efectos secundarios potenciales sobre el desarrollo testicular fetal no han sido aún estudiados. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la administración de betametasona en la expresión de *Caspasa*, *Bcl-2* y *Bax* en testículos de fetos ovinos. Se utilizaron fetos de ovejas Merino (n=12) que fueron tratados con betametasona (0,5 mg/kg) o con suero salino en 104 y 111 días de gestación. Se realizó el estudio inmunohistoquímico en preparados de testículos a los 116 días de gestación. Se evaluó el porcentaje del área inmunomarcada por medio de análisis de imagen. En todos los testículos evaluados fue detectada la inmunoexpresión de *Bcl-2*, *Bax* y *Caspasa*. El tratamiento de betametasona estimuló la expresión de la proteína *Bax* (36, 1±4, 40), sin embargo no se registraron diferencias entre animales controles y los tratados en la expresión de *Caspasa* (29,0±4,49; 35,6±4,49) o *Bcl-2* (26,3±3,95; 27,2±3,95). Concluimos que el tratamiento glucocorticoides estimuló la expresión testicular de un promotor importante de apoptosis (*Bax*). La administración de betametasona parece regular el equilibrio alejándose de la inhibición y promoviendo la apoptosis. Por lo tanto la administración de glucocorticoides puede influenciar el desarrollo testicular y quizás función reproductiva en vida postnatal. Ahora necesitamos probar si el tratamiento prenatal de glucocorticoides altera de forma permanente el desarrollo testicular, programando la fertilidad en el animal adulto. Ésta es la primera descripción de la distribución celular de los marcadores del apoptosis, *Caspasa*, *Bcl2* y *Bax*, en tejido testicular de fetos tratados con glucocorticoides en el último trimestre de la gestación.

**Palabra clave:** testículo, programación fetal, apoptosis, betametasona

### Introducción

Diversos factores ambientales pueden influir sobre el desarrollo prenatal produciendo efectos estructurales y funcionales que persisten durante la vida del animal (Fowden and Forhead, 2004; Rhind, S. M., 2004). Entre esos factores, los glucocorticoides administrados durante el período prenatal afectan de forma significativa el eje hipotálamo hipofisario (Sloboda et al., 2007). Por otra parte también se ha observado que los glucocorticoides alteran las células de Leydig en ratas adultas, generando apoptosis o muerte celular programada (Hui et al., 2002). La apoptosis celular puede ser detectada a través del incremento de algunas

proteínas como ser las Caspasas o *Bax* (pro-apoptóticas), o mediante la disminución de proteínas anti-apoptóticas como la *Bcl2* (Finucane et al., 1999).

Nuestro objetivo fue determinar si la exposición prenatal a la betametasona regula la expresión de proteínas asociadas a la apoptosis en el testículo fetal de ovinos.

### Materiales y Materiales

Se utilizaron ovejas Merino Australiano que fueron inyectadas a los 104 y 111 días de gestación con betametasona en dosis de 0,5 mg/kg (tratados, n= 6) o con suero salino (controles, n=6). Se colectaron y fijaron en solución de Bouin los testículos de fetos machos a los 116 días de gestación. Se realizó la técnica de inmunohistoquímica (Ortega et al, 2006) con anticuerpos policlonales para la detección de las proteínas *Caspasa 3* (dilución 1:500, R&D Systems, Inc.), *Bcl-2* (dilución 1:200, Abcam) y *Bax* (dilución 1:30, BioGenex). Se capturaron imágenes histológicas por medio de microscopio óptico (BX50, Olympus, Tokyo, Japón) conectado a una cámara de video (SSC-C158P, Sony, Japón) y se midió el porcentaje del área inmunomarcada mediante análisis de imagen con software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

Los resultados se expresaron como medias ± error estándar. Las medias entre grupos se compararon mediante Análisis de Varianza (ANOVA) con Statistical Graphic Corp, Rockville, Maryland, USA, con un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

### Resultados

Todos los testículos fetales mostraron inmunoexpresión para las proteínas *Bcl-2*, *Bax* y *Caspasa* como se observa en la tabla N° 1. Se detectaron diferencias significativas entre los animales tratados y controles para la inmunoexpresión de la proteína *Bax*. Sin embargo no fueron significativas las expresiones de *Bcl-2* y *Caspasa*. En la foto A se observa una imagen del parénquima testicular fetal de un animal tratado con betametasona. El citoplasma de las células intersticiales y de los cordones testiculares se marcó intensamente debido a la expresión de la proteína pro-apoptótica *Bax*.



Tabla Nº 1. Inmunoexpresión de proteínas apoptóticas en testículo fetal de ovinos tratados in utero con betametasona.

Proteína	% de inmunomarcación (media ± error estandar)	
	Testículos tratados	Testículos Controles
<i>Bax</i>	36,11 ±4,40a	18,22 ±3,41b
<i>Caspasa</i>	35,63 ±4,49 a	29,02 ±4,49 a
<i>Bcl-2</i>	27,23 ±3,95 a	26,32 ± 3,95a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas,  $p < 0,05$ .

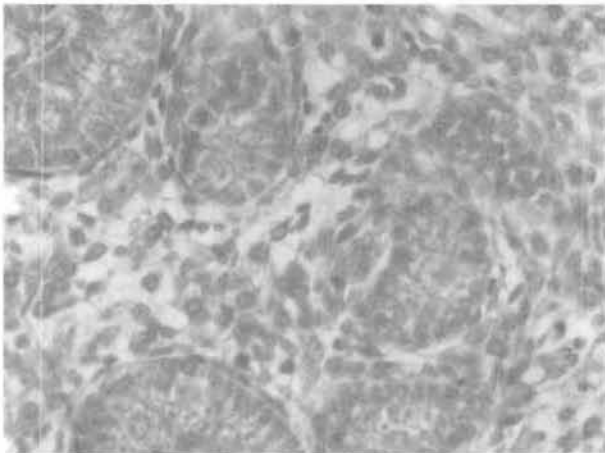


Foto A. Imagen histológica de parénquima testicular fetal de ovino tratado con betametasona y marcado con anticuerpo anti Bax. Barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

### Conclusiones

La administración intrauterina de betametasona estimuló la expresión de un promotor importante de la apoptosis (*Bax*) en el tejido testicular fetal ovino. Esto podría influenciar el desarrollo testicular y su actividad reproductiva postnatal. Resulta de interés continuar estos estudios ya que el ovino puede ser utilizado como un modelo experimental extrapolable a la especie humana, donde el uso de glucocorticoides en mujeres con riesgo de parto prematuro es rutinario.

### Summary

Prenatal treatment with glucocorticoid (eg, betamethasone) is common in pregnant women with a risk of premature delivery. However, potential side-effects on fetal testicular development have not all been assessed. Our objective was to evaluate the effects of betamethasone administration on the expression of *Caspase*, *Bcl-2* and *Bax* proteins in fetal testis in Merino sheep. Ewes bearing singleton fetuses ( $n=12$ ) were injected sc with saline or 0,5 mg/kg betamethasone at 104 and 111 days of gestation. We perform immunohistochemistry in testis at 116 days of gestation and percentage of immunostaining area was measured by image analysis. At 116 days of gestation, fetal sheep testes

from both treated and control animals, expressed *Bax*, *Caspase* and *Bcl-2*. Betamethasone treatment stimulated the production of *Bax* protein (36, 1±4, 40), but no differences were found between control and treated animals in the expression of *Caspase* (29,0±4,49; 35,6±4,49) or *Bcl-2* (26,3±3,95; 27,2±3,95). We conclude that glucocorticoid treatment stimulated the testicular expression of a major promoter of apoptosis (*Bax*). Betamethasone administration appeared to shift the balance away from inhibition and towards promotion of apoptosis. Therefore glucocorticoid administration can influence testicular development and perhaps reproductive function in post-natal life. We now need to test whether prenatal glucocorticoid treatment permanently alters testicular development, thus programming adult male fertility. This is the first description of the cellular distribution of the markers of apoptosis, *Caspase*, *Bcl2* and *Bax*, in testicular fetal tissue in last trimester of gestation treated with glucocorticoid.

**Key word:** testis, fetal programming, apoptosis, betamethasone

### Referencias bibliográficas

1. Finucane DM, Bossy-Wetzel E., Waterhouse NJ, Cotter TG, and Green DR, 1999: Bax-induced Caspase Activation and Apoptosis via Cytochrome c Release from Mitochondria Is Inhibitable by Bcl-xL. *J. Biol. Chem*, Vol. 274, Issue 4, 2225-2233.
2. Hui-Bao Gao, Ming-Han Tong, Yan-Qiang Hu, Qing-Su Guo, Renshan Ge, Matthew P. Hardy, 2002: Glucocorticoids Induces Apoptosis in Rat Leydig Cells. *Endocrinology* 143,130-138.
3. Ortega HH, Salvetti NR, Baravalle C, Lorente JA, Mira GA, 2006: Oestradiol Induced Inhibition of Neuroendocrine Marker Expression in Leydig Cells of Adult Rats. *Reproduction in Domestic Animals* 41 (3) , 204–209.
4. Rhind, S. M., 2004: Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. *Anim. Reprod. Sci.* 82 83, 20 169–181.
5. Sloboda, D. M., T. J. Moss, S. Li, D. Doherty, I. Nitsos, J. R. G. Challis, and J. P. Newnham, 2007: Prenatal betamethasone exposure results in pituitary-adrenal hyporesponsiveness in adult sheep. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, 61–70.