



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**



**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EFEECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES *IN UTERO* SOBRE  
LAS PROTEÍNAS APOPTÓTICAS Y DE CICLO CELULAR EN  
EL TESTÍCULO DE OVINOS**

**Immunoexpresión De las Proteínas Caspasa-3, Bax, Bcl-2 Y PCNA Durante El  
Desarrollo Testicular Pre Y Postnatal Tras La Administración De Betametasona  
Durante La Gestación.**

**GRACIELA PEDRANA**

**TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY  
2013**

**ESTA HOJA VA EN BLANCO**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EFFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES *IN UTERO* SOBRE  
LAS PROTEÍNAS APOPTÓTICAS Y DE CICLO CELULAR EN  
EL TESTÍCULO DE OVINOS**

**Immunoexpresión De las Proteínas Caspasa-3, Bax, Bcl-2 Y PCNA Durante El  
Desarrollo Testicular Pre Y Postnatal Tras La Administración De Betametasona  
Durante La Gestación.**

**GRACIELA PEDRANA**

Hugo Ortega

Daniel Cavestany

**Director de Tesis**

**Co-director**

**2013**

# **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE**

## **DEFENSA DE TESIS**

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

**Ana Meikle; DVM, PhD  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República – Uruguay**

**Rossana Sapiro; Dra, PhD  
Facultad de Medicina  
Universidad de la República – Uruguay**

**Julio Olivera; Msc  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República - Uruguay**

**2013**

**EN ESTA HOJA VA LA COPIA DEL  
ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

**En esta hoja va el Informe del Tribunal**

## **AGRADECIMIENTOS**

Especialmente a mi madre que luchó por darme una sólida educación y fortaleza frente a la pérdida de mi padre.

Y también a mi padre y abuelos por darme una sólida formación humana necesaria para enfrentar los retos de la vida.

A mis hijas María Victoria y María Agustina mis soles y razón de ser.

A mi compañero de camino, quien me acompaña siempre.

A mis primas y primos, tías y tíos, por ser apoyo constante en todas las etapas de la vida.

A mis amigas y amigos por su calidad humana. Especialmente a Helen Viotti por su gran aporte y entusiasmo por la ciencia, buena onda y apoyo incondicional junto con mis estudiantes de tesis

Por último a mis tutores por darme la oportunidad de progresar en mi carrera académica, pero además por darme la posibilidad de abrir mi mente y mis horizontes

Sin todos ellos no habría sido posible la realización de esta tesis.

## **DEDICATORIAS**

*A mis padres, a mi esposo y mis hijas*

*“Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás. No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, gente de fuego loco, que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca, se enciende”.*

**Eduardo Galeano. El libro de los Abrazo**



## RESUMEN

El concepto de “programación fetal” propone que un estímulo o insulto que actúe durante un periodo crítico del desarrollo intrauterino puede alterar permanentemente la estructura y función de un determinado órgano o sistema. Los efectos de la programación están dados por el momento de la exposición y del desarrollo de órganos. El término “programación fetal” surge para explicar las asociaciones entre el bajo peso al nacimiento y los trastornos posteriores por ejemplo enfermedades cardiovasculares, neuroendocrinas y metabólicas posteriores en la vida. En este sentido el estrés prenatal o un exceso de glucocorticoides tanto endógenos como exógenos durante la vida fetal han sido estudiados como factores de programación incrementando la predisposición a enfermedades cardiovasculares y metabólicas postnatales. Sin embargo, el tratamiento prenatal con glucocorticoides se utiliza en mujeres gestantes con riesgo de parto prematuro para inducir la maduración fetal. A pesar de los efectos positivos, los glucocorticoides administrados en ese momento pueden producir efectos deletéreos en el testículo en la vida adulta. Nuestra hipótesis sugiere que los glucocorticoides *in utero* producen cambios estructurales a nivel del testículo. Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió la acción de los glucocorticoides prenatales sobre el desarrollo del testículo pre y postnatal en ovinos. Ovejas preñadas de raza Merino Australiano (n = 42) con solo feto macho, fueron asignadas al azar para recibir inyecciones intramusculares de solución salina o betametasona (0,5 mg / kg) a los 104, 111 y 118 días de gestación (DG). Las crías macho fueron pesadas y luego sacrificadas a los 121 y 132 DG, y a los 45 y 90 días postnatales (PD) y sus testículos de fueron disecados, pesados y fijados en solución fijadora de Bouin y procesados para estudios morfológicos e inmunohistoquímicos. Se capturaron imágenes digitales a partir de las cuales se realizó el análisis morfométrico cuantitativo (volumen de cordones sexuales e intersticio testicular, diámetro de los cordones sexuales) y análisis inmunohistoquímico (% de inmunomarcación) para activa caspasa-3 activa, Bax, Bcl-2 y proteínas del ciclo celular (PCNA). El diámetro de los cordones sexuales a los 121 DG, 45 y 90 PD, disminuyó en los animales tratados con betametasona comparados con sus respectivos controles y disminuyó el volumen de los cordones sexuales y el volumen absoluto del intersticio a los 90 PD. La expresión de la proteína caspasa-3 activa disminuyó en los tratados con betametasona a los 121 DG y 90 PD. La expresión de la proteína Bax aumento en todos animales tratados con betametasona pre y posnatales. La expresión de las proteínas Bcl-2 y PCNA fue menor en los animales tratados con betametasona a los 121 DG y 45 PD, pero aumentó a los 132 DG y 90 PD, comparando con los controles. En conclusión, los resultados obtenidos indican que la administración prenatal de altos niveles de glucocorticoides reduce el desarrollo testicular, a través de cambios morfológicos y en el balance entre proteínas pro- y anti-apoptóticas y de ciclo celular. Estos resultados podrían sugerir un compromiso en el potencial espermatogénico futuro de la progenie.

## SUMMARY

The concept of "fetal programming" proposes that a stimulus or insult acting during a critical period of development may permanently alter the structure and function. The effects of programming are determined by the time of exposure and organs development. The term "fetal programming" show to explain the associations between low birth weight and later diseases in life for example cardiovascular, neuroendocrine and metabolic disorders. Thus, prenatal stress or endogenous and exogenous glucocorticoids overexposure to during fetal life have been considered as factors increasing susceptibility to programming of cardiovascular and metabolic diseases. Conversely, prenatal treatment with glucocorticoids is used in pregnant women at risk of preterm delivery to induce fetal lung maturation. Despite the positive effects, glucocorticoids in adults can produce deleterious effects tissues such as the testis. Our hypothesis suggests that *in utero* glucocorticoids will program structural changes at the level of the testis. Therefore, in the present work, we studied the action of *in utero* glucocorticoids on prenatal development and postnatal testis in sheep. Pregnant Merino ewes (n = 42) bearing singleton fetus were randomly allocated to receive intramuscular injections of saline or betamethasone (0.5 mg / kg) at 104, 111 and 118 days of gestation (DG). The male offspring were weighed and then sacrificed at 121 and 132 DG, and 45 and 90 postnatal days (PD) and their testes were dissected, weighed and fixed in Bouin's fixative and analyzed for morphological and immunohistochemical studies. Digital images were captured and quantitative morphometric analysis were performed (sex cord volume and interstitial tissue, sex cord diameter) and immunohistochemical analysis (% immunostaining area) for active active caspase-3, Bax, Bcl-2 and cell cycle proteins (PCNA). Compared to their respective controls, sex cords diameter at 121 DG, 45 and 90 PD, decreased in betamethasone-treated animals and sex cord volume and absolute volume of interstitial tissue decreased at 90 PD. The active caspase-3 protein immunoexpression decreased in betamethasone-treated animals at 121 DG and 90 PD. Bax protein immunoexpression increased in betamethasone-treated animals at pre and postnatal period. Bcl-2 and PCNA immunoexpression was lower in betamethasone-treated animals at 121 DG and 45 PD, but increased to 132 and 90 PD DG, compared to controls. We conclude that prenatal administration of high levels of glucocorticoids reduces testicular development, through morphological changes and protein balance between pro-and anti-apoptotic and cell cycle. These outcomes could suggest a compromise the future spermatogenic potential of male offspring.

# ÍNDICE

<b>A. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
1. Programación fetal	6
2. Glucocorticoides	6
3. Testículo	7
4. Apoptosis	7
<b>B. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS</b>	<b>8</b>
<b>1. Programación fetal</b>	<b>8</b>
1.1. Definición de programación fetal	8
1.2. Ovino como modelo de programación fetal	8
1.3. Factores de programación fetal	9
1.4. Glucocorticoides como factores de programación fetal	9
<b>2. Glucocorticoides</b>	<b>9</b>
2.1. Generalidades de glucocorticoides	9
2.2. Estructura química de los glucocorticoides	10
2.3. Mecanismos moleculares de acción de los glucocorticoides	10
2.4. Acciones sistémicas de los glucocorticoides en individuos adultos	11
2.5. Glucocorticoides y estrés en animales adultos	12
2.6. Efectos positivos de los glucocorticoides prenatales	12
2.7. Efectos negativos de los glucocorticoides prenatales	13
2.8. Glucocorticoides a nivel testicular	13
<b>3. Testículo</b>	<b>13</b>
3.1. Histología Testicular	13
3.2. Citología testicular	13
3.2.1. Células germinales	13
3.2.2. Células de Sertoli	14
3.2.3. Células de Leydig	15
<b>4. Proceso de apoptosis</b>	<b>13</b>
4.1. Definición de apoptosis	15
4.2. Características de la apoptosis	16
4.3. Mecanismos moleculares de activación de la apoptosis	16
4.4. Cisteinil aspartato proteasas: caspasas	17
4.5. Bax y Bcl-2	17
4.6. Rol de las caspasas, Bax y Bcl-2 en células testiculares	18

<b>C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	22
<b>D. HIPÓTESIS</b>	22
<b>E. OBJETIVOS</b>	22
1. Objetivo General	22
2. Objetivos Específicos	22
<b>F. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN</b>	23
<b>G. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	23
1. Diseño experimental	23
2. Animales	23
3. Procesamiento histológico	24
4. Análisis estereológicos	24
5. Estudios de inmunohistoquímica	25
6. Análisis de imágenes de inmunohistoquímica	26
7. Análisis estadísticos	27
<b>H. RESULTADOS</b>	28
1. Resultados de peso corporal y peso testicular	28
2. Resultados estereológicos	29
2.1. Volumen porcentual y absoluto en el parénquima testicular	29
2.2. Diámetro de cordones sexuales/túbulos seminíferos	30
3. Resultados de inmunohistoquímica	32
3.1. Resultados de expresión de caspasa-3 activa	33
3.2. Resultados de expresión de Bax	35
3.3. Resultados de expresión de Bcl-2	36
3.4. Resultados de expresión de PCNA	39
<b>I. DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
<b>J. CONCLUSIONES</b>	44
Perspectivas a futuro	44
<b>K. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	45
<b>ANEXOS</b>	53
Publicación	

# LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

## Figuras

Figura 1. Estructura de los glucocorticoides. Principal estructura del colesterol, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, dexametasona, betametasona.

Figura 2. Esquema de desarrollo del testículo en ovinos, etapas claves en el desarrollo de estructuras, compartimentos y células testiculares.

Figura 3. Representación del proceso de apoptosis y vías apoptóticas.

Figura 4. Representación del desarrollo de células de la línea germinal durante la embriogénesis y la primera onda de espermatogénesis y sus factores promotores y los inhibidores de la apoptosis.

Figura 5. Representación del diseño experimental.

Figura 6. Imágenes de proceso de segmentación de imágenes de inmunohistoquímica del parénquima testicular.

Figura 7. Efecto del tratamiento *in utero* con betametasona durante la gestación sobre el peso testicular y el peso corporal.

Figura 8. Imágenes de microscopía óptica con técnica de Hematoxilina-Eosina del parénquima testicular ovino luego del tratamiento *in utero* con glucocorticoide.

Figura 9. Efectos de la administración prenatal de glucocorticoides sobre la morfología del parénquima testicular durante el desarrollo pre y postnatal.

Figura 10. Cuantificación de la inmunoexpresión de proteínas apoptóticas y marcador de proliferación celular.

Figura 11. Imágenes de inmunohistoquímica representativas de la expresión de caspasa-3 en el parénquima testicular luego tratamiento *in utero* con betametasona.

Figura 12. Imágenes de inmunohistoquímica representativas de la expresión de Bax en el parénquima testicular luego del tratamiento *in utero* con betametasona.

Figura 13. Imágenes de inmunohistoquímica representativas de la expresión de Bcl-2 en el parénquima testicular luego del tratamiento *in utero* con betametasona.

Figura 14. Imágenes de inmunohistoquímica representativas de la expresión de antígeno de proliferación celular (PCNA) en el parénquima testicular luego del tratamiento *in utero* con betametasona.

# ÍNDICE

## A. INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo testicular pre y postnatal	7
2. Programación fetal	7
3. Glucocorticoides como factores de programación fetal	7
4. Efectos de los glucocorticoides a nivel del testículo en desarrollo	8
5. Apoptosis testicular	8

## B. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS 10

### 1. Programación fetal 10

1.1. Definición de programación fetal	10
1.2. Ovino como modelo de programación fetal	10
1.3. Factores de programación fetal	11
1.4. Glucocorticoides como factores de programación fetal	11

### 2. Glucocorticoides 11

2.1. Generalidades de glucocorticoides	11
2.2. Estructura química de los glucocorticoides	12
2.3. Mecanismos moleculares de acción de los glucocorticoides	13
2.4. Acciones sistémicas de los glucocorticoides en individuos adultos	14
2.5. Glucocorticoides y estrés en animales adultos	15
2.6. Efectos positivos de los glucocorticoides prenatales	15
2.7. Efectos negativos de los glucocorticoides prenatales	16
2.8. Glucocorticoides a nivel testicular	16

### 3. Ontogenia testicular pre y postnatal en ovinos 17

#### 3.1. Diferenciación gonadal 19

3.2. Desarrollo testicular fetal	19
3.2.1 Proliferación fetal de células germinales	19
3.2.2. Proliferación fetal de células de Sertoli	19
3.2.3. Proliferación fetal de células de Leydig	20

#### 3.3. Desarrollo testicular durante la etapa postnatal 20

3.3.1 Proliferación posnatal de células germinales	20
3.3.2. Proliferación posnatal de células de Sertoli	20

#### 3.4. Histología testicular 21

3.4.1. Células germinales	21
---------------------------	----

3.4.2. Células de Sertoli	22
3.4.3. Células de Leydig	22
<b>3.5. Espermatogénesis</b>	<b>23</b>
3.5.1. Fases de la espermatogénesis	24
<b>4. Proceso de apoptosis</b>	<b>25</b>
4.1. Definición de apoptosis	25
4.2. Características de la apoptosis	25
4.3. Mecanismos moleculares de activación de la apoptosis	25
4.4. Proteínas reguladoras de la apoptosis	27
4.4.1. Cisteinil aspartato proteasas: caspasas	27
4.4.2. Familia de proteínas Bcl-2 (B-cell lymphoma): Bax y Bcl-2	27
4.5. Rol de las caspasas, Bax y Bcl-2 en la apoptosis de células testiculares	28
4.5.1. Bax en testículo	29
4.5.2. Bcl-2 en testículo	29
4.5.3. Caspasa-3 en testículo	29
5. Rol del antígeno nuclear de proliferación celular en la regulación del ciclo celular	30
<b>C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>33</b>
<b>D. HIPÓTESIS</b>	<b>33</b>
<b>E. OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
1. Objetivo General	34
2. Objetivos Específicos	34
<b>F. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>35</b>
<b>G. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
1. Diseño experimental	36
2. Animales	36
3. Registro de peso corporal y peso testicular	37
4. Procesamiento histológico	37
5. Coloración de Hematoxilina-eosina	37
6. Análisis estereológicos	37

6.1. Densidad de volumen (Vv)	37
6.2. Volumen absoluto (Av)	38
6.3. Longitud de los cordones sexuales	38
7. Estudios de inmunohistoquímica	39
8. Análisis de imágenes de inmunohistoquímica	39
9. Análisis estadístico	41
<b>H. RESULTADOS</b>	<b>42</b>
1. Resultados de peso corporal y peso testicular	42
1.1. Peso corporal	42
1.2. Peso testicular	42
2. Resultados estereológicos	44
2.1. Volumen porcentual y absoluto en el parénquima testicular	44
2.2. Diámetro de cordones sexuales/túbulos seminíferos	45
3. Resultados de inmunohistoquímica	48
3.1. Resultados de expresión de caspasa-3 activa	48
3.2. Resultados de expresión de Bax	51
3.3. Resultados de expresión de Bcl-2	53
3.4. Resultados de expresión de PCNA	55
<b>I. DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>J. CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
Perspectivas a futuro	62
<b>K. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>70</b>
Publicación	70



## RESUMEN

El concepto de “programación fetal” propone que un estímulo o insulto que actúe durante un periodo crítico del desarrollo intrauterino puede alterar permanentemente la estructura y función de un determinado órgano o sistema. Los efectos de la programación varían de acuerdo al factor y al momento en que se produce la exposición a dicho factor. El término “programación fetal” surge para explicar las asociaciones entre diversos factores durante la vida fetal que producen modificaciones permanentes en mecanismos homeostáticos, llevando a cambios perdurables a largo plazo y determinando susceptibilidad a enfermedades en la vida postnatal. En este sentido el estrés prenatal o un exceso de glucocorticoides tanto endógenos como exógenos durante la vida fetal han sido estudiados como factores de programación incrementando la predisposición a enfermedades cardiovasculares y metabólicas postnatales. Sin embargo, el tratamiento prenatal con glucocorticoides se utiliza en mujeres gestantes con riesgo de parto prematuro para inducir la maduración fetal. A pesar de los efectos positivos, los glucocorticoides administrados en ese momento pueden producir efectos deletéreos en el testículo en la vida adulta. Nuestra hipótesis sugiere que los glucocorticoides *in utero* producen cambios estructurales a nivel del testículo. Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió la acción de los glucocorticoides prenatales sobre el desarrollo del testículo pre y postnatal en ovinos. Ovejas preñadas de raza Merino Australiano (n = 42) con un solo feto macho, fueron asignadas al azar para recibir inyecciones intramusculares de solución salina o betametasona (0,5 mg / kg) a los 104, 111 y 118 días de gestación (DG). Las crías macho fueron pesadas y luego sacrificadas a los 121 y 132 DG, y a los 45 y 90 días postnatales (PD) y sus testículos de fueron disecados, pesados y fijados en solución fijadora de Bouin y procesados para estudios morfológicos e inmunohistoquímicos. Se capturaron imágenes digitales a partir de las cuales se realizó el análisis morfométrico cuantitativo (volumen de cordones sexuales e intersticio testicular, diámetro de los cordones sexuales) y análisis inmunohistoquímico (% de inmunomarcación) para activa caspasa-3 activa, Bax, Bcl-2 y proteínas del ciclo celular (PCNA). El diámetro de los cordones sexuales a los 121 DG, 45 y 90 PD, disminuyó en los animales tratados con betametasona comparados con sus respectivos controles y disminuyó el volumen de los cordones sexuales y el volumen absoluto del intersticio a los 90 PD. La expresión de la proteína caspasa-3 activa disminuyó en los tratados con betametasona a los 121 DG y 90 PD. La expresión de la proteína Bax aumento en todos animales tratados con betametasona pre y posnatales. La expresión de las proteínas Bcl-2 y PCNA fue menor en los animales tratados con betametasona a los 121 DG y 45 PD, pero aumentó a los 132 DG y 90 PD, comparando con los controles. En conclusión, los resultados obtenidos indican que la administración prenatal de altos niveles de glucocorticoides reduce el desarrollo testicular, a través de cambios morfológicos y en el balance entre proteínas pro- y anti-apoptóticas y de ciclo celular. Estos resultados podrían sugerir un compromiso en el potencial espermatogénico futuro de la prole.

## SUMMARY

The concept of "fetal programming" proposes that a stimulus or insult acting during a critical period of development may permanently alter the structure and function. The effects of programming are determined by the time of exposure and organs development. The term "fetal programming" emerge to explain the associations between several factors during fetal life that produce permanent changes in homeostatic mechanisms, leading to long-term change and determining susceptibility to diseases in postnatal life. Thus, prenatal stress or endogenous and exogenous glucocorticoids overexposure to during fetal life have been considered as factors increasing susceptibility to programming of cardiovascular and metabolic diseases. Conversely, prenatal treatment with glucocorticoids is used in pregnant women at risk of preterm delivery to induce fetal lung maturation. Despite the positive effects, glucocorticoids in adults can produce deleterious effects tissues such as the testis. Our hypothesis suggests that *in utero* glucocorticoids will program structural changes at the level of the testis. Therefore, in the present work, we studied the action of *in utero* glucocorticoids on prenatal development and postnatal testis in sheep. Pregnant Merino ewes (n = 42) bearing singleton fetus were randomly allocated to receive intramuscular injections of saline or betamethasone (0.5 mg / kg) at 104, 111 and 118 days of gestation (DG). The male offspring were weighed and then sacrificed at 121 and 132 DG, and 45 and 90 postnatal days (PD) and their testes were dissected, weighed and fixed in Bouin's fixative and analyzed for morphological and immunohistochemical studies. Digital images were captured and quantitative morphometric analysis were performed (sex cord volume and interstitial tissue, sex cord diameter) and immunohistochemical analysis (% immunostaining area) for active active caspase-3, Bax, Bcl-2 and cell cycle proteins (PCNA). Compared to their respective controls, sex cords diameter at 121 DG, 45 and 90 PD, decreased in betamethasone-treated animals and sex cord volume and absolute volume of interstitial tissue decreased at 90 PD. The active caspase-3 protein immunoexpression decreased in betamethasone-treated animals at 121 DG and 90 PD. Bax protein immunoexpression increased in betamethasone-treated animals at pre and postnatal period. Bcl-2 and PCNA immunoexpression was lower in betamethasone-treated animals at 121 DG and 45 PD, but increased to 132 and 90 PD DG, compared to controls. We conclude that prenatal administration of high levels of glucocorticoids reduces testicular development, through morphological changes and protein balance between pro-and anti-apoptotic and cell cycle. These outcomes could suggest a compromise the future spermatogenic potential of male offspring.

## A. INTRODUCCIÓN

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas que tienen gran influencia en el organismo. Ellos modulan la expresión de genes en numerosas células de un individuo y son esenciales para la vida. Pero por otro lado están implicados en los orígenes de enfermedades y en la producción de efectos adversos. Los glucocorticoides poseen fuerte acción inmunosupresora y anti-inflamatoria, y son muy utilizadas en medicina veterinaria y humana. En animales adultos existen evidencias que la elevación de glucocorticoides produce una disminución de la concentración de testosterona en machos. La testosterona es esencial para el desarrollo de una espermatogénesis normal, y para la supervivencia de las células germinales en los túbulos seminíferos. Cuando el ambiente testicular no es adecuado para sustentar la espermatogénesis, se activan vías específicas que conducen a la apoptosis de células germinales. Sin embargo, una apoptosis aumentada de las células germinales puede llevar a un desequilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular, dando lugar a alteración de la espermatogénesis. En mamíferos, han sido definidas dos grandes vías pro-apoptóticas. Una de las vías, la vía extrínseca, es mediada por la activación a través de ligando ubicado en la hoja externa de la membrana celular a través del sistema FasL / Fas. La segunda vía intrínseca o mitocondrial, involucra proteínas que actúan a nivel de la mitocondria como las proteínas, Bax, Bcl-2. Dependiendo del balance entre Bax y Bcl-2 y otras proteínas apoptóticas se determinará la formación de un poro, con la consiguiente liberación de citocromo-c desde la mitocondria, e iniciación de la cascada apoptótica, formación de complejo apoptosómico, activación de las proteínas pro-apoptóticas caspasa-9 y caspasa-3. Este fenómeno marca un punto de no retorno, activando la desintegración del citoesqueleto y la fragmentación del ADN. En el presente estudio, se investigó los efectos de la betametasona *in utero* sobre la histología testicular durante el desarrollo pre y postnatal y sobre la expresión de las proteínas apoptóticas caspasa-3, Bax, Bcl-2 y la expresión de una proteína que actúa como factor regulador del ciclo celular (PCNA) en las células testiculares de ovinos.

## 1. Desarrollo testicular pre y postnatal

Durante el desarrollo testicular se desarrollan cambios morfológicos y funcionales pasando desde la vida fetal hasta la pubertad. Durante su ontogenia, los testículos se desarrollan adquiriendo características morfológicas y funcionales específicas en los diferentes compartimentos testiculares que determinarán finalmente, si se dan las condiciones medioambientales necesarias, una espermatogénesis normal en el individuo adulto. Todos los factores que actúen durante los períodos embrionario, fetal y postnatal tendrán influencia sobre el crecimiento y desarrollo testicular potenciando o no los cambios necesarios para llegar a la adultez.

## 2. Programación fetal

Durante el desarrollo fetal existen eventos que determinan la morfología y función de un órgano en la etapa postnatal. Sin embargo existen factores adversos que pueden afectar el desarrollo gestacional, alternando la estructura y función de órganos predisponiendo a enfermedades durante su vida adulta (Rhind et al. 2001, Barker 2007).

El concepto de "programación fetal" propone que un estímulo o insulto que actúa durante un período crítico del desarrollo puede alterar de forma permanente la estructura y función de un tejido persistiendo el cambio durante la vida postnatal (Drake et al. 2007) y predisponiendo a enfermedades en adultos (Abbott et al. 2002, 2008). El impacto de un factor puede afectar asimismo el balance de los sistemas de control, como el eje hipotalámico-pituitario-adrenal y el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Phillips 2001, Recabarren et al. 2008).

## 3. Glucocorticoides como factores de programación fetal

Las glándulas adrenales sintetizan hormonas corticosteroideas que juegan un rol esencial en la el organismo, y son liberados a la circulación en respuesta a factores estresantes por lo que son considerados hormonas vinculadas al estrés , (Sapolsky et al. 2000, Sasagawa et al. 2001). Dichas hormonas son clasificadas como glucocorticoides (cortisol, corticosterona, cortisona) y mineralocorticoides (aldosterona). Los glucocorticoides están involucrados en la regulación del metabolismo de los carbohidratos, proteínas, lípidos, metabolismo oxidativo, balance hidro-electrolítico, respuesta inflamatoria, inmuno-supresivas, etc. (Gupta & Lalchhandama 2002).

Los glucocorticoides adrenales pueden interferir en la embriogénesis y afectar el desarrollo de los sistemas homeostáticos (Bertram & Hanson 2002), con efectos a largo plazo en la descendencia (Ward & Weisz 1980). Por lo tanto se han propuesto a los glucocorticoides como factores de programación fetal (Seckl & Holmes 2007). Además los glucocorticoides regulan el balance entre los procesos de mitosis y apoptosis, por lo que determinan el número total de células en órganos y tejidos en desarrollo (King & Cidlowski 1998) y en la regulación de las vías apoptóticas (Yazawa & Sasagawa 2000, Herr et al. 2007),

Por otra parte, la administración terapéutica de glucocorticoides prenatales se utiliza de rutina en las mujeres gestantes con riesgo de parto prematuro para aumentar la supervivencia del recién nacido (Bishop 1981) mejorando el síndrome de diestrés respiratorio promoviendo la maduración pulmonar fetal (Liggins & Howie 1972, Ikegami et al. 1997).

Sin embargo, la exposición a glucocorticoides *in utero* disminuye el peso al nacimiento en ratas (Ikegami et al. 1997, Stojanoski et al. 2006). Asimismo se ha determinado un aumento en la predisposición a enfermedades cardiovasculares y metabólicas luego del tratamiento *in utero* con glucocorticoides (Tangalakis et al. 1992, Nyirenda & Lindsay 1998, Fowden & Forhead 2009).

#### 4. Efectos de los glucocorticoides a nivel del testículo en desarrollo

Estudios previos evidenciaron que la exposición prenatal a glucocorticoides sintéticos reduce la proliferación de células de Leydig y aumenta la expresión del receptor de glucocorticoides en el tejido testicular en fetos de 108 y 116 días de gestación (Pedrana et al. 2008). En condiciones de estrés materno durante la gestación, con elevación de glucocorticoides, se ha determinado infertilidad de las crías durante la vida postnatal (Moberg 1991), disminuyendo los niveles de testosterona en sangre en las crías macho al llegar a la adultez (Ward & Weisz 1980). El proceso de espermatogénesis testicular en el adulto se lleva a cabo en un microambiente adecuado en el testículo, donde las células de Sertoli y Leydig entre otras permiten alcanzar condiciones óptimas para la producción de gametos. Los factores que modifiquen estas células, podrían alterar finalmente la producción de espermatozoides. Asimismo la producción de espermatozoides en el testículo es regulada por un balance entre los procesos de apoptosis y proliferación celular (Russell et al. 2002).

#### 5. Apoptosis testicular

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso que implica la pérdida fisiológica o remoción selectiva de células durante el desarrollo, la morfogénesis y la diferenciación de muchos órganos, incluyendo las gónadas (Medh & Thompson 2000). En ratas adultas los glucocorticoides exógenos pueden suprimir la apoptosis en las células germinales (Yazawa et al. 2001) y disminuir la esteroidogénesis (Scott et al. 2009). En las células de Leydig, la corticosterona induce el proceso de apoptosis mediante la activación del sistema Fas, el clivaje de la pro-caspasa-3 a la caspasa-3 activa, reducción del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de citocromo C y el aumento de la generación de especies de oxígeno reactivas (Mackay 2000). Por otra parte, Bax es una enzima multi-dominio pro-apoptótica miembro de la familia Bcl-2, que en el testículo adulto promueve la muerte de células dentro del compartimiento basal, sin embargo la muerte de espermatozoides en el compartimiento adluminal implica una vía independiente de Bax (Russell et al. 2002).

Por todo lo anteriormente expuesto en el presente proyecto se evaluó los efectos de los glucocorticoides (betametasona) administrados durante la vida intrauterina, sobre

el desarrollo testicular pre y postnatal temprano en ovinos. Nuestra hipótesis sugiere que el tratamiento *in utero* con glucocorticoides afecta la programación de las células testiculares alterando la morfología testicular y el balance entre la expresión de proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas (activa la caspasa-3, Bcl-2 y Bax) y proteínas implicadas en el ciclo celular y proliferación celular (PCNA), durante el desarrollo testicular pre y postnatal en ovinos, vinculando así nuestras observaciones previas.

## **B. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

### **1. Programación fetal**

#### 1.1. Definición de programación fetal

El término “programación fetal”, hace referencia a alteraciones producidas por diversos factores durante la vida fetal en el ambiente intrauterino que producen cambios permanentes en mecanismos homeostáticos fetales, llevando a cambios perdurables a largo plazo y determinando susceptibilidad a enfermedades durante la vida postnatal o modificaciones perdurables en la vida adulta (Benediktsson et al. 1993, Rhind et al. 2001). El estudio de la programación fisiológica temprana busca explicar las asociaciones entre eventos perinatales, el desarrollo y el crecimiento fetal y postnatal analizando su fisiopatología (Barker, 2004). Los cambios que ocurren durante la vida fetal en respuesta a variaciones en el ambiente uterino pueden ser ventajosos en la vida fetal, pero también aumentar el riesgo de aparición de enfermedades luego del nacimiento (Fowden & Forhead 2004). En las últimas décadas, la hipótesis de la existencia de “programación fetal” generó numerosos reportes sobre los orígenes fetales de las enfermedades en adultos (Bertram & Hanson 2002, Szitanyi et al. 2003). Para que ocurra “programación”, un estímulo debe actuar durante un período sensible o vulnerable del desarrollo denominado período ventana y provocar cambios permanentes en la estructura o función de un organismo o tejidos (Lucas 1998, Seckl & Holmes 2007). Los cambios que ocurren durante la vida fetal en respuesta a variaciones en el ambiente uterino pudieron haber sido ventajosos en la vida fetal, pero generar enfermedades luego del nacimiento. Las consecuencias de estos cambios en la vida fetal pueden repercutir en la función placentaria y por ende sobre el crecimiento y desarrollo del feto generando alteraciones estructurales, funcionales, así como específicamente en el número de las células, siendo estas modificaciones transitorias o persistir en la vida postnatal (Schwartz & Morrison 2005).

#### 1.2. Ovino como modelo de programación fetal

El ovino es considerado uno de los modelos animales donde es posible investigar la fisiología fetal, compartiendo con el humano patrones de crecimiento que lo hacen apropiado para analizar los mecanismos de algunas enfermedades (Hanson 2002). La posibilidad de poder determinar el momento de la gestación de manera precisa y poder manipular la dieta y manejo hormonal es lo que ha hecho del ovino un modelo animal muy utilizado para estudiar los mecanismos subyacentes a los orígenes fetales de enfermedades en adultos. La realización de estudios en humanos es extremadamente dificultosa de llevar a cabo por lo cual la realización de estudios con modelos animales acordes son particularmente importantes y esenciales para el mejoramiento del bienestar y salud del feto y recién nacido.

Como tal, la programación fetal se produce durante los períodos críticos del desarrollo, los cambios se hacen permanentes y conducen a eventos patológicos más tarde. Sin embargo, los mecanismos subyacentes en la fisiopatología de estas asociaciones, no han sido completamente dilucidados (Bertram & Hanson 2001). Existen similitudes en lo que se refiere a los períodos de vulnerabilidad claves o

denominados períodos ventana del desarrollo en los mismos órganos y sistemas prenatales en ovinos y primates humanos y no humanos. Asimismo se han encontrado diferencias sexo específicas en la descendencia en ovinos expuestos a esteroides en exceso durante la gestación (Dodic 2002, Salvetti *et al.* 2012).

### 1.3. Factores de programación fetal

Múltiples factores que afecten o modifiquen el desarrollo fetal podrían determinar cambios a nivel epigenético que originen efectos permanentes sobre el individuo, en su vida postnatal (Rhind *et al.* 2001). La programación prenatal de los tejidos es debida a cambios en el ambiente *in utero*. Pueden estar involucrados factores maternos hormonales, tales como el cortisol, la insulina, u hormonas tiroideas, así como moléculas reguladoras del crecimiento fetal (Fowden & Forhead 2009). Los cambios dependen de la ruta, duración y tiempo de exposición fetal al factor que afecte o programe (Davies & Norman 2002). Estudios recientes confirman a los andrógenos y estrógenos dentro de las hormonas esteroideas como factores de programación fetal en la hembra (Salvetti *et al.* 2012).

### 1.4. Glucocorticoides como factores de programación fetal

Los glucocorticoides juegan un rol crítico en la fisiología de un individuo, ejerciendo sus efectos mediante la unión intracelular a sus receptores (GR), miembros de la superfamilia de receptores nucleares y factores de transcripción ligando-activados (Drake *et al.* 2005). Dichas hormonas regulan el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas, y han sido propuestos como uno de los factores de programación fetal. No solo actúan en el desarrollo estructural de órganos sino también en la maduración funcional de tejidos (Gupta & Lalchandama 2002).

## 2. Glucocorticoides

### 2.1. Generalidades de glucocorticoides

Los glucocorticoides (GC) son hormonas esteroideas sintetizadas por la zona fascicular de la corteza de la glándula adrenal luego de la activación del eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal (HHA) por estímulos de estrés e inflamatorios (Newton 2000). Las hormonas esteroideas sintetizadas por la zona fascicular de la corteza adrenal incluyen el cortisol, la corticosterona, la cortisona y la 11-dehidrocorticosterona. El cortisol es el principal GC producido en la especie humana, cerdos, bóvidos, óvidos (Purchas 1973) y peces, mientras que en roedores, aves y reptiles es la corticosterona. En la circulación están unidas a proteínas transportadoras como la albúmina sérica o las globulinas dado el carácter hidrofóbico de los esteroides. La unión a proteínas transportadoras también aumenta la vida media de los esteroides. Los GC están involucrados en el metabolismo de los tejidos muscular y adiposo. En el hígado los GC estimulan la gluconeogénesis y la síntesis de las enzimas implicadas en la conversión de aminoácidos, glicerol y lactato en glucosa, aumentando la movilización de los aminoácidos desde el músculo. Los GC disminuyen el transporte de glucosa y su utilización por la célula, elevando la concentración de glucosa sanguínea. Los GC aumentan la movilización de los ácidos



grasos del tejido adiposo y aumentan su utilización como fuente de energía. Los niveles de proteínas celulares disminuyen en todas las células, excepto en el hígado, debido al catabolismo proteico y disminución de la síntesis proteica. Una exposición a largo plazo de GC podría suprimir el crecimiento y acelerar el proceso de envejecimiento, aumentando el catabolismo proteico y produciendo hiperglucemia. Los GC también tienen efectos inmunosupresores y antiinflamatorios, además de poseer efectos estimulatorios sobre la secreción gástrica (Squires, 2006).

## 2.2. Estructura química de los glucocorticoides

Por ser hormonas esteroideas derivadas del colesterol los GC poseen una estructura básica constituida por cuatro anillos de carbono (Figura 1). El colesterol es el precursor obligado en la síntesis de los corticosteroides. La corteza adrenal puede sintetizar colesterol de novo a partir del acetato, pero el 80% es de procedencia exógena. A partir del colesterol la corteza adrenal sintetiza corticosteroides de 21 átomos de carbono que son el cortisol, hidrocortisona y mineralocorticoides como la aldosterona. El colesterol es captado por las células a partir del colesterol plasmático circulante, que es transportado ligado a lipoproteínas de baja densidad (LDL), captado por la célula y almacenado como ésteres de colesterol. En la síntesis de hormonas esteroideas están involucrados diversos organelos como el retículo endoplásmico liso y las mitocondrias. El colesterol se hace disponible dentro de la célula, liberándose de los depósitos de almacenamiento de ésteres del colesterol acumulados como inclusiones intracitoplasmáticas de lípidos (Miller, 2001). El colesterol libre es transportado a las mitocondrias, donde se metaboliza a pregnenolona, por medio de una enzima localizada en la membrana mitocondrial interna. La transformación del colesterol para la obtención de hormonas esteroideas implica una serie de hidroxilaciones que se dan en varios organelos celulares a nivel de los carbonos 20 y 22. La conversión del colesterol (C27) en pregnenolona (C21) implica la eliminación de los 6 carbonos de la cadena lateral del colesterol, mediante una hidroxilación en el carbono 20 (C20) y carbono 22 (C22), y el corte mediante una desmolasa (citocromo P450<sub>scc</sub>), proceso que se da a nivel mitocondrial (Squires 2006). En el retículo endoplásmico, la pregnenolona se hidroxila en la posición 17 para dar 17  $\alpha$  OH pregnenolona o se convierte por medio de la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) en 17 $\beta$ -progesterona. Esta última se hidroxila a nivel de los carbonos 11 y 21, para dar 11-desoxicortisol, que finalmente en la mitocondria se hidroxila para dar lugar al cortisol, catalizada por la enzima 11 $\beta$ -hidroxilasa mitocondrial. Se han desarrollado diferentes GC sintéticos, basados en la estructura del cortisol o hidrocortisona; uno de ellos es la betametasona. Su estructura química es 9-fluoro-11 $\beta$ , 17,21-trihidroxi-16 $\beta$ -metilpregna-1,4-diene-3,20-dione, su estructura es C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>FO<sub>5</sub> y su peso molecular es 392,47 (Gill, 1986).

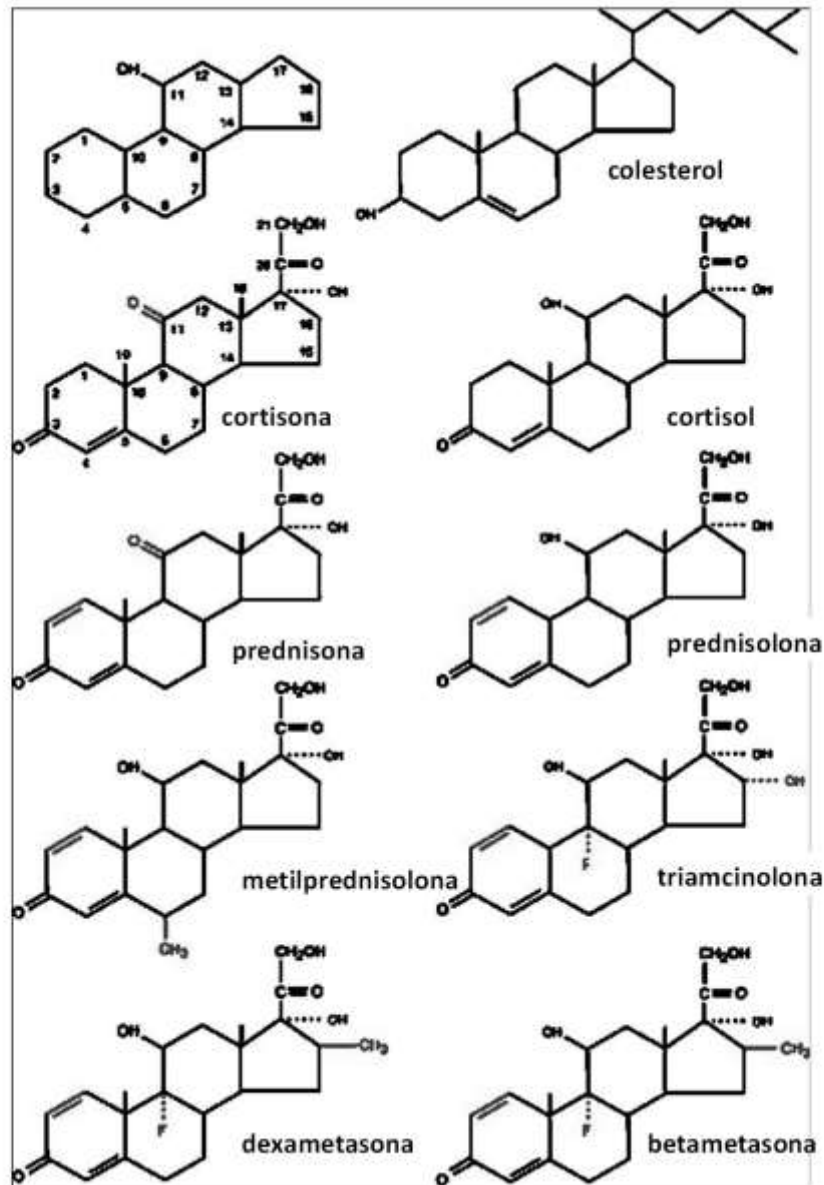


Figura 1. Estructura de los glucocorticoides. Principal estructura del colesterol, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, dexametasona, betametasona.

### 2.3. Mecanismos moleculares de acción de los glucocorticoides

Las hormonas esteroideas modulan muchos procesos fisiológicos, a través de la regulación de la expresión génica y mediante vías no genómicas. Los efectos de los esteroides que están mediados por la modulación génica (vía genómica) ocurren en horas o días. Las vías no genómicas son más rápidas y ocurren en segundos o minutos. Los GC interactúan con sus receptores (GR) intracelulares, que se encuentran predominantemente en el citoplasma (Heitzer et al. 2007). Los GR se movilizan entre el núcleo y el citoplasma, y en ausencia de la hormona están unidos a proteínas de shock térmico como la HSP90, HSP70 y HSF<sub>1</sub>, formando un complejo. La unión de la hormona al receptor provoca la liberación del complejo y la translocación del complejo hormona-receptor hacia el núcleo. Un dímero del complejo hormona-receptor interactúa con los elementos de respuesta al GC (GRE) localizados en genes específicos para modular la transcripción del ADN (Moutsatsou & Papavassiliou 2007). La regulación en la expresión de genes inflamatorios parece ser debida a la interacción directa entre los GR activados y los factores de transcripción activados, tales como el factor nuclear kappa B y el factor activador de proteína-1. Asimismo se reconoce actualmente que los GC cambian la estructura de la cromatina interactuando con proteínas de unión denominadas CREB (cAMP unión a elementos de respuesta), que actúan como co-activadores de la transcripción, ligándose a otros factores de transcripción que compiten por sitios de unión en esta molécula. Las CREB son proteínas que actúan como factores de transcripción uniéndose a ciertos sitios específicos del ADN llamados cAMP sitios de respuesta. El aumento de la transcripción está asociado con el desdoblamiento del ADN alrededor de la histona, y esto es secundario a la acetilación de los residuos de histona por la acción enzimática de CREB. Los GC pueden llevar a la desacetilación de la histona, dando como resultado un bucle firme de ADN y esto reduce el acceso a los factores de transcripción hacia sus sitios de unión, suprimiendo por lo tanto la expresión génica (Chrousos & Kino 2005). Los GC pueden aumentar la transcripción de genes que codifican para proteínas anti inflamatorias, incluyendo la lipocortina-1 y numerosas interleukinas (Barnes 2006). Los GC poseen acción inhibitoria en la síntesis de citoquinas, inhibiendo la transcripción entre citoquinas relevantes en enfermedades inflamatorias incluyendo las interleucinas (IL) IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, TNF- $\alpha$ . En la inflamación alérgica la expresión de citoquinas IL-4, determinante de la síntesis de Ig e IL-5, determinante de la inflamación eosinofílica también es inhibida por glucocorticoides, mediado por la inhibición de los GR (Barnes 1998).

### 2.4. Acciones sistémicas de los glucocorticoides en individuos adultos

Los GC tanto endógenos como exógenos tienen acciones sistémicas variadas, y de acuerdo al tejido y número de receptores a GC actúan de manera diferencial. Por lo tanto los GC ejercen múltiples efectos en casi todos los órganos y tejidos e implican la regulación del metabolismo y crecimiento celular, apoptosis, diferenciación, procesos inflamatorios, tono vascular, humor y funciones cognitivas así como acciones inmunosupresivas (Moutsatsou & Papavassiliou 2008). Los GC sintéticos son utilizados ampliamente en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como el asma, la artritis reumatoidea y las enfermedades autoinmunes. A pesar que los GC sintéticos tienen poca o ninguna acción mineralocorticoide comparada con el cortisol, se acompañan por efectos adversos tales como

osteoporosis, hipertensión, resistencia a la insulina y obesidad (Longui 2007). Como mencionamos anteriormente el cortisol tiene acción predominante en el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas, así como una potente actividad antiinflamatoria (Barnes 2006), mientras que la aldosterona (mineralocorticoide) actúa sobre el metabolismo hidroelectrolítico. Los GC son hormonas hiperglucemiantes, aumentan los niveles de glucosa en sangre en animales adultos. Asimismo son inmunosupresores a dosis farmacológicas, e inmunomoduladores en concentraciones fisiológicas. La importancia de los GC puede apreciarse a través de los ejemplos clínicos de su deficiencia o síndrome de Addison, o su exceso o síndrome de Cushing. El término síndrome de Cushing o hiperadrenocorticismismo es usado para describir la condición resultante de la exposición prolongada a niveles excesivos de GC, causado entre otros por la excesiva secreción de hormona adrenocorticotrofina (ACTH), lo que lleva a la elevación de la producción de GC por la corteza adrenal o hipercorticismismo iatrogénico, causado por la administración terapéutica de GC exógenos (Arnaldi et al. 2003). Por otro lado, su uso terapéutico por períodos prolongados puede afectar la mucosa gástrica y aumentar la proliferación celular en las mucosas gástrica y colónica (Findling & Raff 2006).

## 2.5. Glucocorticoides y estrés en animales adultos

Los GC endógenos son sintetizados en el organismo por la glándula adrenal en respuesta a varias señales de estrés (Squires 2006). El estrés es uno de los factores que afectan sensiblemente la reproducción animal (Alvarez 2008). Se ha postulado que los GC median la respuesta al estrés agudo con acciones supresivas sobre la reproducción. La administración aguda o crónica de GC disminuye la concentración de testosterona plasmática, sin elevación compensatoria de la secreción de la hormona luteinizante (LH) (Sapolsky et al. 2000). El incremento de las concentraciones de GC respecto de sus concentraciones basales puede indicar la severidad del factor estresante (Sapolsky et al. 2000). Una vez que el factor de peligro ha desaparecido, las concentraciones de GC regresan de manera gradual (minutos a horas) a su concentración basal. La respuesta fisiológica al estrés momentáneo (estrés agudo) es considerada adaptativa porque dirige la energía del organismo a las funciones que maximizan su sobrevivencia y pospone las que no son necesarias en el momento (Sapolsky et al. 2000).

## 2.6. Efectos positivos de los glucocorticoides prenatales

Los glucocorticoides cuando son administrados terapéuticamente antes del parto preparan al nuevo ser para el nacimiento, estimulando la maduración pulmonar a través de la secreción de surfactante pulmonar evitando el síndrome de estrés respiratorio en bebés recién nacidos (Liggins & Howie 1972), así como también liberando factores de maduración del tracto gastrointestinal (Squires 2006). Uno de los glucocorticoides ampliamente utilizado en la terapia de en mujeres gestantes con riesgo de parto prematuro es la betametasona (Jobe et al. 2007). La terapia prenatal con corticoides consiste en la administración desde la semana 24 a la 34 de gestación, de 2 a 3 dosis de 12 mg de betametasona administrados por vía intramuscular con 24 horas de diferencia, o 4 dosis de 6 mg de dexametasona por vía intramuscular, con 12 horas de diferencia (Gilstrap et al. 1994, NIH 1995, Anyaegbunam & Adetona 1997). Es indudable que la terapéutica utilizada en

mujeres con riesgo de parto prematuro cualquiera sea la causa (ruptura de membranas extraembrionarias, diabetes gestacional, colestasis gestacional) resulta beneficiosa para el bebé promoviendo su sobrevivencia y disminuyendo los índices de morbilidad y mortalidad neonatal (NIH 1995). Asimismo en estudios en ovinos demostraron que la exposición prenatal de betametasona mejoró la función pulmonar de corderos post-natales (Ikegami et al. 1997).

## 2.7. Efectos negativos de los corticoides prenatales

Como hemos mencionado, se ha descrito que la exposición durante la gestación (*in utero*) de niveles excesivos de glucocorticoides sintéticos disminuye el peso al nacer en ovinos y predispone a enfermedades cardiovasculares y metabólicas en adultos en ratas y humanos (O'Regan & Kenyon 2004). Además altera la maduración de algunos órganos predisponiendo a enfermedades metabólicas (Drake et al. 2007).

Entre los efectos negativos a largo plazo encontramos depresión del sistema inmune, incremento en la susceptibilidad a enfermedades e inhibición de la reproducción (Sapolsky et al. 2000). La inhibición de la reproducción por estrés agudo es resultado de la interferencia entre los dos ejes: eje HHA y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (Hardy et al. 2005). Por otra parte los glucocorticoides interactúan con hormonas reproductivas al inicio del desarrollo del sistema neuroendócrino, con efectos adversos sobre el peso al nacimiento (Sloboda et al. 2002).

## 2.8. Glucocorticoides a nivel testicular

En el testículo en desarrollo se ha determinado la presencia de receptores a glucocorticoides (GR) en roedores en las células de Leydig fetales y adultas productoras de testosterona (Schultz et al. 1993, Biagini et al. 1995) y en fetos ovinos (Pedrana et al. 2008). Por lo tanto, las células de Leydig son uno de los sitios de la acción de los GC. Experimentos *in vitro* sugieren que el estrés con elevación de glucocorticoides sistémicos disminuyen la sensibilidad de las células de Leydig a las gonadotropinas, ya sea por disminución de sus receptores o por inhibición de la actividad enzimática esteroidogénica (Schultz et al. 1993, Sapolsky et al. 2000). Además, se ha observado en ratas adultas cuyas madres han sido sometidas a estrés durante el parto inhibición de la actividad de esteroidogénesis, observándose la disminución de las enzimas 17 $\alpha$ -hidroxilasa, 17,20-liasa y 3 $\beta$ -HSD sin afectar los receptores de LH en las células de Leydig (Orr & Mann 1992). También ha sido demostrado que la exposición en adultos a la corticosterona aumenta la apoptosis en células de Leydig en ratas adultas (Gao et al. 2003). Asimismo en condiciones de estrés con niveles elevados de glucocorticoides disminuye la concentración de testosterona circulante (Hardy et al. 2002). La disminución de testosterona circulante en adultos se acompaña de aumento de apoptosis en células germinales con aumento de la expresión de la caspasa-3 (Kim et al. 2001). Por otra parte, estudios previos han determinado efectos a corto plazo de los glucocorticoides *in utero* sobre la histología testicular en fetos de ovinos de 109 y 116 días de gestación aumentando la expresión del GR en células de Leydig (Pedrana et al. 2008).

### **3. Ontogenia testicular pre y postnatal en ovinos**

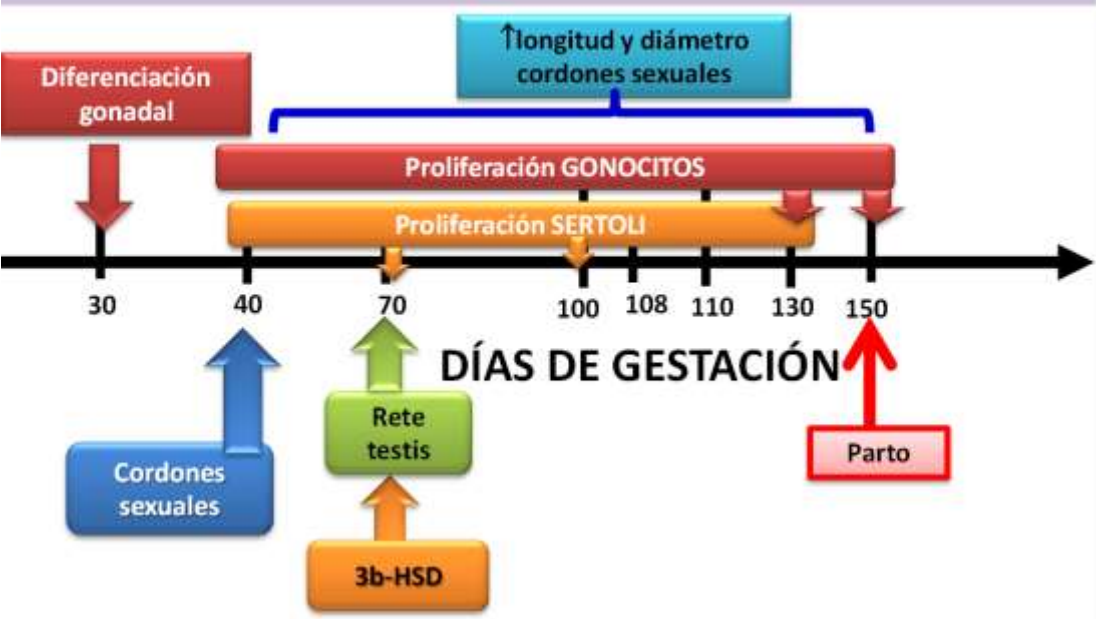
El testículo es un órgano complejo, donde se lleva a cabo procesos esenciales para la reproducción como es la espermatogénesis. Los eventos que se suceden durante su desarrollo pre y postnatal configuran etapas claves para alcanzar un adecuado funcionamiento de este órgano, que en el adulto estará constituido por una cápsula o túnica albugínea, compuesta por tejido conjuntivo denso irregular, en contacto con el peritoneo visceral, células mesoteliales, fibroblastos, fibras colágenas y fibras musculares lisas; un estrato vascular o túnica vascular. En algunas especies (no es el caso de los ovinos) presenta tabiques o septos de tejido conjuntivo que dividen al órgano en lobulillos. El parénquima testicular de un animal adulto está constituido por túbulos seminíferos y tejido intersticial, así como una serie de túbulos rectos que forman parte de las vías genitales intratesticulares, continuando con la rete testis y luego con los conductillos eferentes que van hacia el epidídimo.

Si analizamos la histología testicular veremos que los túbulos seminíferos tortuosos, se observan generalmente en corte transversal debido a su morfología tortuosa. Los túbulos seminíferos presentan un epitelio que forma en espesor del túbulo y una luz central. Los túbulos están delimitados por una lámina basal, con una capa limitante de células peritubulares, células mioides y células similares a fibroblastos.

El epitelio seminífero está formado por células somáticas diploides sustentaculares o de Sertoli y células germinales. Células de Sertoli somáticas o sustentaculares cambian a la forma adulta, lo que involucra maduración y diferenciación terminal, con pérdida de actividad proliferativa y cambio a varias funciones necesarias para mantener la espermatogénesis (Hutchison et al. 2008).

El desarrollo testicular atraviesa períodos de profundos cambios morfológicos y funcionales desde la vida fetal hasta la pubertad. Durante su ontogenia, los testículos se desarrollan pasando a través diversas fases de maduración con características morfológicas y funcionales específicas en los diferentes compartimentos testiculares (Figura 2).

## DESARROLLO TESTICULAR EMBRIONARIO Y FETAL



## DESARROLLO TESTICULAR POSNATAL

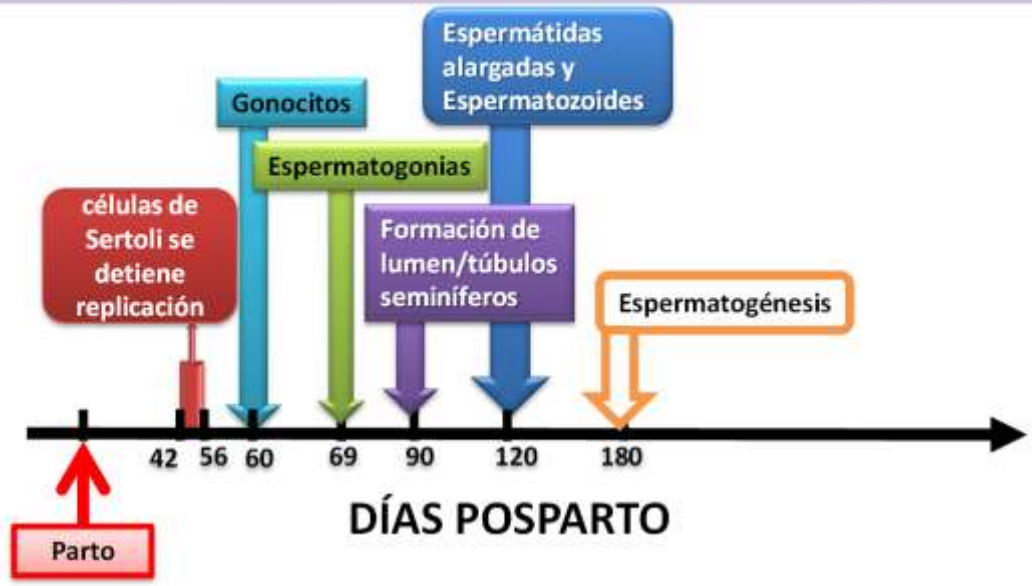


Figura 2. Esquema de desarrollo del testículo en ovinos, etapas claves en el desarrollo de estructuras, compartimentos y células testiculares.

### **3.1. Diferenciación gonadal**

El primer evento morfológicamente visible en el momento de la diferenciación gonadal lo constituye el encierro de células germinales por las células de Sertoli formando estructuras de forma de cordón (Jost et al. 1973). Aunque los cordones sexuales no están totalmente formados hacia el día 30 de gestación en ovinos, ya es visible una organización celular distinguible del resto del tejido que lo rodea (tejido intersticial) y por la presencia de células que expresan la hormona anti-Mulleriana (AMH) y la enzima esteroidogénica 3 beta-hidroxiesteroideshidrogenasa (3b-HSD) a nivel del intersticio testicular (Sweeney et al 1997). Alrededor del día 30 de vida fetal se produce entonces la diferenciación sexual en el ovino (McNatty et al 2001), con evidencia de producción gonadal de hormonas esteroideas (Quirke et al. 2001). Los cordones sexuales se establecen hacia el día 40 de gestación, son macizos, por lo que no presentan luz central, y son los precursores de los túbulos seminíferos, en tanto que la rete testis se organiza hacia el día 70 de gestación (Sweeney et al 1997). Cuando el testículo fetal se diferencia hacia el día 40 se pueden distinguir dos compartimentos típicos, los cordones sexuales, que contienen células de Sertoli periféricas y las células germinales, en posición central, llamadas en este período gonocitos, rodeadas por las células peritubulares, y el tejido intersticial, que contiene las células de Leydig y el tejido conectivo. Las células germinales mantienen dicha posición central por largo tiempo, hasta el comienzo de la espermatogénesis, cuando los gonocitos toman contacto con la lámina basal del cordón sexual y se diferencian en espermatogonias comenzando el ciclo espermatogénico (Courot et al. 1970).

### **3.2. Desarrollo testicular fetal**

Si analizamos los eventos que ocurren durante de la vida embrionaria y fetal, vemos que la gónada se desarrolla a partir de la cresta gonadal, a partir de la cara medial del mesonefros, o pliegue del mesonefros. La migración de células germinales primordiales hacia la cresta gonadal constituye un momento clave para la formación de la gónada,

#### **3.2.1 Proliferación fetal de células germinales**

Las células de la línea germinal (gonocitos) proliferan por mitosis y luego del nacimiento darán origen a las pre-espermatogonias (Rey et al. 2009). Las células germinales una vez que alcanzan la lámina basal del cordón sexual son llamadas pre-espermatogonias y se multiplican por mitosis dando origen a las células diploides espermatogonias. El desarrollo de las células germinales y su división mitótica perpetúa la línea germinal en el macho, permitiendo que luego del nacimiento se multipliquen a diferencia de la hembra que nace con un número determinado de ovogonias.

#### **3.2.2. Proliferación fetal de células de Sertoli**

El desarrollo testicular en ovinos, se caracteriza por dos períodos de actividad mitótica de las células de Sertoli. El primer período de mitosis de las células de Sertoli se produce después de la diferenciación sexual (después del día 30 de vida fetal y hasta el día 110 de gestación) registrándose 6 de 8 divisiones mitóticas antes del día 110 de gestación. Por otra parte las células de Sertoli y de Leydig tienen



funciones endócrinas, que son esenciales para la diferenciación celular testicular. Células de Sertoli secretan la hormona anti-Mulleriana (AMH) capaz de inhibir la formación del conducto para-mesonéfrico (conducto que origina las vías genitales femeninas), y factores de transcripción necesarios para el desarrollo testicular, mientras que las células de Leydig secretan andrógenos y factores de transcripción.

### 3.2.3. Proliferación fetal de células de Leydig

El intersticio testicular está compuesto por células intersticiales también llamadas células de Leydig, además de encontrarse en el intersticio macrófagos, fibroblastos, capilares sanguíneos y linfáticos, células mioides, células similares a fibroblastos en contacto con la lámina basal de los cordones sexuales. Entre otros acontecimientos podemos destacar que las células intersticiales de Leydig comienzan la síntesis de esteroides durante su vida fetal, detectándose la presencia de la enzima esteroidogénica 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa (3B-HSD) durante los primeros 40 días de vida fetal en ovinos.

## 3.3. Desarrollo testicular durante la etapa postnatal

En ovinos, la diferenciación sexual y el crecimiento testicular postnatal hasta la pubertad están separados por un período de al menos cinco meses (Hochereau-de Reviers et al., 1995).

### 3.3.1. Proliferación postnatal de células de Sertoli

El primer período de mitosis de las células de Sertoli se produce después de la diferenciación sexual (después del día 30 de vida fetal y hasta el día 110 de gestación) registrándose 6 de 8 divisiones mitóticas antes del día 110 de gestación. El segundo período de multiplicación celular se produce después del nacimiento, culminando las divisiones de las células de Sertoli en corderos hacia los 42 a 56 días postparto (Hochereau-de Reviers & Courot 1971, Monet-Kuntz et al. 1984).

### 3.3.2. Proliferación postnatal de células germinales

En ovinos los testículos posnatales presentan cordones sexuales con gonocitos y células sustentaculares de Sertoli hasta el día 60 de nacidos. Las espermatogonias se diferencian a partir de los gonocitos poco tiempo después entre el día 60 y el día 69.

Los espermatoцитos primarios (pre-leptoténicos, previo a ingresar a la meiosis) son más evidentes en los testículos de corderos hacia el día 69 de edad. En algunos corderos a los 70 días de edad, ya se observan escasos espermatoцитos primarios en leptoteno (dentro de la profase I, de la meiosis I). A los 85 días de edad, los espermatoцитos primarios en leptoteno están presentes en la mayoría de los corderos (Monet-Kuntz et al. 1984).

Luego del día 90 de nacidos, comienza la formación del lumen en la región central de los cordones sexuales, la actividad mitótica aumenta y los diámetros de los túbulos seminíferos aumentan considerablemente (Schanbacher 1974). Hacia el día 100 postparto se observa la presencia de algunas espermátidas redondas (Monet-Kuntz et al. 1984). Se observan espermátidas elongadas y ocasionalmente

espermatozoides en los túbulos de carneros a los 120 días de edad. El proceso de espermatogénesis se completa en carneros a partir de los 180 días de edad observándose espermatozoides en la luz de los túbulos seminíferos (Schenbacher et al. 1974). El diámetro de los túbulos seminíferos se correlaciona con el tamaño testicular y con una espermatogénesis activa (Hochereau de Reviers et al. 1995). Por lo tanto, el medir los diámetros de los túbulos seminíferos, es una medida efectiva de las células germinales y por lo tanto de una espermatogénesis activa (Oatley et al. 2004).

En fetos se produce normalmente un aumento en longitud y no en diámetro de los cordones (Hochereau-de Reviers et al. 1995) y en animales postnatales los incrementos en el peso testicular están dados por aumento en el diámetro de los cordones sexuales/túbulos seminíferos que implican la proliferación de células germinales en el proceso de espermatogénesis (Clermont & Huckins 1961). Asimismo el número de células de Sertoli está altamente correlacionado con el número de células germinales por túbulo, dado que cada célula de Sertoli tiene una capacidad fija para un número de células germinales a las que puede dar apoyo (Orth et al. 1988).

### **3.4. Histología testicular**

La secuencia de eventos citológicos que resultan en la formación de un espermatozoide maduro a partir de precursores es conocido como espermatogénesis. Este proceso en mamíferos se lleva a cabo en el testículo adulto dentro de los túbulos seminíferos. El desarrollo del testículo está asociado a la formación de los cordones sexuales compuestos por dos tipos celulares, las células de sustentaculares o también llamadas de Sertoli y las células primordiales germinales (Kerr et al. 2006)

El parénquima del testículo fetal y prepuberal en mamíferos se organiza como mencionáramos anteriormente en cordones sexuales e intersticio testicular. Los cordones sexuales macizos consisten en células germinales en posición central, rodeadas por una capa de células pre-Sertoli en posición periférica y una hoja externa de células peritubulares mioides (Mackay, 2000). En la pubertad el parénquima testicular ya no presenta cordones sexuales macizos sino túbulos seminíferos con luz central con células de Sertoli en posición periférica y las células de la línea germinal, las espermatogonias que se relocalizan contra la lámina basal (Hochereau-de Reviers et al. 1987).

Entre los cordones sexuales en el tejido intersticial están presentes las células intersticiales de Leydig. Esta composición del parénquima testicular permanece sin cambios hasta el período postnatal donde las células germinales denominadas gonocitos se acercan a la región basal de los cordones sexuales. El intersticio presenta tejido conjuntivo laxo, capilares sanguíneos y linfáticos, células perivasculares, mesenquimatosas, fibroblastos, macrófagos y leucocitos, células intersticiales de Leydig (Kerr et al. 2006).

#### **3.4.1. Células germinales**

El establecimiento de la línea germinal en el embrión involucra la segregación de células primordiales germinales (PGC), la migración hacia las crestas gonadales,

proliferación y diferenciación en las gónadas durante los periodos fetal y neonatal (Mackay, 2000). Una vez que las células germinales quedan encerradas en los cordones formados por células precursoras de Sertoli rodeadas de células peritubulares son denominadas gonocitos. En ovinos el número de gonocitos aumenta progresivamente desde la diferenciación sexual en la etapa fetal hasta el nacimiento (Hochereau-de Reviers et al. 1995). La diferenciación de gonocitos a espermatogonias marca el comienzo de la primera espermatogénesis (de Rooij & Russell 2000). Las espermatogonias darán entonces origen a los espermatozoides que comienzan la meiosis I y II generando las espermatidas, y luego los espermatozoides.

### 3.4.2. Célula de Sertoli

Las células de Sertoli o células sustentaculares del epitelio seminífero son esenciales en el desarrollo y diferenciación de las células germinales. Las células de Sertoli adultas presentan prominentes prolongaciones citoplasmáticas con un núcleo irregular, un nucléolo tripartito, abundante retículo endoplasmático liso y complejos de unión con células de Sertoli adyacentes que excluyen macromoléculas y nutrientes. Expresan receptores para hormona folículo estimulante (FSH) que induce a la producción de la proteína de unión a andrógenos (Androgen binding protein o ABP) uniéndose a la testosterona, que es luego ingresada dentro de los túbulos seminíferos (Sofikitis & Pappas 2005). También producen inhibina, que inhibe la secreción de FSH, y además es productora de estrógenos a partir de la aromatización de los andrógenos mediada por la enzima P450 aromatasa localizada en el retículo endoplásmico (Haider 2007). La proliferación de las células de Sertoli ocurre durante un período entre la diferenciación sexual en la etapa embrionaria-fetal y en la pubertad diferenciándose en células adultas funcionales que pierden la capacidad de proliferación alcanzando permanentemente la fase G0 del ciclo celular (Herrera-Alarcón et al. 2007). En testículos fetales de ovinos, las células de Sertoli pasan por al menos 8 divisiones mitóticas, 6 de las cuales se registran antes del día 110 de gestación, disminuyendo luego hasta el nacimiento y aumentando posteriormente al nacimiento hasta las 6-8 semanas de la vida postnatal en ovinos (Hochereau-de Reviers et al. 1995). La acción de determinados factores sobre las células de Sertoli en un período determinado de la vida podría dar como resultado una reducción en la producción de espermatozoides en la vida adulta (Paul et al. 2005).

### 3.4.3. Células de Leydig

Las células de Leydig en mamíferos adultos son células poligonales ricas en grasas, proteínas, que poseen citoplasma eosinófilo. Presentan núcleo redondeado ubicado excéntricamente con nucléolo evidente y heterocromatina rodeando la envoltura nuclear. El número de inclusiones lipídicas presentes en las células de Leydig varía con las especies sugiriendo grados variables de actividad funcional, siendo activas desde la vida fetal con características distintivas de células de Leydig fetales (O'Shaughnessy & Fowler 2011). Su principal función es la producción de testosterona, controlada por la hormona luteinizante (LH) en la vida adulta y no en la vida fetal temprana, siendo esta una gonadotropina que se une a sus receptores de membrana (Tran et al. 2006). Esto inicia la activación de protein-quinasas que catalizan la fosforilación de proteínas intracelulares y la metabolización de

precursores de esteroides, por medio de la conversión de colesterol a pregnenolona (Haider, 2007). La biosíntesis de testosterona por parte de las células de Leydig se realiza a partir del colesterol e involucra una serie de organelos como ser el retículo endoplásmico liso y las mitocondrias. Los puntos primarios de control de la esteroidogénesis son el transporte del colesterol desde los lugares de almacenamiento intracelulares hacia la membrana mitocondrial interna y la subsiguiente conversión del colesterol en pregnenolona por la P450 scc, cholesterol side-chain cleavage enzyme (Haider, 2004). Existen proteínas reguladoras de la actividad esteroidogénica, como la proteína esteroidogénica aguda (StAR) que propicia la conversión del colesterol en pregnenolona, mediando en el transporte de colesterol desde la membrana mitocondrial externa hacia la membrana mitocondrial interna, donde sus enzimas lo transforman en pregnenolona. Fuera de la mitocondria puede tomar dos caminos pasando a  $17\alpha$ -hidroxipregnelonona o a pregnelona. Los esteroides se excretan de las células de Leydig y son transportados por la linfa y el líquido dentro de los túbulos seminíferos y en sangre donde son transportados por proteínas como la albúmina sérica. La actividad de síntesis de las células de Leydig involucra además a enzimas como la 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) considerada una enzima bifuncional que cataliza la conversión oxidativa del delta (5)-ene-3- $\alpha$ -hidroxiesteroide y la conversión oxidativa de ketoesteroides, convirtiendo la pregnenolona y la dehidroepiandrostenediona (DHEA) a progesterona y androstenediona, respectivamente (Haider, 2007).

### **3.5. Espermatogénesis**

La espermatogénesis es el proceso por el cual se producen espermatozoides y comprende una serie de fenómenos complejos. Comienza previamente a la pubertad y se continúa por toda la vida del individuo. Durante el proceso de espermatogénesis se desarrollan una serie de procesos, que incluyen la apoptosis y la proliferación celular, así como la diferenciación celular. En este sentido es importante resaltar que del adecuado balance entre las células germinales y las de Sertoli así como del balance entre los procesos de apoptosis y proliferación celular dependerá la fertilidad potencial del adulto.

De acuerdo al número de células de Sertoli, se establece un techo máximo para la producción de espermatozoides, dado que las células de Sertoli tienen una capacidad de sustentar un número limitado de células germinales (Orth 1988). Solo las células de Sertoli inmaduras pueden proliferar, por lo que el número final de células de Sertoli está determinado antes de la adultez, durante los períodos fetal, neonatal y peripuberal (Sharpe et al. 2008).

#### 4.1. Fases de la espermatogénesis

La espermatogénesis la podemos dividir en 3 fases. Una primera fase espermatogónica, durante la cual las células germinales proliferan por divisiones mitóticas, estableciéndose una población de células madre espermatogónicas. Las células germinales espermatogonias, sufren divisiones mitóticas sucesivas y generan una progenie, se multiplican en número por mitosis y proveen una población estable de células espermatogonias que finalmente se diferenciarán en espermátocitos primarios para ingresar a la fase siguiente de la espermatogénesis. Una característica de las divisiones de espermatogonias es el mantenimiento de puentes citoplasmáticos o conexiones citoplasmáticas que permanecen intactas formando las células una clona, o camada de células espermatogonias. Durante esta fase existen importantes mecanismos que aseguran una producción adecuada de células espermatogonias. En primer lugar debe existir un balance entre las células que se diferencian para ingresar a la meiosis, y el mantenimiento de una población de células madre, sin provocar pérdida del pool de células madre espermatogonias (Ross & Pawlina, 2007). Previamente a la formación del lumen, los gonocitos y sus descendientes se localizan hacia la lámina basal de los cordones sexuales y aumentando su número (Sapsford, 1961).

En segunda instancia tiene lugar la fase espermatocítica de meiosis, en la cual los espermátocitos, células diploides, ingresan al proceso de meiosis, sufren divisiones meióticas I y II para transformarse luego en células haploides denominadas espermátidas.

La tercera fase de la espermatogénesis es la espermiogénesis, donde ocurren una serie de cambios morfológicos y funcionales que llevan a las espermátidas a diferenciarse en espermatozoides. En esta la fase final de la espermiogénesis las espermátidas se diferencian hasta espermatozoides. Un mecanismo distintivo de la espermatogénesis es el requerimiento de una onda apoptótica de células germinales que mantiene un equilibrio entre las poblaciones de células sustentaculares y las germinales (Wright et al. 2007). Por lo tanto, resulta indudable que el desarrollo del proceso de espermatogénesis involucra varios procesos entre los que se encuentran: la ***proliferación celular***, la ***diferenciación celular*** y ***apoptosis***.

A continuación describiremos algunos de los procesos que ocurren en el testículo en desarrollo como ser los procesos de ***apoptosis*** y ***proliferación celular***, requeridos para mantener el balance entre las poblaciones de células germinales y las células sustentaculares de Sertoli.

## 4. Proceso de apoptosis

### 4.1. Definición de apoptosis

La apoptosis o muerte celular es un proceso coordinado y activo que involucra la expresión de genes específicos. La muerte celular ocurre regularmente durante el desarrollo normal y se conoce como muerte celular programada y se da a través de mecanismos de apoptosis. Es por esto que la muerte celular programada es una forma de apoptosis aunque es aceptado ampliamente que estos términos sean utilizados como sinónimos. La capacidad de entrar en apoptosis está presente en la mayoría de los tejidos, de modo de poder mantener un estado de homeostasis del individuo (Wang et al. 1998). La proliferación celular y la muerte celular deben estar reguladas para mantener la homeostasis de los tejidos. Por ende, una regulación inapropiada de la apoptosis contribuye a desórdenes como cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas, etc. (Pucci et al. 2000). A través de este proceso de apoptosis se realiza normalmente la remoción de células en la etapa embrionaria, fetal y vida postnatal. La apoptosis es entonces un proceso común, que ocurre en células en tejidos sanos en células aisladas o más extensamente durante la ontogenia, sin gatillar respuestas inflamatorias, y es responsable del modelado de tejidos durante el desarrollo. Por otra parte un aumento excesivo de la apoptosis está asociado con enfermedades neurodegenerativas, infarto del miocardio y enfermedades autoinmunes (Medh & Thompson 2000). El conocer la regulación de los procesos de apoptosis puede potencialmente llevar a conocer nuevos caminos para el diagnóstico y tratamiento de una variedad de enfermedades.

### 4.2. Características de la apoptosis

Morfológicamente la apoptosis se caracteriza por cambios celulares como ser la compactación y fragmentación nuclear de la cromatina y a nivel del citoplasma modificaciones del citoesqueleto, condensación de organelos como mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso (Said et al. 2004). El proceso de apoptosis es gatillado por una variedad de estímulos, incluyendo, citoquinas, hormonas, virus y tóxicos. En las células apoptóticas se activa una cascada de reacciones enzimáticas determinadas por la expresión de genes que codifican para la síntesis de moléculas letales para las propias. Estas enzimas son capaces de activar proteínas del citoesqueleto y lamininas nucleares acompañando los cambios morfológicos que se suceden en la apoptosis. Estas reacciones involucran al núcleo y el citoplasma y depende de factores externos e internos (Medh & Thompson 2000).

### 4.3. Mecanismos moleculares de activación de la apoptosis

Las vías de apoptosis involucran diversas vías entre las que se encuentran la vía extrínseca y otra vía intrínseca o mitocondrial. La vía extrínseca de la apoptosis involucra la unión a "receptores de muerte" como Fas y TNF (factor de necrosis tumoral) a su ligando (FasL), recibiendo señales pro-apoptóticas desde el exterior y de las células vecinas (Figura 3). Estos receptores se localizan en la superficie externa de la membrana celular y al ser estimulados unidos al ligando producen la formación de un complejo que involucra la enzima caspasa 8 iniciadora (Hikim et al. 2003). La caspasa 8 activa caspasas 3 y 7 ejecutoras o efectoras, inician la activación de una cascada enzimática (Herr et al. 2007), que involucra la activación de un grupo de otras caspasas (Figura 3).

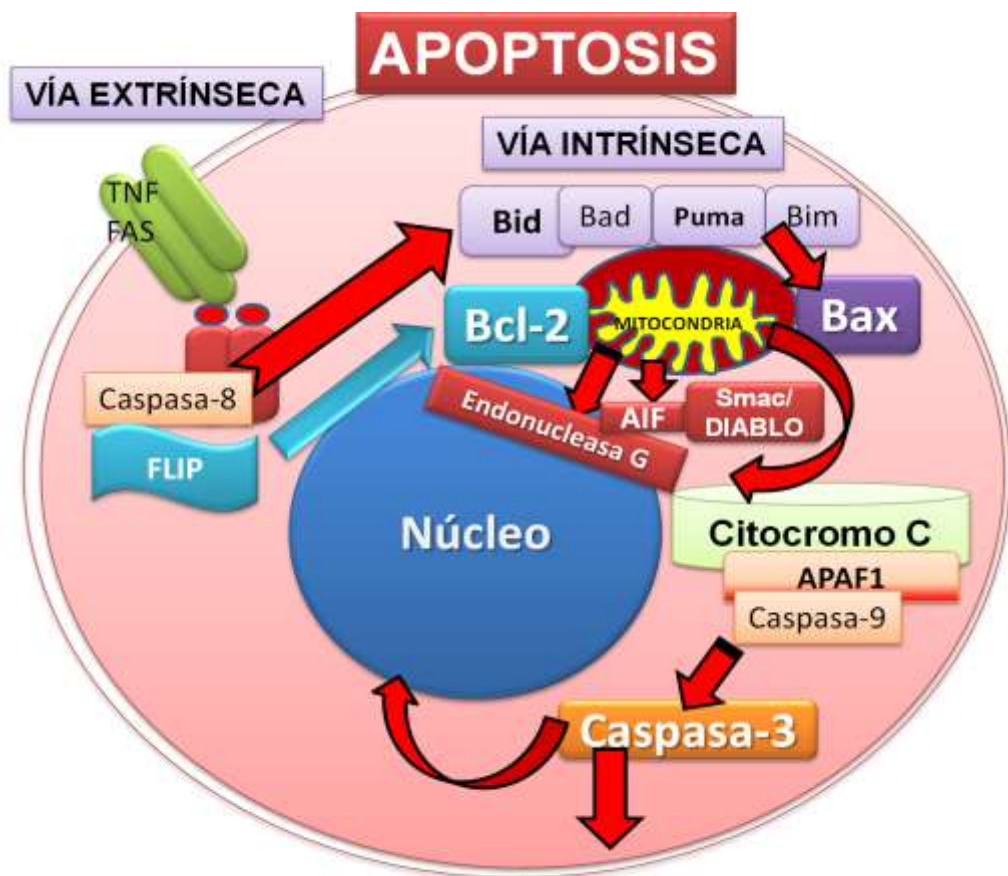


Figura 3. Representación del proceso de apoptosis y vías apoptóticas. La apoptosis es iniciada por diferentes vías. La vía extrínseca a través de receptores a nivel de membrana, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y FAS que resulta en el reclutamiento de la caspasa-8 iniciadora, que se activa e inicia la apoptosis por el clivaje de las caspasas efectoras. La vía intrínseca o mitocondrial es activada liberando factores apoptogénicos como citocromo C, factor inductor de apoptosis (AIF) y endonucleasa G o Smac/DIABLO desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol. La liberación de citocromo C al citosol gatilla la activación de la caspasa-3, a través de la formación del complejo apoptosoma. AIF causa condensación de ADN y la endonucleasa G causa fragmentación del ADN. La vía intrínseca involucra la activación de dominios BH-3 only conteniendo moléculas como Bad, Bim y Puma, que activan las proteínas Bax y Bak que gatillan la liberación de citocromo C y contribuyen a la apoptosis mitocondrial. La activación de las caspasas está regulada negativamente por FLIP que bloquea la activación de la caspasa-8, en la mitocondria por acción de Bcl-2 y Bcl-xL por proteínas inhibitoras (IAPs). Modificado a partir de Herr et al, 2007.

## 4.4. Proteínas reguladoras de la apoptosis

### 4.4.1. Cisteinil aspartato proteasas: caspasas

Las enzimas cisteinil aspartato proteasas llamadas caspasas, pueden clasificarse en caspasas iniciadoras 2, 8, 9 y 10 (Sakamaki & Satou 2009) que responden con signos de muerte y que activan caspasas ejecutoras 3, 6 y 7 realizando cortes específicos en proteínas claves que las células requieren para sobrevivir (Said et al. 2004). La activación del grupo de las caspasas juega un papel central en la regulación de la apoptosis (Shaha et al. 2010). Como mencionamos anteriormente las caspasas iniciadoras en respuesta a señales de muerte celular activan caspasas efectoras que escinden proteínas claves del citoesqueleto y las laminas nucleares que son la causa de los cambios morfológicos nucleares evidenciados durante el proceso de apoptosis (Said et al. 2004).

La vía intrínseca o mitocondrial implica la activación de enzimas mitocondriales. Asimismo el retículo endoplasmático, también ha demostrado estar involucrado en la ejecución de la apoptosis de las células epiteliales tubulares renales y las neuronas corticales. Ambas vías extrínseca e intrínseca convergen en la caspasa-3 y otras caspasas ejecutoras y endonucleasas que impulsan los eventos terminales de la muerte celular programada (Hikim et al. 2003).

La caspasa-3 es considerada una proteasa determinante de la apoptosis y su activación conduce a cambios morfológicos característicos de la célula, como la contracción y condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, y la formación de ampollas en la membrana plasmática (Grunewald & Sharma 2009). La activación de la caspasa-3 y la liberación de citocromo-C por la mitocondria es considerado el evento bioquímico que define un punto de no retorno de las células destinadas a morir (Earnshaw et al. 1999).

### 4.4.2. Familia de proteínas Bcl-2 (B-cell lymphoma): Bax y Bcl-2

Las proteínas de la familia de Bcl-2 (linfoma de células o B-cell lymphoma) se agrupan en tres familias: la familia de las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 y otras); la familia de proteínas pro-apoptóticas de tipo "multidominio" (Bax y Bak) y las proteínas pro-apoptóticas de tipo "BH3-only" (Herr *et al.* 2007). Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación citocromo-c. La liberación de citocromo-c, una vez en el citosol, activa la formación de un complejo proteico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa-9. Una vez que la caspasa-9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3, produciéndose la activación de endonucleasas y fragmentación del ADN y degradación del citoesqueleto (Herr *et al.* 2007). El balance entre los factores pro y anti-apoptóticos determina si la célula está destinada a morir o no.

Por lo tanto, los miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2, como Bax, induce la apoptosis aumentando la permeabilidad de la membrana mitocondrial al citocromo-c. En cambio los miembros anti-apoptóticos como Bcl-2 impide la



activación de las caspasas por unión con el citocromo-c reduciendo la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Yazawa *et al.* 2000). El proceso de apoptosis depende del balance entre las proteínas Bcl-2 y Bax, siendo la relación de estas moléculas un factor determinante crítico del destino de la célula. Un nivel elevado de Bcl-2 favorece la supervivencia prolongada de las células y un nivel mayor de la expresión de Bax acelera la muerte celular (Damavandi *et al.* 2002). Dichas proteínas están codificadas por el gen Bax y por el gen Bcl-2 llamado represor de muerte celular. El gen Bax y el gen relacionado Bak codifican proteínas que inducen muerte celular programada.

Como mencionamos anteriormente la vía intrínseca o mitocondrial es activada liberando factores apoptogénicos como citocromo-c, factor inductor de apoptosis (AIF) y endonucleasa G o Smac/DIABLO desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol. La liberación de citocromo-c al citosol gatilla la activación de la caspasa-3, a través de la formación del complejo apoptosoma. AIF causa condensación de ADN y endonucleasa G causa fragmentación del ADN. La vía intrínseca involucra la activación de dominios BH3-only conteniendo moléculas como Bad, Bim y Puma, que activan las proteínas Bax y Bak que gatillan la liberación de citocromo y apoptosis mitocondrial. La activación de las caspasas está regulada negativamente por FLIP que bloquea la activación de caspasa-8, en la mitocondria por acción de Bcl-2 y Bcl-xL por proteínas inhibidoras (IAPs) (Herr *et al.* 2009)

#### **4.5. Rol de la caspasa-3, Bax y Bcl-2 en la apoptosis de células testiculares**

La apoptosis en el testículo de mamíferos es un factor regulador esencial para la eliminación de células innecesarias producidas durante la espermatogénesis en condiciones normales (Furuchi *et al.* 1996, Damavandi *et al.* 2002). El proceso de apoptosis testicular es necesario para detener la expansión clonal de las células germinales durante momentos claves. La apoptosis mantiene un balance entre poblaciones de células de Sertoli y las células germinales. Durante el desarrollo gonadal pre y postnatal las células germinales están sometidas a procesos de proliferación y apoptosis (Figura 4). Existe un mecanismo que registra el aumento de espermatogonias, lo que desencadena el mecanismo apoptótico (De Rooij & Russell, 2000). Previo a la primera espermatogénesis existe una onda masiva de apoptosis normal que resulta en el ajuste del número de células germinales que pueden ser adecuadamente mantenidas por las células de Sertoli (Rodriguez *et al.* 1997). Se ha determinado además que las caspasas juegan un rol central en la apoptosis de las células de Sertoli afectando por ende el proceso de espermatogénesis (Tesarik *et al.* 2004).

Dentro de las proteínas reguladoras del proceso de apoptosis se encuentra las proteínas de la familia de Bcl-2, que involucra las proteínas Bax, Bak y Bim (Print & Loveland 2000), que actúan promoviendo la apoptosis y Bcl-2 que actúan estimulando la supervivencia celular (Yamamoto *et al.* 2001). La proporción existente entre las proteínas Bcl-2 y Bax es crítico determinante del destino celular, por lo cual niveles aumentados de Bcl-2 favorecen la sobrevivencia de las células, mientras que niveles aumentados de Bax concomitantemente aceleran la muerte celular (Furuchi *et al.* 1996). El control del número de células en un organismo

refleja el balance dinámico entre el crecimiento en número de células - obtenido por mitosis y diferenciación de células precursoras- y apoptosis. Las alteraciones en este equilibrio homeostático entre los procesos de proliferación/apoptosis puede influenciar el número total de células (Hardy et al. 2005).

#### 4.5.1. Bax en testículo

Como mencionamos anteriormente la carencia o la inhibición de la proteína proapoptótica Bax en ratones adultos lleva a acumulación de células germinales espermatogonias pre-meióticas sugiriendo un rol esencial de Bax en la regulación de la apoptosis de células germinales en la primera onda espermatogénica (Damavandi et al. 2002, Hikim et al. 2003). Una espermatogénesis defectuosa fue reportada en ratones deficientes en Bax (Knudson & Korsmeyer 1997, Russell et al. 2002).

#### 4.5.2. Bcl-2 en testículo

Se ha planteado en estudios previos que la sobreexpresión de Bcl-2 en células somáticas sustentaculares del epitelio seminífero de Sertoli aumenta su supervivencia de células durante el período postnatal evitando de manera indirecta la apoptosis de células germinales (Yamamoto et al. 2001).

De esta manera el aumento de la expresión de Bcl-2 podría aumentar la sobrevivencia de las espermatogonias a través de contactos parácrinos con las células de Sertoli, generando como consecuencia aumento de células germinales.

Sin embargo, este aumento o acumulación de espermatogonias podría llevar a un fenotipo de espermatogénesis defectuoso. La existencia de una onda apoptótica temprana normal en espermatogonias regula la proporción entre células de Sertoli y germinales, asegurando que la función de las células de Sertoli no está comprometida debido a exceso de células germinales manteniendo una proporción adecuada entre germinales y Sertoli (Huckins, 1978)

Por lo tanto, el impedir o disminuir la onda apoptótica temprana de espermatogonias, podría conducir a una acumulación de células germinales premeióticas, causando detrimento en la espermatogénesis (Furuchi et al. 1996).

#### 4.5.2. Caspasa-3 en testículo

La activación de la caspasa-3 juega un rol esencial en la traducción de señales apoptóticas en la células destinadas a morir a nivel testicular (Earnshaw et al. 1999). Se ha visto que la activación de caspasa-3 en ratas adultas produce apoptosis de espermatoцитos y disminución de testosterona intratesticular (Kim et al. 2001).

## **5. Rol del antígeno nuclear de proliferación celular en la regulación del ciclo celular**

El ciclo celular implica una serie de eventos que son responsables de la duplicación celular. La transmisión de información de una generación celular a otra requiere de una replicación de genoma durante la fase S del ciclo y su segregación en dos células hijas durante la mitosis o fase M del ciclo. Las fases S y M son eventos rigurosos cruciales ordenados en un proceso cíclico que permite una correcta duplicación sin acumulación de anomalías genéticas. En un ciclo normal la fase S precede a la fase M, y entre ellas existen dos fases preparatorias o Gap: G1 y G2. Gap 1 separa la fase M de la S, y G2 separa la fase S y M. cuando las células se diferencian salen de la fase G1 del ciclo celular y entran en un estado quiescente denominado G0. Los momentos y orden de eventos del ciclo celular están monitoreados durante o celular en puntos de control. La progresión del ciclo está mediado por la activación de protein quinasas, dependientes de subunidades denominadas ciclinas. La abundancia de ciclinas específicas aumenta durante cuando son requeridas y disminuye cuando no son requeridas (Pucci et al. 2000).

Una de las proteínas vinculada al ciclo celular y utilizada como marcador de proliferación celular es el antígeno nuclear de proliferación celular o Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) en la regulación del ciclo celular. Es una proteína muy conservada en todos los organismos eucariotas como se puede ver por la homología de la secuencia aminoácidos entre PCNA de mamíferos (Chiara et al. 2012). El gen para PCNA está presente no sólo en los mamíferos sino también en las células vegetales (Strzalka & Ziemienowicz 2011).

Fue descrito como un factor o proteína auxiliar de la ADN polimerasa, requerido para la síntesis de ADN durante la replicación Sin embargo, además de la replicación del ADN, PCNA está asociado con otros procesos celulares vitales, como la remodelación de la cromatina, la reparación del ADN, la cohesión de cromátidas hermanas y control del ciclo celular (Maga & Hubscher 2003). La complejidad de las funciones de PCNA se refleja por la historia de su descubrimiento y la investigación posterior. Esta proteína se identificó hace más de 30 años como un antígeno para una enfermedad autoinmune en el suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico (Bravo & Celis 1985). Dos años más tarde, otro grupo encontró una proteína de 36-kDa, que fue diferencialmente expresado durante el ciclo celular de la y se la llamó ciclina (Celis et al 1981). Más tarde, se demostró que los niveles de expresión de PCNA están asociados con aumento de la proliferación en condiciones neoplásicas (Ulrich & Takahashi 2013)

El PCNA es miembro de la familia abrazadera pinza deslizante de ADN que incluye ADN polimerasa (Pol) III  $\beta$ -subunidad (Mahler et al. 2012). Su función esencial es proporcionar polimerasas replicativas con la alta capacidad de procesamiento requerida para duplicar un genoma completo. La proteína PCNA adopta estructuras superponibles con un orificio central suficientemente grande como para acomodar la doble hélice del ADN (Krishna et al., 1994). Existen 3 monómeros PCNA idénticas, que inician y dirigen la replicación del ADN y la síntesis de la hebra rezagada requiere un cambio de pol  $\alpha$  de pol  $\delta$ , y participa en los mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos, por lo que se ha descrito un rol anti-apoptótico de PCNA. Presenta una vida media biológica de 20 horas y se expresa en la matriz nuclear de las células durante todas las fases de la célula ciclo con un máximo en S y G2. PCNA regula la capacidad replicativa de polimerasas (Pols), estimula la actividad catalítica de otras enzimas implicadas en la replicación y reparación de ADN. Asimismo interactúa con las proteínas de procesos de post-replicativos: 1- ensamblaje de la cromatina y la remodelación, 2- cohesión de cromátidas hermanas 3- vías con control del ciclo celular 4- regulación de la estructura de la cromatina y la transcripción (Prosperi 2006).

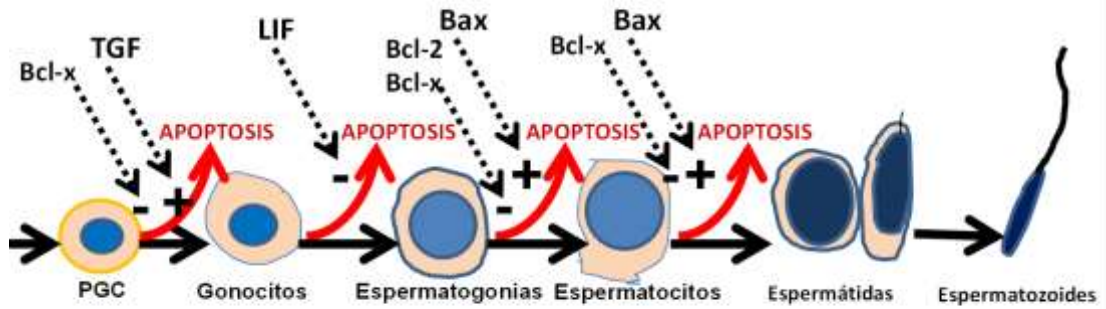


Figura 4. Representación del desarrollo de células de la línea germinal durante la embriogénesis y la primera onda de espermatogénesis y sus factores promotores y los inhibidores de la apoptosis. Se indica con flechas punteadas negras las señales que pueden regular positivamente (+) la apoptosis de células germinales o negativamente (-) con la consiguiente promoción o inhibición respectivamente. PGC: célula primordial germinal. Adaptado de Print & Loveland, 2000.

## **C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El proceso de espermatogénesis en el animal adulto se sustenta por la interacción entre células germinales, las células somáticas de Sertoli y Leydig, entre otras, que proveen de un ambiente apropiado para la maduración de las células germinales (Yamamoto et al. 2001). En este sentido el estudio de los factores que afectan la población de células testiculares, entre ellas a las células de Sertoli, células germinales, durante el desarrollo testicular es un tema esencial para la reproducción en el macho.

Durante la etapa prenatal hasta la etapa postnatal temprana, las células somáticas de Sertoli proliferan por mitosis (Hochereau-de Reviers & Courot 1971). Por lo tanto, cualquier factor que actúe durante el desarrollo testicular podría tener consecuencias importantes sobre las células de Sertoli y por lo tanto sobre el potencial de producción espermática del carnero adulto.

Los glucocorticoides, son conocidos como hormonas vinculadas al estrés, y han sido propuestos como factores de programación fetal. Asimismo dado el rol que juegan los glucocorticoides en la regulación de las vías de apoptosis (Yazawa & Sasagawa 2000, Herr et al. 2007), nuestra hipótesis sugiere que el tratamiento in utero con glucocorticoides afecta la programación de las células testiculares alterando la morfología testicular y el balance entre la expresión de proteínas anti-apoptóticas, pro-apoptóticas y proteínas implicadas en la proliferación celular, vinculando así nuestras observaciones previas. El objetivo del presente trabajo fue identificar los efectos de los glucocorticoides administrados prenatalmente (in utero) sobre el desarrollo testicular prenatal y postnatal temprano.

La información favorecerá la comprensión de los factores y mecanismos de programación fetal que incidan sobre la morfología testicular y los procesos de apoptosis y proliferación celular durante el desarrollo testicular pre y postnatal en ovinos con implicancias en el proceso de espermatogénesis, determinando consecuencias en el futuro reproductivo de un animal.

La contribución de esta tesis al conocimiento de los factores durante la vida fetal, que afectan el desarrollo de órganos reproductivos en animales productivos, como los ovinos, será determinante a la hora de proyectar futuros manejos que sean considerados estresantes (con aumento de glucocorticoides endógenos) en animales reproductores.

## **D. HIPÓTESIS**

Los glucocorticoides administrados en dosis elevadas durante el último tercio de la gestación regulan el desarrollo testicular, con cambios en la morfología testicular, así como la expresión de proteínas determinantes de la función testicular en ovinos pre y postnatales, aumentando la expresión de proteínas pro-apoptóticas y disminuyendo la expresión de proteínas anti-apoptóticas y proteínas reguladoras de ciclo celular.

## **E. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo General**

Evaluar los cambios histológicos durante el desarrollo testicular pre y postnatal en ovinos tratados *in utero* con glucocorticoides mediante el análisis morfológico e inmunohistoquímico de la expresión de proteínas asociadas a la apoptosis y a la proliferación celular.

### **2. Objetivos Específicos**

1. Determinar los efectos del tratamiento *in utero* (en el último tercio de la gestación) de betametasona sobre la estructura histológica del parénquima testicular y sus principales compartimentos en testículos pre y postnatales de ovinos
2. Determinar los efectos del tratamiento *in utero* (en el último tercio de la gestación) de betametasona sobre la expresión de las enzimas relacionadas con la apoptosis caspasa-3, Bax y Bcl-2 en testículos pre y postnatales de ovinos
3. Determinar los efectos del tratamiento *in utero* (en el último tercio de la gestación) de betametasona sobre la expresión de proteínas del ciclo celular (antígeno de proliferación nuclear: PCNA) en testículos pre y postnatales de ovinos

## F. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Se estudió el efecto de los glucocorticoides *in utero* sobre la expresión de proteínas pro y anti apoptóticas en el testículo durante el desarrollo pre y postnatal. El diseño experimental involucró tratamientos de glucocorticoides en madres gestantes en el último tercio de la gestación. El tratamiento con glucocorticoides (betametasona) fue elegido tomando en cuenta los tratamientos prenatales en humanos, utilizando las dosis, frecuencia, momento del tratamiento y la forma de administración similares a las utilizadas en humanos.

El momento utilizado para administración de la betametasona fue a los 104, 111 y 118 días, último tercio de la gestación en ovinos. Este período final de la gestación representa un momento de máximo desarrollo fetal y de maduración preparto, por lo que fue considerado un momento clave donde buscar efectos de la administración de los glucocorticoides a largo plazo.

Se utilizó como modelo experimental hembras ovinas de la raza Merino, tratadas durante la preñez, con betametasona. Para comprender los efectos de la administración *in utero* de glucocorticoides sobre la morfología testicular, y los procesos de apoptosis y proliferación celular se evaluó parámetros morfométricos y la expresión de enzimas apoptóticas y de factores de proliferación celular mediante inmunohistoquímica.

Los testículos de las crías macho fueron muestreados durante las etapas pre y postnatal. Se obtuvieron los testículos de los fetos y corderos a partir de los cuales se realizaron los análisis morfométricos e inmunohistoquímicos para evaluar la expresión de enzimas pro y anti apoptóticas y factores de proliferación celular durante la vida pre y postnatal.



## G. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Diseño experimental

Los experimentos fueron realizados en la estación experimental Allendale de la Universidad de Australia Occidental (UWA), Perth, Australia. Los testículos utilizados en el presente experimento se obtuvieron a partir de fetos y corderos cuyas madres, ovejas Merino australiano (n=42) fueron tratadas durante la gestación con glucocorticoides. Las hembras ovinas gestantes fueron divididas al azar en grupos tratado (betametasona) y grupo control (suero salino). El grupo tratado recibió 3 dosis repetidas de betametasona a los 104, 111 y 118 días de gestación (0,5 mg/kg-Celestone Chronodose; Schering Plough, Baulkham Hills, NSW, Australia) y el grupo control recibió suero salino en igual volumen (5ml) y frecuencia que el grupo tratado (ver Figura 5). Los animales utilizados para la obtención de las muestras fueron sacrificados de acuerdo a las normas de bioética del Comité de Ética de Experimentación Animal del Departamento de Agricultura de la Universidad de Australia Occidental (UWA), Perth, Australia. Todas las madres (grupo tratado y control) fueron inyectadas intramuscularmente con 150 mg de medroxiprogesterona acetato (Depo Provera; Upjohn, Rydalmere, NSW, Australia) a los 100 días de gestación para reducir pérdidas de gestación debido al tratamiento con glucocorticoides (Sloboda et al. 2002).

### 2. Animales

Las ovejas preñadas fueron sacrificadas a los 121 DG (betametasona n=5, control salino n = 5) y 132 DG (betametasona n = 5, control salino n = 6). Los fetos fueron obtenidos de inmediato por cesárea y muertos por decapitación. Los corderos paridos por parto natural a 150 DG permanecieron con sus madres en pastoreo suplementadas con grano de cereal y semillas de lupino hasta el sacrificio a los 45 días postnatales (PD) (betametasona n = 5, control salino n = 6) y 90 PD (n = 5 betametasona, control salino n = 5). Los corderos se pesaron y luego fueron anestesiados con ketamina (15 mg / kg) y xilazina (0,1 mg / kg, Troy Laboratories, Smithfield, NSW, Australia) y se sacrificaron por decapitación (Figura 5).

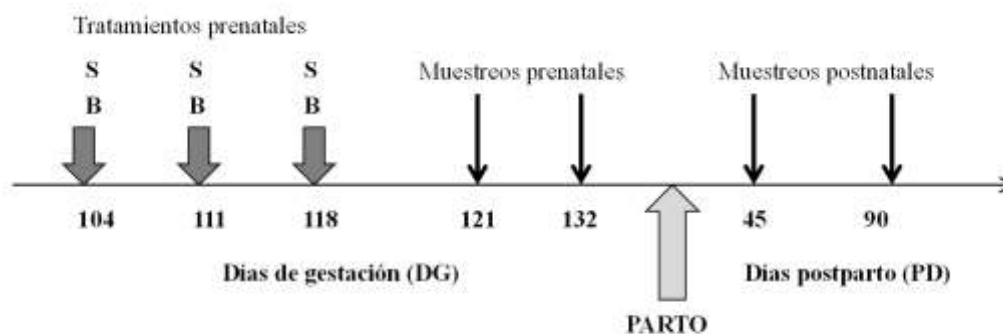


Figura 5. Diseño experimental. Se utilizaron ovejas preñadas Merino Australiano (n=42) divididas al azar en grupo tratado (B): 3 dosis repetidas de betametasona vía i/m, 0,5mg/kg, a los 104, 111 y 118 días de gestación (DG) y grupo control (S): suero salino igual volumen. Los testículos de los fetos fueron obtenidos a los 121 y 132 DG. Los testículos postnatales fueron muestreados a los 45 y 90 días postparto (PD).

### **3. Registro de peso corporal y peso testicular**

Se registraron los pesos corporales y pesos testiculares de fetos y corderos.

### **4. Procesamiento histológico**

Los testículos fetales y postnatales fueron disecados, pesados, cortados longitudinalmente, seccionados en trozos de 0,5 a 1cm<sup>3</sup> y sumergidos inmediatamente en solución fijadora de Bouin (75% de ácido pícrico saturado, 20% de formaldehído 40, y 5% de ácido acético glacial) durante 20-24 horas a temperatura ambiente (20 ° C). Las muestras testiculares fueron luego deshidratadas por inmersión en concentraciones crecientes de etanol (70, 95 y 100 %), luego en cloroformo y se sumergieron en baños sucesivos de parafina líquida en estufa. Luego de la confección de bloques y realizaron los cortes histológicos de 5 μ m de espesor con micrótopo (Leica Reichert Jung Biocut 2030, Wetzlar, Alemania) y se montaron en láminas portaobjetos para su posterior coloración histológica para análisis estereológico y ensayos de inmunohistoquímica para posterior análisis de imágenes de inmunoexpresión de las proteínas apoptóticas y de proliferación celular antes mencionadas.

### **5. Coloración de Hematoxilina-eosina**

Se realizó la coloración de hematoxilina-eosina de rutina, en cortes de testículos. Se procedió al desparafinado en xilol, luego se realizó la hidratación sumergiendo las láminas con cortes en cortes en graduaciones de crecientes de etanol al 100, 95 y 70 y luego en agua destilada. Posteriormente se sumergió en Hematoxilina de Mayer por 2 minutos, y luego en agua corriente por 5 minutos, luego se sumergió las láminas en sucesivos baños con graduaciones crecientes de etanol al 70, 95, 100 para lograr la deshidratación y posteriormente fueron montadas colocando el cubreobjetos con bálsamo de Canadá sintético (Biopack, Argentina).

### **6. Análisis estereológicos**

Se realizaron estudios estereológicos en cortes histológicos coloreados con hematoxilina-eosina y las imágenes digitales fueron adquiridas mediante software de captura (DinoCapture 2,0 software, AnMo Electronics Corporation, Taiwan) de cámara digital (Dino-ocular, AM-423X, AnMo Electronics Corporation, Taiwan) conectada a un microscopio (Binocular Premiere profesional, modelo MRP-5000, Manassas, EE.UU.) a una magnificación final de 400 aumentos. El parénquima de los testículos fue analizado en 50 campos con una herramienta automática cuantitativa con el software de análisis de imágenes ImageJ (ImageJ 1.43 m, Wayne Rasband, Institutos Nacionales de Salud, EE.UU., <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

#### *5.1. 1. Densidad de volumen (V<sub>v</sub>)*

Se midió el área ocupada por los cordones sexuales, tejido intersticial y el diámetro de los cordones sexuales en cada imagen. La densidad de volumen (V<sub>v</sub>) fue

calculada a partir del área de la imagen ocupada por cordones sexuales y/o el tejido intersticial utilizando la siguiente ecuación:

$$V_v = (A_n / A_t) 100$$

donde  $A_n$  es el área sobre el tejido de interés (cordones sexuales o el tejido intersticial) y  $A_t$  es el área total de la imagen.

### 5.2. Volumen absoluto ( $A_v$ )

Los volúmenes absolutos ( $A_v$ ) fueron calculados utilizando la siguiente ecuación:

$$A_v = V_v \times \text{volumen testicular}$$

donde  $V_v$  es la densidad de volumen (de cordones sexuales y/o el tejido intersticial), y el volumen testicular se estimó a partir del peso testicular considerando la densidad del tejido testicular como 1 (França & Godinho 2003).

### 5.3. Longitud de los cordones sexuales

La longitud de los cordones sexuales testiculares se determinó asumiendo que los cordones sexuales son estructuras de forma cilíndrica, por lo que la longitud de los mismos se estimó de acuerdo a fórmula siguiente:

$$\text{Longitud} = A_v / A_n$$

Donde  $A_v$  es el volumen absoluto de cordones sexuales, y  $A_n$  el área ocupada por la sección transversal de los cordones sexuales.

## 6. Estudios de inmunohistoquímica

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica (estreptavidina-biotina-peroxidasa) descrita previamente por Ortega *et al.* (2010) con modificaciones. Se procedió al desparafinado de las secciones histológicas por calor a 60°C durante 15 minutos y luego fueron inmersas en 300 ml de solución de buffer citrato 0.01M (pH 6.0) con 5 mL de Tween 20, durante 5 minutos en el microondas a máxima potencia (potencia: 100%, 800 Watts) como tratamiento previo de desparafinado, recuperación de antígenos y rehidratación. Mediante este proceso de recuperación antigénica inducida por calor (siglas en inglés HIER) se exponen los epítopes de los sitios antigénicos y se rompen los enlaces cruzados de las proteínas formados por el proceso de fijación de formaldehído y de este modo se desenmascaran los sitios antigénicos ocultos. También se logra el desparafinado y la rehidratación de las preparaciones histológicas. Luego se procede al enfriado con agua destilada, y buffer fosfato salino (PBS; pH 7,4). Se inactivaron las peroxidasas endógenas del tejido mediante solución de peróxido de hidrógeno al 3% por 20 minutos. Luego se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4 y luego se bloquearon las uniones inespecíficas con suero normal ovino. Los portaobjetos se trataron con anticuerpos primarios: anti-caspasa-3 (IgG policlonal de conejo, ab4051 Abcam, Cambridge, MA, EE.UU., 5 µg/ml), anti- Bax ( IgG monoclonal de conejo, ab32503, Abcam, Cambridge, MA, EE.UU., 0.2 mg/ml), anti Bcl-2 (IgG policlonal de conejo ab7973, Abcam, Cambridge, MA, EE.UU., 0.2 mg/ml), anti-PCNA (IgG2a monoclonal de ratón, ab29, Abcam, Cambridge, MA, EE.UU., 1.000 mg/ml)

A continuación las secciones se incubaron durante toda la noche - 18 horas- a 4 ° C en una cámara húmeda. Luego se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4. Posteriormente los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario (ab94698, anti ratón/conejo específico HRP Plus IHC kit de IgG anti-ratón anti-conejo) a temperatura ambiente durante 30 minutos y durante otros 30 minutos a temperatura ambiente con complejo de estreptavidina peroxidasa (ab94698, HRP-estreptavidina peroxidasa). Se utilizó como revelado, el cromógeno tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (ab94698, diamino-bencidina, DAB) diluido en su sustrato peróxido de hidrógeno al 3%. Las secciones fueron contracoloradas con hematoxilina de Mayer, deshidratadas y montadas con bálsamo de Canadá sintético (Biopack, Argentina). La especificidad de los anticuerpos fue verificada por sustitución del anticuerpo respectivo con suero no inmune (dilución 1: 500).

## 7. Análisis de imágenes de inmunohistoquímica

Mediante el análisis digital de imágenes se cuantificó la immunoexpresión de caspasa-3, Bax, Bcl-2 y PCNA en los testículos de ovinos pre y postnatales. Se midió el porcentaje de área inmunomarcada en el parénquima testicular con el software anteriormente mencionado ImageJ en 50 campos. Se creó una macro para establecer un umbral para la detección de la tinción de color marrón. Las intensidades de color marrón fueron determinadas como áreas positivas y fueron seleccionados para cada anticuerpo. El porcentaje de área inmunomarcada se determinó mediante análisis de segmentación de color en el que todos los objetos de un color marrón específico se seleccionaron determinando un umbral de color. Luego se binarizó la imagen y posteriormente se midió el porcentaje de píxeles en las imágenes umbralizadas

previamente (Figura 6). Este análisis automatizado de umbral de color y el análisis de segmentación se establecieron para cada anticuerpo a partir de imágenes RGB. Estos valores fueron verificados y normalizados con varios controles utilizando la misma región para la calibración y verificación del porcentaje de área inmunomarcada. Los detalles metodológicos de análisis de imágenes como un método válido para cuantificar ya han sido descritos previamente (Ortega & Salvetti 2007).

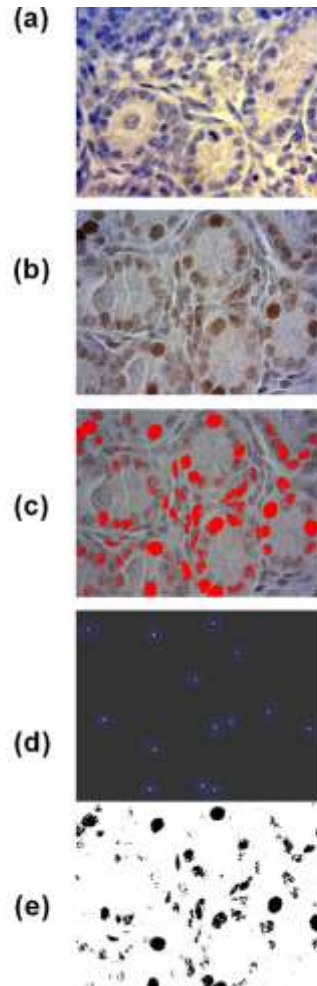


Figura 6. Imágenes de proceso de segmentación de imágenes de inmunohistoquímica del parénquima mostrando la expresión de PCNA, utilizando diamino-bencidina (DAB) como cromógeno. (a) Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica, (b) núcleos de células de cordones sexuales testiculares marcados intensamente de color marrón, (c) umbralización y selección de estructuras indicadas en color rojo mediante el programa ImageJ, (d) imagen delimitando núcleos celulares, (e) imagen binarizada, en color negro estructuras positivas al DAB.

## **7. Análisis estadístico**

Se utilizó en modelo general lineal, se incluyeron dos factores y se determinó los efectos de interés: el efecto del factor tratamiento (TRAT: betametasona o control), efecto factor edad o día (DIA: días de muestreo prenatales 121 DG y 132 DG, y días postnatales: 45 DP y 90 DP) y el efecto de la interacción entre ambos factores (TRAT\* DIA). Por cada animal se realizaron 50 observaciones para cada variable dependiente continua: variables morfométricas (peso corporal, peso testicular, diámetro de cordones sexuales/túbulo seminífero, volumen de cordones sexuales/túbulo seminífero, volumen de intersticio testicular) y variables semicuantitativas inmunohistoquímicas (inmunoexpresión de caspasa-3, Bax, Bcl-2 y PCNA). Para el análisis estadístico antes mencionado del modelo general lineal se utilizó el programa estadístico SAS (SAS, v. 9.1; SAS Institute Inc; Cary, NC, EE.UU.).

Todas las observaciones realizadas en los preparados de testículo por animal y por cada variable fueron ingresadas al estudio estadístico (Ruifrok & Johnston 2001, Salvetti et al. 2012). Todos los resultados fueron expresados como medias ( $\pm$  e.e.m.) y los análisis post hoc fueron realizados mediante test de Tukey, siendo el nivel de significación definido para todos los grupos en  $P < 0,05$ .

## H. RESULTADOS

### 1. Resultados de peso corporal y peso testicular

#### 1.1. Peso corporal

Los pesos corporales no registraron diferencias entre los animales tratados y controles durante los períodos pre y postnatal. El peso corporal en animales tratados con betametasona aumentó desde los 121 DG hasta los 90 PD ( $1,9 \pm 0,7$  a  $17,8$  kg,  $p < 0,0001$ ). Asimismo se registró un aumento del peso corporal en animales del grupo control desde los 121 DG hasta los 90 PD ( $2,8 \pm 0,7$  a  $18,7 \pm 0,7$  kg,  $p < 0,0001$ ), sin diferencias en los pesos corporales desde los 121 DG a los 132 DG (Figura 7a) en controles ni en los tratados.

#### 1.2. Peso testicular

El peso testicular a los 90 PD fue menor en animales tratados en comparación a sus controles ( $6,6 \pm 0,6$  vs  $8,6 \pm 0,6$ ;  $p = 0,02$ ). El peso de los testículos de animales control aumentó progresivamente desde los 121 a los 90 PD ( $0,4 \pm 0,6$  a  $8,6 \pm 0,6$  gramos;  $p < 0,0001$ ). El peso de los testículos en los animales tratados con betametasona aumentó desde los 121 DG a los 90 PD ( $0,3 \pm 0,8$  vs  $6,6 \pm 0,6$  gramos;  $p < 0,0001$ ). En cuanto al peso testicular se registró un aumento en los animales del grupo control entre los 132 DG y los 45 PD ( $0,6 \pm 0,6$  vs  $2,7 \pm 0,6$ ;  $p = 0,01$ ) y los 90 PD ( $8,6 \pm 0,6$ ;  $p = 0,0001$ ). De la misma forma los animales tratados con betametasona evidenciaron un aumento en el peso testicular desde los 132 DG a los 45 PD ( $0,4 \pm 0,6$  vs  $2,2 \pm 0,6$ ;  $p = 0,04$ ) y de los 45 PD a los 90 PD ( $6,6 \pm 0,6$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 7b).

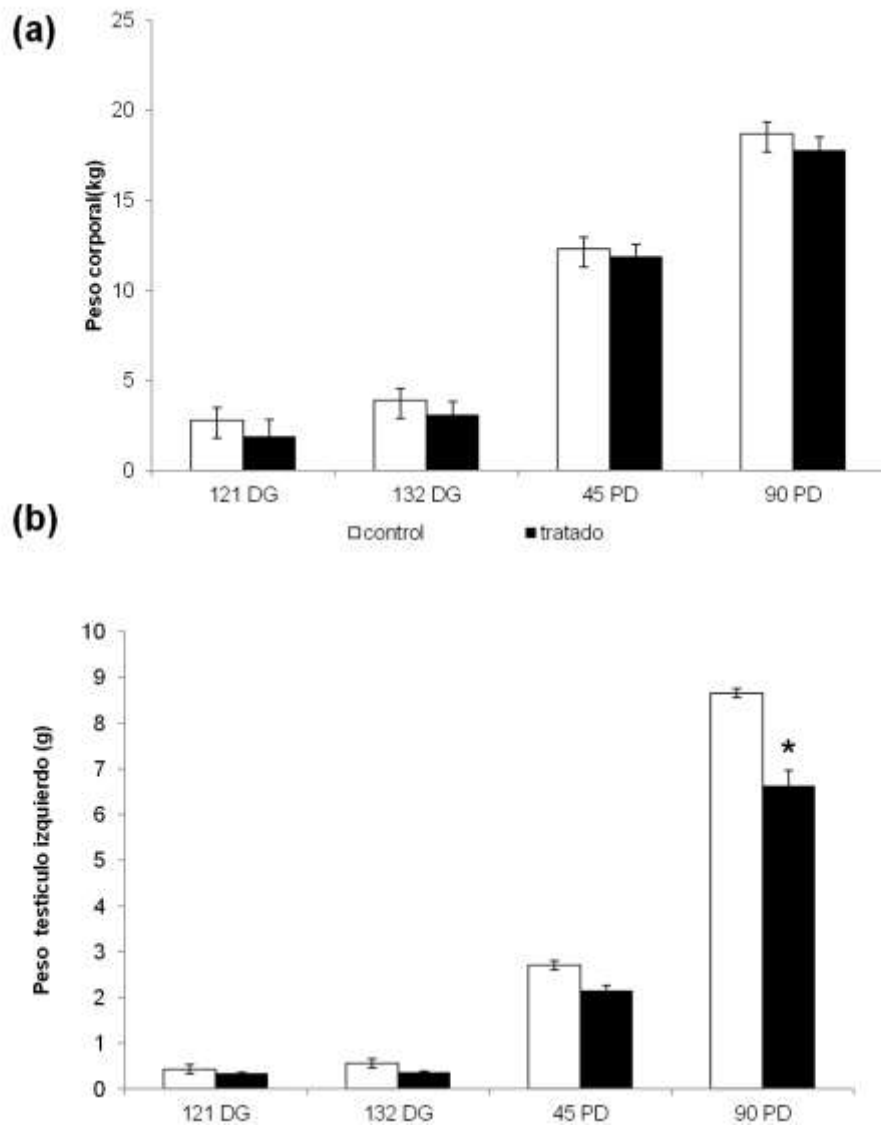


Figura 7. Efecto del tratamiento in utero con betametasona durante la gestación sobre el peso corporal (a) y peso testicular (b) a los 121 y 132 días de gestación (DG) y a los 45 y 90 días posnatales (PD). Grupo control barras blancas, grupo tratado barras negras. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos tratado y control dentro de cada fecha:  $P < 0,05$  (\*).



## 2. Resultados estereológicos

El parénquima testicular de los animales controles y tratados en etapa fetal evidenciaron la morfología típica de los ovinos, con la presencia de cordones sexuales conteniendo en posición central células germinales denominadas gonocitos, gonocitos maduros y células de Sertoli en la periferia.

En etapas postnatales (90 DG) se evidenció pro-espermatogonias más cercanas a la basal. Esto se corresponde con el grado de madurez observado posteriormente al parto y previo al comienzo de la etapa puberal, definido por Sapsford (1962).

En cuanto al intersticio se evidenciaron células de Leydig durante la etapa fetal y postnatal, con cambios en la morfología citoplasmática en animales controles previo a la etapa puberal, con un marcado aumento en la coloración, siendo el citoplasma más eosinófilo durante esa etapa en comparación con los animales tratados con betametasona (Figura 8. g).

De acuerdo con las mediciones morfométricas realizadas se registraron los siguientes datos:

### 2.1. Volumen porcentual y absoluto en el parénquima testicular

Se observaron diferencias en el volumen porcentual y en el volumen absoluto del parénquima testicular entre animales tratados con betametasona y sus controles. Se evidenció que el parénquima del testículo pre y postnatal comprende tejido intersticial y cordones sexuales macizos hasta los 45 días postnatales en animales controles y tratados. Sin embargo, a los 90 días postparto se observó en los animales controles la presencia de luz en posición central de los cordones sexuales, determinando la presencia de los primeros túbulos seminíferos. No se encontraron luces en los cordones sexuales de animales tratados *in utero* con betametasona a los 90 PD (Figura 8).

En animales del grupo control el 54% del testículo estaba ocupado por cordones sexuales, disminuyendo a los 132 DG ( $p < 0,0005$ ) y a los 90 PD ( $p < 0,0001$ ). En animales tratados el volumen porcentual ocupado por los cordones sexuales no varió entre el período prenatal y los 45 PD, y fue menor ( $p = 0,008$ ) a los 90 PD comparando con los animales control (Figura 9c), coincidiendo con la disminución del diámetro de los cordones sexuales a los 45 y 90 días PN (Figura 9e).

El volumen absoluto de los cordones sexuales/túbulos seminíferos fue menor en los animales tratados que sus respectivos controles a los 45 y 90 DG (Figura 9c).

Asimismo el volumen absoluto ocupado por el intersticio testicular disminuyó en animales tratados a los 45 ( $p = 0,0034$ ) y 90 PD ( $p < 0,0001$ ) comparados con los respectivos controles (Figura 9c). Esto coincide con las observaciones realizadas de menor desarrollo citoplasmático de células de Leydig en animales tratados a los 90 PD.

## 2.2. Diámetro de cordones sexuales/túbulos seminíferos

El diámetro de los cordones sexuales de animales tratados fue menor a los 121 DG ( $33,6 \pm 0,2$  vs  $34,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ;  $p = 0,045$ ), 45 PD ( $41,1 \pm 0,2$  vs  $44,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,0001$ ) y 90 PD ( $41,7 \pm 0,2$  vs  $50,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,0001$ ) en comparación con los respectivos controles (Figura 9e). En animales control el diámetro de los cordones sexuales y túbulos seminíferos aumentó de  $34,3 \pm 0,3$  a  $50,0 \pm 0,3 \mu\text{m}$  desde los 121 DG a los 90 PD respectivamente (Figura 9e). Sin embargo, en los animales tratados con betametasona el diámetro de los cordones sexuales no aumentó entre los 121 y 132 ( $33,6 \pm 0,2$  vs  $33,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ;  $p = 0,6$ ) ni entre los 45 y 90 PD ( $41,1 \pm 0,2$  vs  $41,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ;  $p = 0,08$ ).

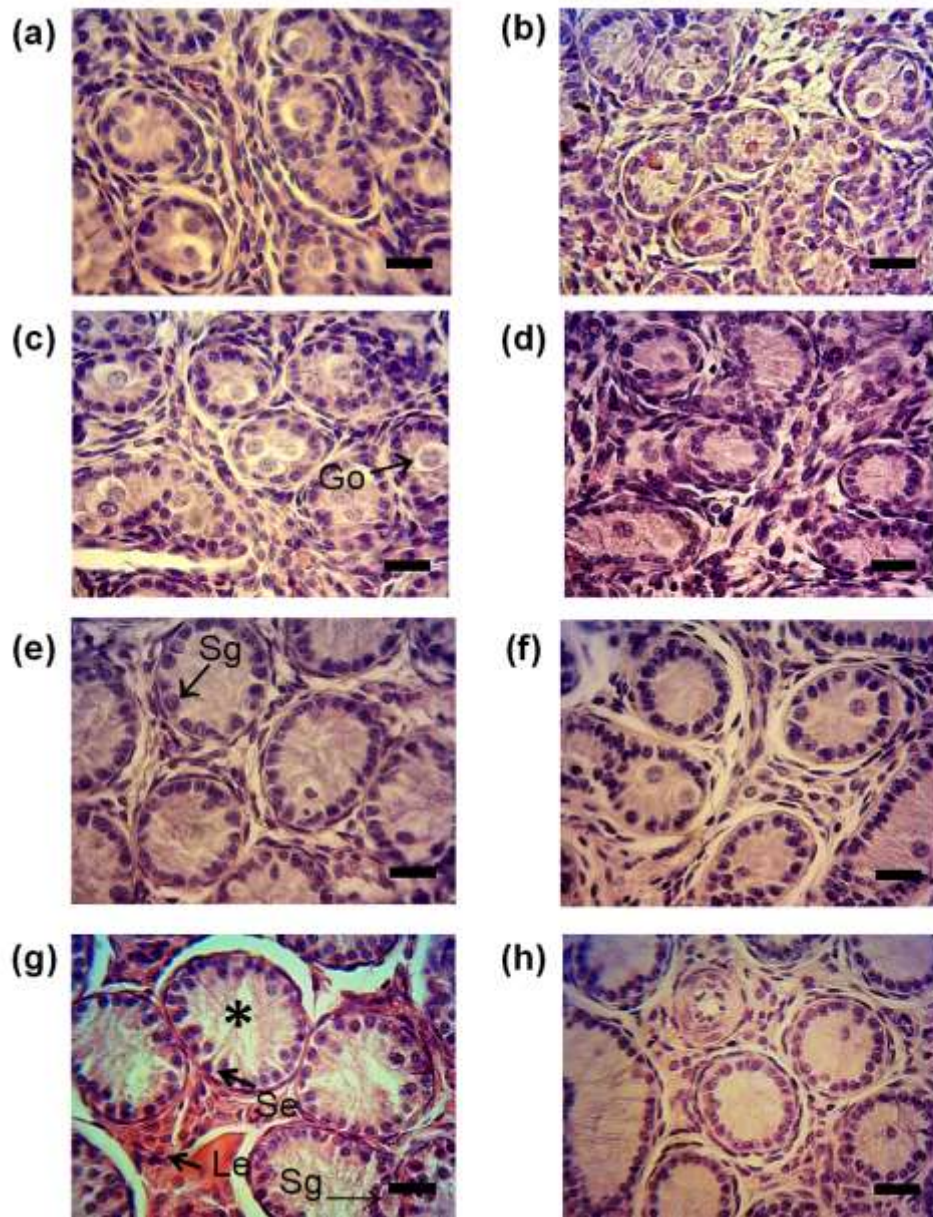


Figura 8 Imágenes de microscopía óptica con técnica de Hematoxilina-Eosina del parénquima testicular ovino luego del tratamiento in utero con glucocorticoide. (a), (b) 121 días de gestación (DG); (c), (d) 132 DG; (e), (f) 45 días postnatales (PD); (g), (h) 90 PD, grupos control salino y tratado con betametasona respectivamente. Gonocito (Go) en localización central en cordón sexual; espermatogonia (Sg) en position periférica alcanzando la membrana basal; presencia de luz (\*) en cordones sexuales como indicador de comienzo de túbulos seminíferos. Células de Leydig con citoplasma eosinófilo (Le). Células de Sertoli (Se), adquiriendo forma adulta. Magnificación 400x. Barra de escala: 20  $\mu$ m

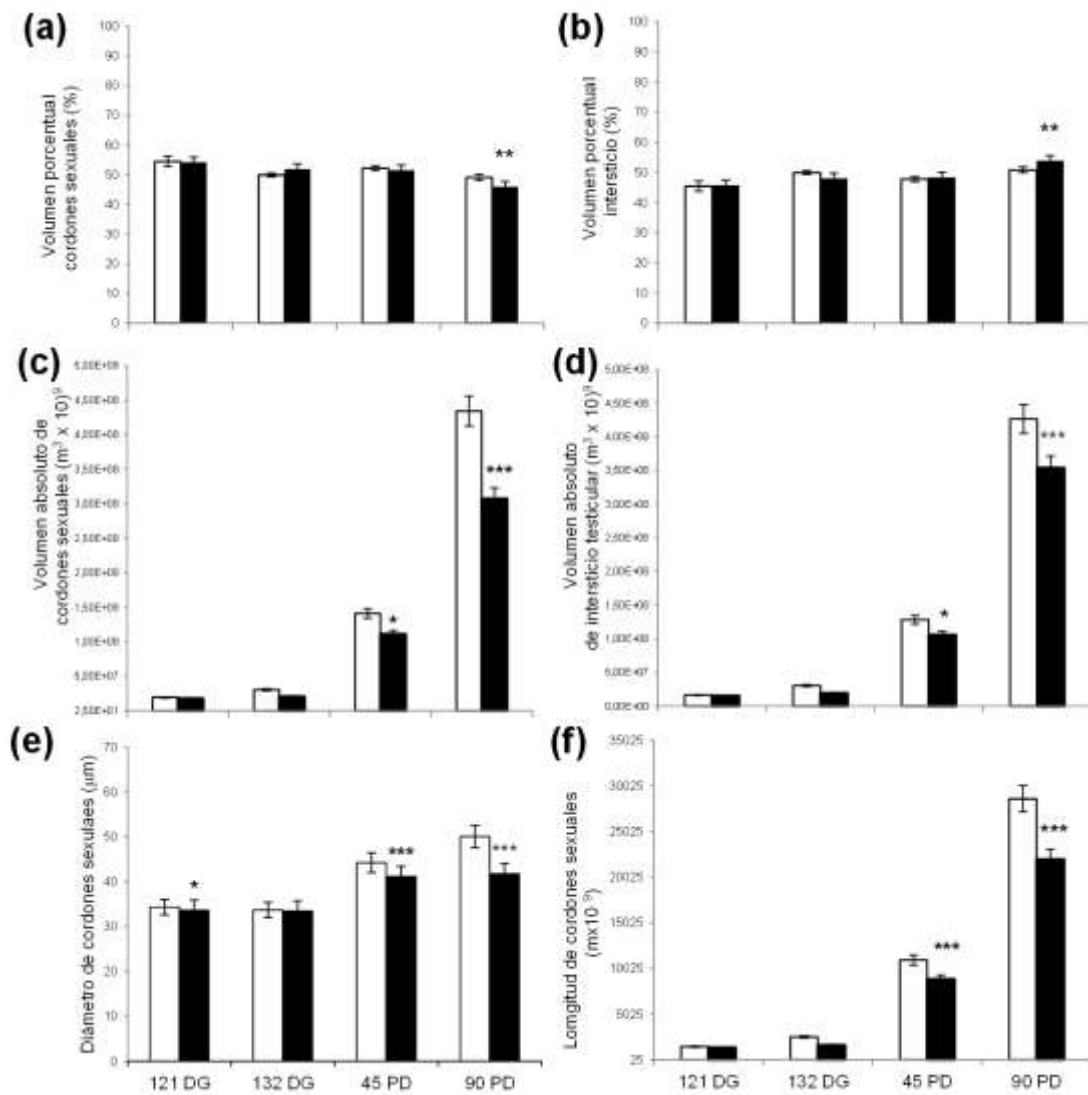


Figura 9. Efectos de la administración prenatal de glucocorticoides sobre el parénquima testicular durante el desarrollo pre y postnatal. Grupos tratados con betametasona (barras negras) o grupos control con suero salino (barras blancas) a los 121 y 132 días de gestación (DG); y 45 y 90 días posnatales (PD). Variables morfométricas expresadas como medias  $\pm$  eem: a) volumen porcentual ocupado por cordones sexuales, (b) volumen porcentual ocupado por intersticio testicular, (c) volumen absoluto de cordones sexuales, (d) volumen absoluto de intersticio testicular, (e) diámetro de cordones sexuales, (f) Longitud de cordones sexuales. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos tratado y control dentro de cada fecha:  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*),  $P < 0,001$  (\*\*\*)

### 3. Resultados de inmunohistoquímica

#### 3.1. Resultados de expresión de caspasa-3 activa

##### *Localización celular de la enzima caspasa-3 activa*

En las células germinales o gonocitos, ubicados en posición central dentro de los cordones sexuales, con morfología redondeada, la inmunoexpresión de la enzima pro-apoptótica caspasa-3 activa fue evidenciada en la región nuclear y perinuclear durante la etapa prenatal y a los 45 PD. En células germinales pre-espermatogonias a los 90 PD se evidenció a nivel nuclear, así como también perinuclear.

En las células de Sertoli la expresión de caspasa-3 activa fue evidenciada en el citoplasma así como en el núcleo, predominando la expresión citoplasmática.

En el intersticio testicular la expresión de fue evidenciada en las células de Leydig en los grupos tratados y controles (Figura 11).

En animales controles y tratados la inmunoexpresión de caspasa-3 activa varió durante los períodos pre y postnatal con un máximo de expresión durante el período prenatal, específicamente a los 121 DG (Figura 10a).

En cuanto al análisis semicuantitativo la expresión de caspasa-3 fue menor tratados en comparación con los controles a los 121 DG y a los 90 DP, con una  $p = 0,002$  y  $0,004$  respectivamente (Figura 10a, Figura 11).

A los 132 días de gestación no se registraron diferencias en la expresión de caspasa-3 entre animales controles y tratados (Figura 10a). En tanto la expresión de caspasa-3 a los 45 DG tuvo una tendencia a disminuir ( $p = 0,07$ ) en comparación con sus controles (Figura 10a).

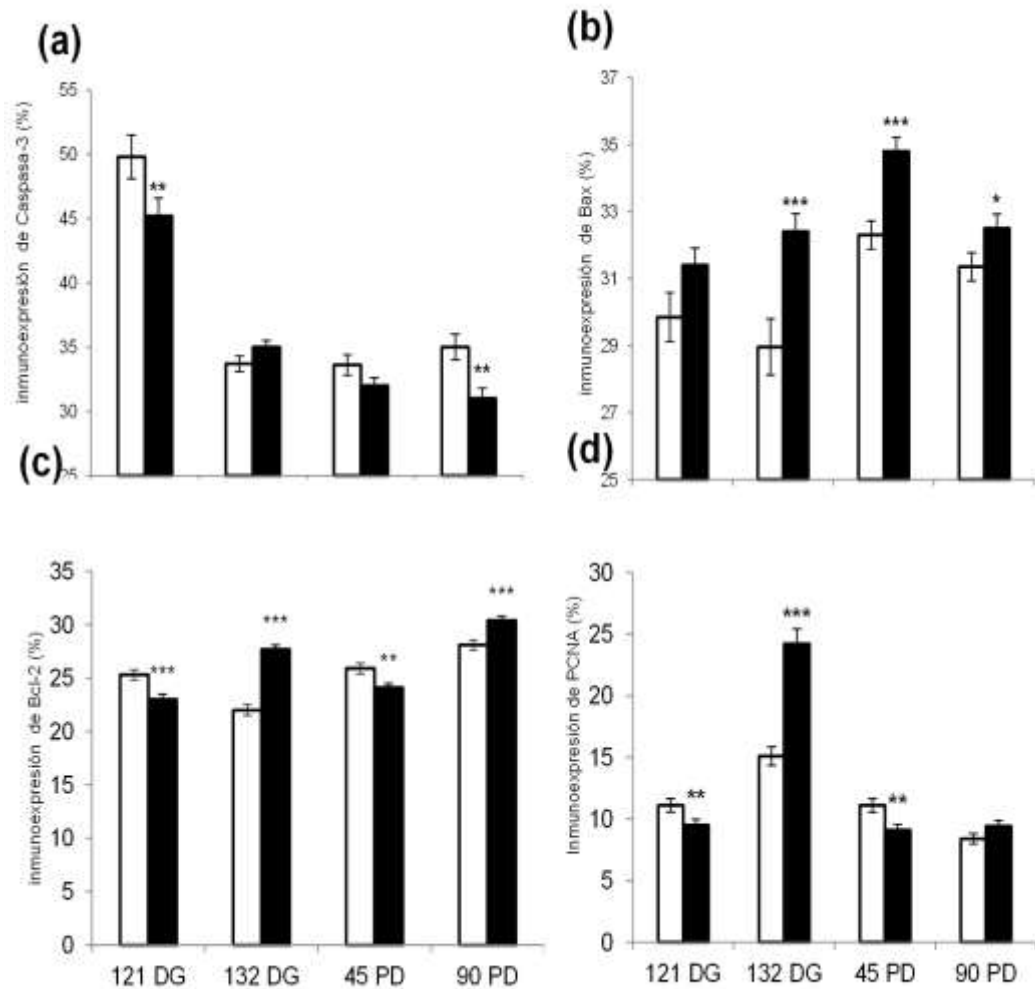


Figura 10. Cuantificación de la inmunoexpresión de proteínas apoptóticas y marcador de proliferación celular (mediase  $\pm$ e.m.) en el parénquima testicular luego del tratamiento in utero de betametasona (barras negras) o suero salino (barras blancas) a los 121 y132 días de gestación (DG); y días posnatales (PD): 45 y 90 PD. (a) Caspase-3, (b) Bax , (c) Bcl-2; (d) PCNA. Los asteriscos indican diferencias entre tratados y controles para cada fecha:  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

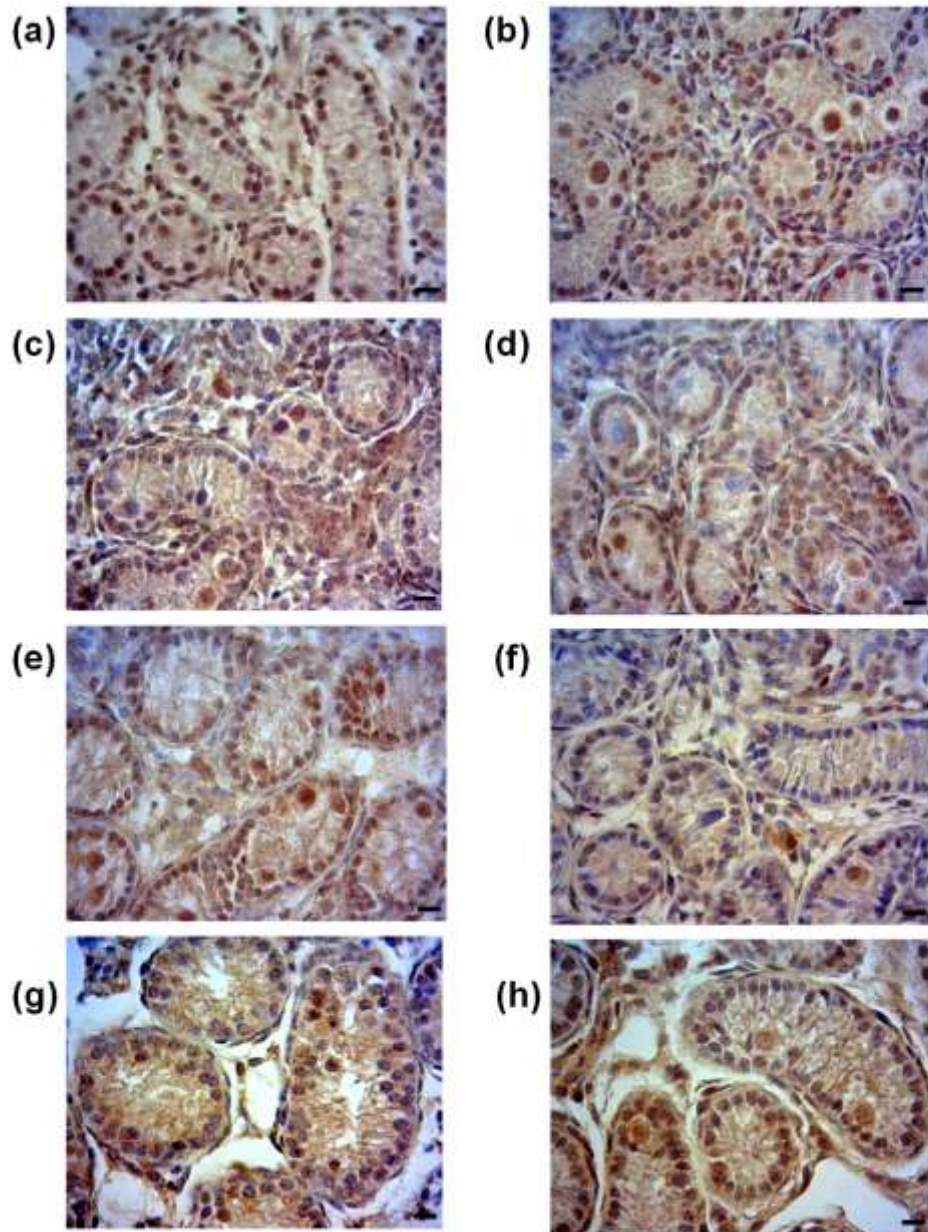


Figura 11. Imágenes de inmunohistoquímica representativas de la expresión de caspasa-3 en el parénquima testicular luego del tratamiento *in utero* con betametasona (grupo tratado) o suero salino (grupo control.). (a) 121 días de gestación (DG) grupo control, (b) 121 DG grupo tratado; (c) 132 DG grupo control, (d) 132 DG grupo tratado; (e) 45 días posnatales (PD) grupo control, (f) 45 PD grupo tratado; (g) 90 PD grupo control, (h) 90 PD grupo tratado. Magnificación 400x. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

### 3.2. Resultados de expresión de Bax

#### *Localización de expresión de Bax en el parénquima testicular*

La expresión de Bax fue localizada en el citoplasma de las células de Sertoli y Leydig en los grupos tratados con betametasona y controles así como en la región perinuclear de gonocitos en los testículos prenatales y en espermatogonias en animales posnatales (Figura 12).

En cuanto a análisis semicuantitativo en los animales tratados con betametasona se observó una tendencia a aumentar la expresión de Bax en el parénquima testicular en general a los 121 DG ( $p = 0,07$ ) y luego aumentó significativamente, a los 132 DG ( $p = 0,0005$ ), 45 PD ( $p < 0,0001$ ) y 90 PD ( $p = 0,04$ ) en comparación con sus controles.

En animales controles la expresión de Bax en el parénquima testicular se mantuvo sin cambios significativos durante la vida prenatal, aumentando posteriormente en etapas postnatales ( $p = 0,0004$ ) (Figura 10b).

En los animales tratados la expresión de Bax no varió durante la etapa fetal ( $p = 0,2$ ) aumentó luego a los 45 PD ( $p = 0,0006$ ) y disminuyó a los 90 PD ( $p = 0,0001$ ) (Figura 10b).



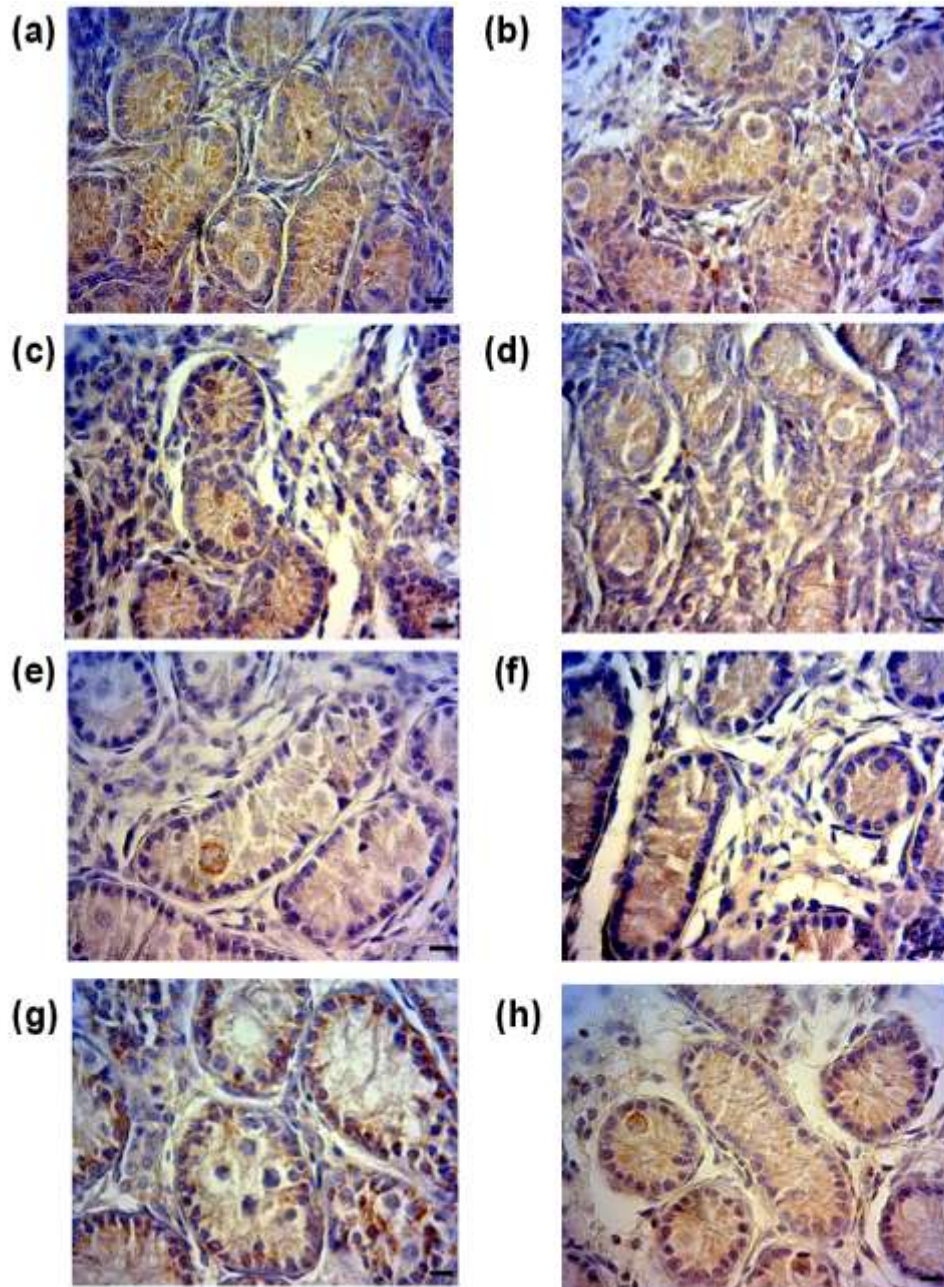


Figura 12. Imágenes de inmunohistoquímica representativas del parénquima testicular mostrando la expresión de Bax luego del tratamiento in utero con betametasona (grupo tratado) o suero salino (grupo control.). (a) 121 días de gestación (DG) grupo control, (b) 121 DG grupo tratado; (c) 132 DG grupo control, (d) 132 DG grupo tratado; (e) 45 días posnatales (PD) grupo control, (f) 45 PD grupo tratado; (g) 90 PD grupo control, (h) 90 PD grupo tratado. Magnificación 400x. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

### 3.3. Resultados de expresión de Bcl-2

La inmunoexpresión de Bcl-2 fue localizada en los cordones sexuales en fetos y en túbulos seminíferos en animales postnatales en el citoplasma de las células Sertoli, así como en la región nuclear y perinuclear de los gonocitos. En el intersticio testicular las células de Leydig expresaron una marcación perinuclear (Figura 10c).

Sin embargo, cabe destacar la expresión notoria de Bcl-2 en el citoplasma de células de Leydig durante todo el desarrollo tanto prenatal tardío a los 132 DG como en el desarrollo posnatal para ambas fechas en ambos grupos como se indica en la Figura 13.

En animales controles la inmunoexpresión de Bcl-2 disminuyó de los 121 a los 132 DG ( $p < 0,0001$ ) y luego aumentó a los 45 y a los 90 PD ( $p < 0,0001$ ) (Figura 10c).

Contrariamente a los controles, en los testículos de animales tratados, el patrón de expresión para Bcl-2 prenatal aumentó desde los 121 DG a los 132 DG ( $p < 0,0001$ ), disminuyendo a los 45 PD ( $p < 0,0001$ ) y aumentando luego a los 90 PD ( $p < 0,0001$ ) (Figura 10c).

Los animales tratados con betametasona mostraron una disminución de la expresión de Bcl-2 a los 121 DG ( $p = 0,001$ ) y a los 45 PD ( $p = 0,005$ ) y un aumento a los 132 DG ( $p < 0,0001$ ) y 90 PD ( $p = 0,0006$ ) en comparación con sus controles.

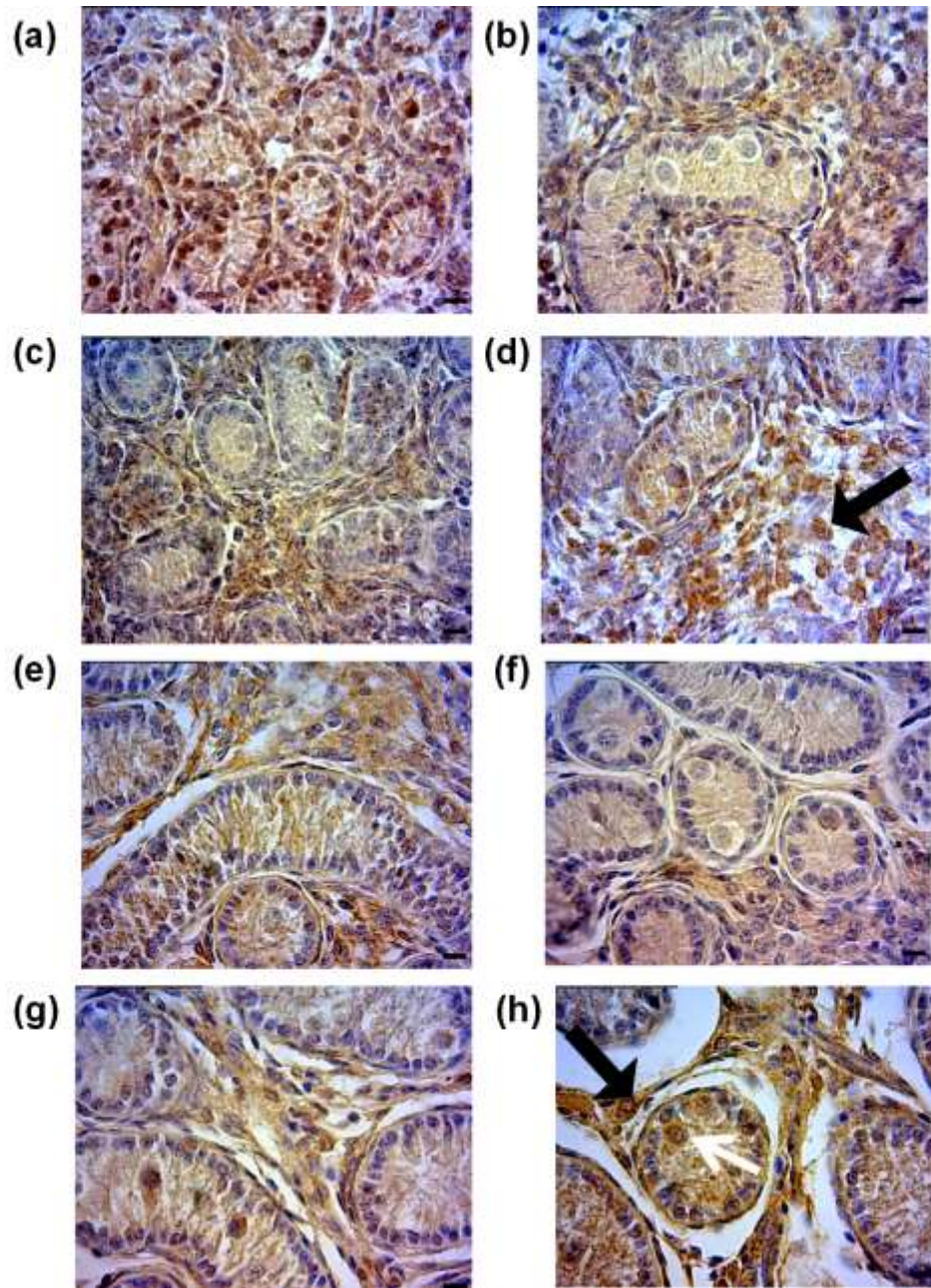


Figura 13. Imágenes de inmunohistoquímica representativas de la expresión de Bcl-2 en el parénquima testicular luego del tratamiento in utero con betametasona (grupo tratado) o suero salino (grupo control.). (a) 121 días de gestación (DG) grupo control, (b) 121 DG grupo tratado; (c) 132 DG grupo control, (d) 132 DG grupo tratado; (e) 45 días posnatales (PD) grupo control, (f) 45 PD grupo tratado; (g) 90 PD grupo control, (h) 90 PD grupo tratado. Flechas negras células de Leydig en intersticio. Flecha blanca gonocito alcanzando la lámina basal Magnificación 400x. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

### 3.4. Resultados de la expresión de PCNA

La expresión de PCNA fue observada principalmente en núcleos de células de la línea germinal (gonocitos y pre-espermatogonias) y en núcleos de células de Sertoli a nivel de los cordones sexuales/túbulos seminíferos. En cuanto a la expresión en células intersticiales se observó escasa expresión en algunas células intersticiales de Leydig (Figura 10 d).

Tanto los gonocitos localizados centralmente en los cordones sexuales como las células de Sertoli en la periferia de los mismos expresaron PCNA, observándose un mayor número de células positivas a PCNA en el testículo prenatal a los 132 DG tal (Figura 14c y d)

Sin embargo, en las fechas posteriores al nacimiento se observa menor número de células positivas dentro de los cordones sexuales/túbulos seminíferos y muy escasos núcleos positivos en el intersticio testicular (Figura 14e, f, g y h).

El patrón de inmunexpresión de PCNA fue similar a la observada para Bcl-2. Los animales tratados con betametasona mostraron una disminución de la expresión de PCNA a los 121 DG ( $p = 0,0006$ ) y a los 45 PD ( $p = 0,009$ ), y un aumento a los 132 DG ( $p < 0,0001$ ) y una tendencia a aumentar a los 90 PD ( $p = 0,07$ ) en comparación con sus controles. La inmunexpresión en animales controles aumentó de los 121 a los 132 DG ( $p < 0,0001$ ), y luego disminuyó de 132 DG a 45 PD ( $p < 0,0001$ ) aumentó de los 45 PD y a los 90 PD ( $p = 0,0006$ ). En los tratados la inmunexpresión de PCNA aumentó de los 121 DG a los 132 DG ( $p < 0,0001$ ), disminuyendo a los 45 PD ( $p < 0,0001$ ), mientras que no se registraron diferencias entre los 45 PD y los 90 PD ( $p = 0,5$ ) (Figura 10d).

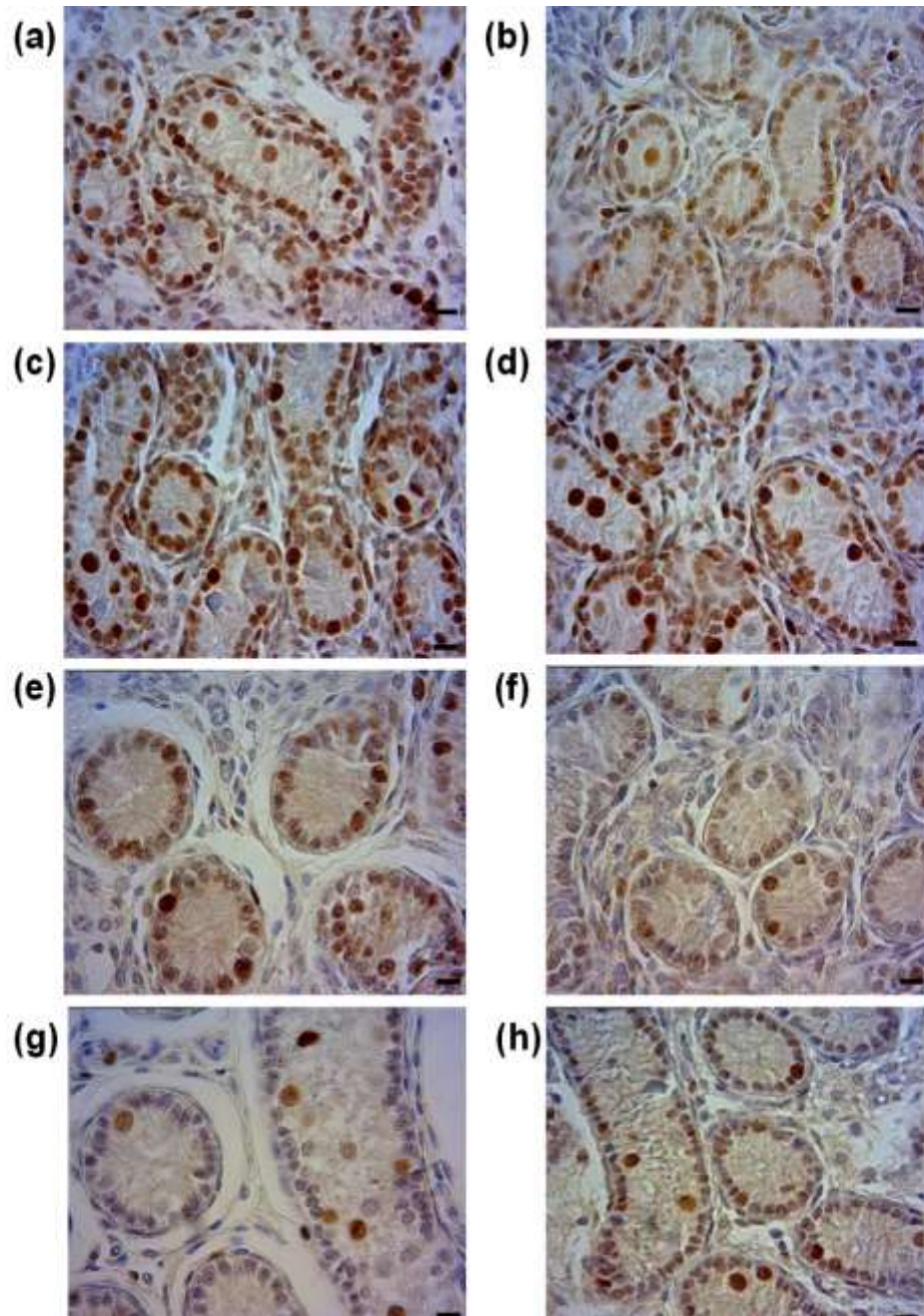


Figura 14. Imágenes de inmunohistoquímica representativas del parénquima testicular evidenciando la expresión de antígeno de proliferación celular (PCNA) luego del tratamiento in utero con betametasona (grupo tratado) o suero salino (grupo control.). (a) 121 días de gestación (DG) grupo control, (b) 121 DG grupo tratado; (c) 132 DG grupo control, (d) 132 DG grupo tratado; (e) 45 días posnatales (PD) grupo control, (f) 45 PD grupo tratado; (g) 90 PD grupo control, (h) 90 PD grupo tratado. Magnificación 400x. Barra de escala: 10  $\mu$ m

## I. DISCUSIÓN

La administración de glucocorticoides *in utero* afecta el desarrollo testicular durante la vida prenatal, prolongándose el efecto durante la vida postnatal y prepuberal en ovinos. En el presente trabajo se evidenció una disminución del volumen y diámetro de los cordones sexuales que persisten a lo largo del desarrollo postnatal y prepuberal, con un retraso en la apertura de los cordones en los animales tratados con betametasona. Este retraso en la apertura de cordones sexuales, y por consiguiente retardo en el desarrollo de los túbulos seminíferos funcionales se evidencian en los animales tratados. Nuestros datos coinciden con lo reportado previamente en ovinos machos a los 90 días de edad, observándose en los animales controles a los 90 días postparto presencia de luz central en los cordones y advenimiento de los túbulos seminíferos (Schanbacher et al. 1974).

La evidencia histológica en el presente estudio muestra que el tratamiento prenatal con glucocorticoides retrasa morfológicamente el desarrollo testicular, y en consecuencia puede postergar el inicio de la primera onda espermatogénica en ovinos. Normalmente los gonocitos comienzan a formar espermatogonias hacia el día 65 postnatal, y espermatoцитos primarios que inician la meiosis I son evidenciados hacia el día 69 postnatal en ovinos (Schanbacher et al. 1974). Se ha determinado en ovinos que un testículo de 6 gramos comienza las multiplicaciones de espermatogonias, y en el testículo de 12 gramos se observan las primeras figuras de profase meiótica (Courot 1962). Si comparamos con en el presente estudio a los 90 PD tanto los animales tratados y los controles alcanzaron un peso de 6,6 gramos y 8,7 gramos respectivamente, con lo cual se habría iniciado recientemente las multiplicaciones de espermatogonias en los tratados, y previamente en animales controles.

Durante la vida fetal, un aumento en los cordones sexuales es mayormente una consecuencia de un aumento en longitud y no en diámetro de los cordones (Hochereau-de Reviers et al. 1995). Durante la vida postnatal, los incrementos en el peso testicular son dados mayormente por aumento en el diámetro de los cordones sexuales/túbulos seminíferos que se acompaña con la proliferación de células germinales y espermatogénesis (Clermont & Huckins 1961). Sin embargo, en animales tratados con betametasona *in utero* no aumentó el diámetro de los cordones sexuales, sugiriendo que los efectos persisten en la vida postnatal por meses en el ovino. El crecimiento en longitud de cordones sexuales observado durante la etapa postnatal en los animales controles en el presente estudio concuerda con los estudios previos descrito en la etapa fetal. Asimismo según nuestros datos el diámetro de los cordones también aumenta durante la vida fetal en el último tercio de la gestación en ovinos, así como también en la vida postnatal hasta la pre-pubertad. Los gonocitos tienen un período de detención en la fase G1 del ciclo en todos los mamíferos, siendo de una duración de 10 días en rata (Clermont & Huckins 1961), 1957) y de 2 meses en el carnero (Courot, 1962). Asimismo estudios previos sugieren que la relocalización de los gonocitos hacia la membrana basal es un prerequisite esencial para la supervivencia, observándose que los gonocitos localizados en el centro de los cordones son eliminados, por lo que existe una relación crucial entre la relocalización y proliferación (Nagano *et al.* 2000). Esto concuerda con las observaciones en el presente estudio con respecto a la localización periférica de gonocitos en los animales controles a los 90 días de edad y mayor inmunoexpresión de caspasa-3 en

gonocitos que no alcanzaron la región más basal de los cordones sexuales o túbulos seminíferos en aquellos donde se produjo la apertura de la luz central. En el presente estudio las primeras espermatogonias fueron observadas así como la proliferación de dichas células en posición periférica en los túbulos seminíferos en animales controles, tal como hacen referencia estudios previos en ruminantes a los 90 días de edad (Schanbacher et al. 1974). Sin embargo en animales tratados con betametasona no se evidencian gonocitos en posición periférica sino que predominan en posición central.

Estos cambios histológicos evidenciados en el presente estudio se acompañaron de cambios en el balance entre proteínas pro y anti apoptóticas en el testículo durante el desarrollo pre y postnatal, sugiriendo que los glucocorticoides producen efectos inmediatos, así como también a largo plazo modificando la estructura y función testicular, con posibles consecuencias negativas en la fertilidad futura.

Nuestros datos sugieren que en el testículo, las vías de la muerte celular implican cambios en el equilibrio de las enzimas apoptóticas caspasa-3, Bax y Bcl-2, y se activan por la administración de glucocorticoides durante el último trimestre de la gestación. La muerte celular programada y proliferación celular son procesos conservados evolutivamente que juegan un rol esencial durante el desarrollo normal de un tejido y su homeostasis, como ocurre en el testículo (Berensztein et al. 2002). Estudios previos indican que durante la vida fetal y postnatal se determina el tamaño final del testículo y fertilidad potencial de la vida adulta. En este sentido nuestro trabajo indica que el tratamiento prenatal con glucocorticoides no afecta el tamaño testicular pre y posnatal pero si redujo la expresión de enzimas pro-apoptóticas como la caspasa-3, mientras que aumentó la expresión enzimas pro y anti-apoptóticas como Bax y Bcl-2 en el testículo de ovinos.

Acompasando a los cambios en la expresión de enzimas apoptóticas testiculares se determinó el atraso en el crecimiento de los cordones sexuales en la etapa prepuberal en animales tratados *in utero* con betametasona, demostrado por la ausencia de luz central en los cordones sexuales. La translocación de la caspasa-3 en el núcleo parece ser un requisito previo para la degradación del ADN y la subsiguiente apoptosis de células germinales (Kim et al. 2001). Esto coincide con nuestras observaciones de la localización de la inmunoexpresión de caspasa-3 en la región perinuclear así como en el núcleo de los gonocitos de fetos controles. Nuestras observaciones son también consistentes con estudios previos que muestran que la apoptosis en las células germinales fue precedido por una redistribución de Bax desde la región citoplasmática a la región perinuclear (Yamamoto et al. 2001). En el presente estudio la expresión de Bax fue localizada a nivel citoplasmático en Sertoli y región perinuclear y nuclear en gonocitos en animales tratados con betametasona, lo que sugiere que la redistribución de esta enzima hacia el núcleo puede ser impulsado por los glucocorticoides.

El inicio de la espermatogénesis comienza con una onda de células apoptóticas que limita su eficiencia durante el primer ciclo en la mayoría de los mamíferos, y garantiza un equilibrio entre el número de espermatogonias y de células de Sertoli (Rodríguez et al. 1997). Nuestros datos obtenidos a partir de testículos del grupo control mostraron un aumento en la expresión de la caspasa-3 en 90 días de edad, lo que coincide con la aparición de una onda apoptótica masiva que normalmente ocurre en animales prepúberes descrita por ejemplo para el testículo de rata

(Jahnukainen et al. 2004). La apoptosis durante la primera onda espermatogénica está mediada por la activación de caspasa-3 y está correlacionada con la expresión de miembros de la familia de proteínas de Bcl-2 (Jahnukainen et al. 2004). Nuestros datos concuerdan con lo anteriormente mencionado, observándose la expresión de caspasa-3 y disminución de Bcl-2 en animales controles a los 90 días postnatales, que se correlacionan con el inicio de la primera onda espermatogénica.

Las células de Sertoli pueden soportar sólo un número limitado de células germinales, lo que incide como factor importante en la regulación de la muerte de las células germinales (Pentikäinen et al. 1999). Una vez que la activación de la caspasa-3 comienza, se define el destino de la célula y el proceso de muerte celular no puede ser revertido (Said et al. 2004) La inhibición de la apoptosis durante la primera onda de espermatogénesis en la etapa prepuberal se ha asociado con la acumulación de espermatogonias e infertilidad en la vida futura (Jahnukainen et al. 2004). Por lo tanto, la disminución observada en el presente estudio de la expresión de caspasa-3 en los testículos pre- y post-natales en animales tratados *in utero* con glucocorticoides sugiere que el desempeño reproductivo en el adulto probablemente se vea comprometido.

En cuanto a la expresión de una de las proteínas pro-apoptóticas se ha observado que la deficiencia de Bax en testículos adultos resultó en la acumulación de células germinales pre-meióticas en animales maduros, y la ausencia de espermatoцитos y espermatozoides maduros (Russell et al. 2002). Estudios previos han demostrado que la expresión de Bax desencadena una rápida apoptosis dependiente de caspasa, pero si la actividad de caspasa está inhibida se produce un proceso de muerte celular más lento (Finucane & Bossy-Wetzel 1999). En el presente estudio, la administración *in utero* de betametasona determinó un aumento en la inmunoexpresión de la proteína pro-apoptótica Bax en el período pre- y post-natal en los animales tratados con betametasona. Resta por dilucidar si este aumento en la expresión de Bax es suficiente para la promover la muerte celular o lo hace de forma más lenta dado que la caspasa-3 está disminuida a los 90 días postparto.

En cuanto a la proteína anti-apoptótica, Bcl-2, nuestros resultados mostraron una sobreexpresión en el testículo a los 132 días de gestación y a los 90 días postnatales en animales tratados con betametasona. Los miembros de la familia de oncogenes Bcl-2 y Bcl-xL, son capaces de inhibir o retrasar la liberación de citocromo c, impidiendo la muerte celular de manera significativa (Finucane & Bossy-Wetzel 1999). El aumento de la inmunoexpresión de Bcl-2 en los testículos de animales tratados con betametasona indica que la betametasona debería desempeñar un papel modulador en el bloqueo de la maquinaria de muerte celular en mamíferos, actuando en función del nivel de caspasa-3, en la gestación tardía y el período de pre-puberal, lo que sugiere una alteración de la futura espermatogénesis. De acuerdo con estudios anteriores (Russell et al. 2002), el desequilibrio entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas podría ser suficiente para perturbar el desarrollo normal de la espermatogénesis a futuro. El mecanismo anti-apoptótico de Bcl-2 incluye la formación de heterodímeros entre Bcl-2/Bcl-xL y Bax que podría interferir con la disponibilidad y la translocación de la proteína Bax del citoplasma a las mitocondrias. Mientras exista una competición *in vivo* entre Bax y Bcl-2, una única copia de gen Bax promueve la apoptosis en ausencia de Bcl-2. En contraste, la sobreexpresión de Bcl-2 impide la apoptosis aún en ausencia de Bax (Knudson & Korsmeyer 1997). Sin embargo, en el presente estudio se observó una sobreexpresión



de Bcl-2 con un aumento de la expresión de Bax, lo que hace cuestionar si la sobreexpresión de Bcl-2 es suficiente para impedir la apoptosis, tal como sugieren los estudios antes mencionados.

En lo que respecta a la proliferación celular en el parénquima testicular se encontró que en los animales tratados *in utero* con betametasona aumentó la expresión de PCNA durante el período pre-natal y disminuyó durante el período post-natal. El aumento prenatal de PCNA se asoció con un aumento de Bcl-2 y con el aumento en la expresión de Bax. En ovinos, hay dos períodos de intensa actividad mitótica de las células de Leydig y de Sertoli, uno antes del día 110 de gestación y el segundo después del nacimiento. La proliferación de gonocitos aumenta progresivamente a partir de la diferenciación sexual hasta el nacimiento (Hochereau-de Reviere et al. 1995). En el presente estudio los gonocitos en el testículo se organizaron en posición central en los cordones sexuales en la etapa fetal y durante el período perinatal (Desjardins 1978). Los gonocitos comienzan a formar espermatogonias alrededor de los 65 días postparto en el carnero donde alcanzan la posición periférica contra la lámina basal de los cordones sexuales (Schanbacher et al. 1974), coincidiendo con nuestros resultados donde a los 90 DG, se observaron en los animales controles espermatogonias en posición contra la región periférica del cordón basal. Los gonocitos continúan su actividad mitótica hasta el inicio de la espermatogénesis en el carnero (Sapsford 1964). Por consiguiente, el aumento de la expresión de PCNA en período pre-natal en células del testículos de los animales tratados con glucocorticoides probablemente refleja un aumento en la proliferación de gonocitos y en el período postnatal refleja un aumento en la proliferación de las células de Sertoli que se multiplican en ovinos hasta las 6-8 semanas de nacidos, así como también refleje la proliferación de espermatogonias (Hochereau-de Reviere et al. 1995). Las consecuencias de estos resultados sería la sobreproducción de espermatogonias y por lo tanto, con el tiempo, atrofia testicular e infertilidad, como se describe para la rata (Jahnukainen et al. 2004). La sobreproducción de células germinales necesita un mecanismo tal como la apoptosis de las células germinales que regule la capacidad de las células de Sertoli sustentaculares del epitelio seminífero (Said et al. 2004). El impedir este proceso de apoptosis fisiológica daña la capacidad de células de Sertoli, produciendo una alteración de la espermatogénesis normal (Rodriguez et al. 1997).

En el presente estudio, hemos demostrado que los glucocorticoides interfieren en el balance entre las enzimas que controlan o gatillan el proceso de apoptosis como son la caspasa-3, Bax, Bcl-2 y con implicancias en la espermatogénesis futura.

A pesar de que no es posible detallar a partir de la información recabada en el presente estudio en ovinos, si los resultados son extrapolables con relevancia directa en humanos, se hace necesario continuar con estudios que puedan responder esta cuestión. Asimismo dada la importancia de la exposición prenatal a glucocorticoides para la sobrevivencia del feto en humanos los resultados del presente estudio implican datos interesantes y significativos para poder comprender posibles problemas reproductivos en adultos. Es viable entonces considerar que, si se extrapola en humanos, los resultados obtenidos en el presente estudio, sería posible advertir a quienes reciban dicho tratamiento prenatal con betametasona, que el mismo puede determinar alteraciones testiculares en la vida postnatal en los hijos que hayan recibido el tratamiento prenatales con betametasona. La inquietud está planteada, por lo que corresponderá indicar sobre los posibles efectos de los glucocorticoides *in utero* sobre el testículo y el compromiso del futuro reproductivo de los niños.

En cuanto a la producción ovina en nuestro país, luego de una caída del stock ovino la tendencia es a mantener el stock, que sigue siendo una de las principales entradas de divisas al país (Ministerio de ganadería, agricultura y pesca 2012). Una de las razones importantes de caída del stock son las pérdidas en los primeros meses de vida con la mortandad de corderos. Si a esto le sumamos los factores estresantes que aumentan los niveles de glucocorticoides endógenos durante la gestación, generando un estrés fetal, es preocupante considerar que dichos factores puedan afectar el futuro de los corderos. Los futuros ovinos reproductores cuyas madres fueron sometidas a condiciones de estrés durante la gestación, puedan determinar a largo plazo influencias sobre el stock ovino del país.

Se hace pues necesario continuar las investigaciones en pos de encontrar posibles ventanas de programación en la reproducción ovina. Asimismo, se considera ineludible seguir estudiando los factores estresantes y los mecanismos subyacentes que actúen durante la preñez en ovinos en condiciones a campo en nuestro país, y evaluar sus consecuencias en las crías a largo plazo y su desarrollo y performance reproductiva.

## **J. CONCLUSIONES**

La administración de glucocorticoides *in utero* influye en el desarrollo testicular en el feto ovino y los efectos se mantienen en el desarrollo postnatal. La reducción en el crecimiento de los cordones sexuales y el retraso en el desarrollo de la luz central se mantiene en el desarrollo post-natal prepuberal. Esto probablemente retrasará el desarrollo de la función espermatogénica y el inicio de la espermatogénesis. Los cambios histológicos parecen estar dirigidos por cambios en los procesos intracelulares que controlan la proliferación celular y la muerte celular. Es factible que el tratamiento con glucocorticoides *in utero* afecte la fertilidad futura.

### **Perspectivas a futuro**

Este estudio permitió comprender la influencia de las hormonas glucocorticoides sobre la morfología y expresión de enzimas apoptóticas y de ciclo celular. Es de esperar que los resultados obtenidos de este estudio posibiliten nuevos estudios que evalúen las consecuencias de factores estresantes que eleven los corticoides endógenos y su repercusión en la morfología, expresión de enzimas apoptóticas y de ciclo celular que tengan como consecuencia alteraciones de la función normal del testículo en adultos postpúberes. Se plantea a futuro la realización de estudios a campo que involucren condiciones de estrés y medición de proteínas de shock térmico, así como de hormonas como los glucocorticoides en las madres gestantes y estudios morfológicos en testículos de las crías posteriormente en la vida adulta.

## **K. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. (2002). Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *The Journal of endocrinology* 174: 1–5.
- Abbott DH, Zhou R, Bird IM, Dumesic DA, Conley AJ. (2008). Fetal programming of adrenal androgen excess: lessons from a nonhuman primate model of polycystic ovary syndrome. *Endocrine Development* 13: 145–158.
- Alvarez L. (2008). Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. *Archivos De Zootecnia* 57: 39–59.
- Anyaegbunam WI, Adetona AB. (1997). Use of antenatal corticosteroids for fetal maturation in preterm infants. *American Family Physician* 56: 1093–1096.
- Arnaldi G, Angeli A, Atkinson B, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos G, Fava G, Findling J, Gaillard R, Grossman A, Kola B, Lacroix A, Mancini T, Mantero F, Newell-Price J, Nieman L, Sonino N, Vance M, Giustina A, Boscaro M. (2003). Diagnosis and Complications of Cushing's Syndrome: A Consensus Statement. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88: 5593–5602.
- Barker DJP. (2004). Developmental origins of adult health and disease. *Journal of Epidemiology & Community Health* 58: 114–115.
- Barker DJP. (2007). The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine*: 412–417.
- Barnes P. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science* 94: 557–572.
- Barnes P. (2006). Corticosteroid effects on cell signalling. *European Respiratory Journal* 27: 413–426.
- Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. (1993). Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *The Lancet* 341: 339–341.
- Berensztejn E, Sciara M, Rivarola M, Belgorosky A. (2002). Apoptosis and proliferation of human testicular somatic and germ cells during prepuberty: high rate of testicular growth in newborns mediated by decreased apoptosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 5113–5118.
- Bertram CE, Hanson MA. (2002). Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. *Reproduction* 124: 459–467.
- Biagini G, Merlo Pich E, Frasoldati A, Agnati LF, Marrama P. (1995). Changes in glucocorticoid receptor immunoreactivity after adrenalectomy and corticosterone treatment in the rat testis. *Journal of Endocrinological Investigation* 18: 384–390.
- Bishop EH. (1981). Acceleration of fetal pulmonary maturity. *Obstetrics and gynecology* 58: 48S–51S.
- Chrousos G, Kino T. (2005). Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Science Signaling* 2: 1–6.
- Clermont Y, Huckins C. (1961). Microscopy anatomy of the sex cords and seminiferous tubules in growing and adult male albino rats. *American Journal of Anatomy* 107: 79–97.
- Courot M. (1962). Développement du testicule chez l'agneau. Établissement de la spermatogenèse. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 2: 25–41.

- Davies M, Norman R. (2002). Programming and reproductive functioning. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13: 386–392.
- Desjardins C. (1978). Endocrine regulation of reproductive development and function in the male. *Journal of Animal Science* 47: 56–79.
- Dodic M. (2002). Programming Effects of Short Prenatal Exposure to Dexamethasone in Sheep. *Hypertension* 40: 729–734.
- Drake A, Tang J, Nyirenda M. (2007). Mechanisms underlying the role of glucocorticoids in the early life programming of adult disease. *Clinical science* 232: 219–232.
- Drake AJ, Walker BR, Seckl JR. (2005). Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. *the American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288: R34–8.
- Earnshaw W, Martins L, Kaufmann S. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochem* 68: 383–424.
- Findling JW, Raff H. (2006). CLINICAL REVIEW: Cushing’s Syndrome: Important Issues in Diagnosis and Management. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91: 3746–3753.
- Finucane D, Bossy-Wetzel E. (1999). Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *Journal of Biological Chemistry* 274: 2225–2233.
- Fowden A, Forhead A. (2004). Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* 127: 515–526.
- Fowden A, Forhead A. (2009). Hormones as epigenetic signals in developmental programming. *Experimental Physiology* 94: 607–625.
- Furuchi T, Masuko K, Nishimune Y, Obinata M, Matsui Y. (1996). Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development* 122: 1703–1709.
- Gao H, Tong M, Hu Y, You H. (2003). Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*... 199: 153–163.
- Gilstrap LC, Christensen R, Clewell WH, D’Alton ME, Davidson EC, Escobedo MB, Gjerdingen DK, Goddard-Finegold J, Goldenberg RL, Grimes DA. (1994). Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. In: *Nih Consensus Statement*, pp. 1–24.
- Grunewald S, Sharma R. (2009). Impact of caspase activation in human spermatozoa. *Microscopy Research and Technique* 72: 878–888.
- Gupta BBP, Lalchandama K. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid action. *Current* 83: 1103–1111.
- Haider SG. (2007). Leydig Cell Steroidogenesis: Unmasking the Functional Importance of Mitochondria. *Endocrinology* 148: 2581–2582.
- Hanson M. (2002). Birth Weight and the Fetal Origins of Adult Disease. *Pediatric Research* 52: 473–474.

- Hardy MP, Gao H-B, Dong Q, Ge R, Wang Q, Chai WR, Feng X, Sottas C. (2005). Stress hormone and male reproductive function. *Cell and Tissue Research* 322: 147–153.
- Hardy MP, Sottas CM, Ge R, Mckittrick CR, Tamashiro KL, McEwen BS, Haider SG, Markham CM, Blanchard RJ, Blanchard DC, Sakai RR. (2002). Trends of Reproductive Hormones in Male Rats During Psychosocial Stress: Role of Glucocorticoid Metabolism in Behavioral Dominance 1. *Biology of Reproduction* 1755: 1750–1755.
- Heitzer M, Wolf I, Sanchez E. (2007). Glucocorticoid receptor physiology. *Reviews in endocrine metabolic disorders* 8: 321–330.
- Herr I, Büchler MW, Mattern J. (2009). Glucocorticoid-Mediated Apoptosis Resistance of Solid Tumors. : 1–28.
- Herr I, Gassler N, Friess H, Büchler M. (2007). Regulation of differential pro-and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis* 12: 271–291.
- Herrera-Alarcón J, Villagómez-Amezcuca E, González-Padilla E, Jiménez-Severiano H. (2007). Stereological study of postnatal testicular development in Blackbelly sheep. *Theriogenology* 68: 582–591.
- Hochereau-de Reviers M, Courot M. (1971). Sertoli cells and development of seminiferous epithelium. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 18: 573–583.
- Hochereau-de Reviers M, Monet-Kuntz C, Courot M. (1987). Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *Journal Of Reproduction And Fertility Supplement* 34: 101–114.
- Hochereau-de Reviers M, Perreau C, Pisselet C, Locatelli A, Bosc M. (1995). Ontogenesis of somatic and germ cells in sheep fetal testis. *Journal of Reproduction and Fertility* 103: 41–46.
- Ikegami M, Jobe A, Newnham J, Polk D, Willet K, Sly P. (1997). Repetitive prenatal glucocorticoids improve lung function and decrease growth in preterm lambs. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 156: 178–184.
- Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S, So O. (2004). Increased Apoptosis Occurring During the First Wave of Spermatogenesis Is Stage-Specific and Primarily Affects Midpachytene Spermatocytes in the Rat Testis 1 Morphological Characterization of Vital Cell Preparations. *Biology of Reproduction* 70: 290–296.
- Jobe A, Moss T, Nitsos I. (2007). Betamethasone for lung maturation: testing dose and formulation in fetal sheep. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 197: 1–11.
- Kerr JB, Loveland KL, O'Bryan M, Krester DM De. (2006). Cytology of the testis. In: Elsevier (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. vol.1., J.D. Neil, Knobil, T. M. Plant, St Louis: Elsev, pp. 827– 947.
- Kim J, Ghosh S, Weil A, Zirkin B. (2001). Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 142: 3809–3816.
- King KL, Cidlowski JA. (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual Review of Physiology* 60: 601–617.

- Knudson CM, Korsmeyer SJ. (1997). Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nature Genetics* 16: 358 – 363.
- Liggins GC, Howie RN. (1972). A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 50: 515–525.
- Longui C. (2007). Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. *Jornal de Pediatria* 83: S 163–171.
- Lucas A. (1998). Programming by early nutrition: an experimental approach. *The Journal of nutrition*: 401–406.
- Mackay S. (2000). Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *International Review Of Cytology* 200: 47–99.
- Medh RD, Thompson EB. (2000). Hormonal regulation of physiological cell turnover and apoptosis. *Cell and Tissue Research* 301: 101–124.
- Miller W. (2001). The adrenal cortex and its disorders. *Clinical pediatric endocrinology*: 1–68.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, República Oriental del Uruguay. (2012). *Anuario Estadístico Agropecuario 2012*.
- Moberg GP. (1991). How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *Journal of Dairy Science* 74: 304–311.
- Moutsatsou P, Papavassiliou AG. (2007). Breast Carcinoma: The glucocorticoid receptor signalling in breast cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12: 145–163.
- Moutsatsou P, Papavassiliou A. (2008). The glucocorticoid receptor signalling in breast cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12: 145–163.
- Nagano R, Tabata S, Nakanishi Y, Ohsako S, Kurohmaru M. (2000). Reproliferation and relocation of mouse male germ gells (Gonocytes) during prespermatogenesis. *The Anatomical Record* 258: 210–220.
- Newton R. (2000). Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 55: 603–613.
- NIH. (1995). Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. NIH Consensus Development Panel on the Effect of Corticosteroids for Fetal Maturation on Perinatal Outcomes. In: *JAMA The Journal Of The American Medical Association*, pp. 413–418.
- Nyirenda M, Lindsay R. (1998). Glucocorticoid Exposure in Late Gestation Permanently Programs Rat Hepatic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase and Glucocorticoid Receptor Expression and Causes Glucose Intolerance in Adult Offspring. *Journal of Clinical Investigation* 101: 2174–2181.
- O'Regan D, Kenyon C. (2004). Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 287: 863–870.
- O'Shaughnessy PJ, Fowler P. (2011). Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction* 141: 37–46.

- Orr TE, Mann DR. (1992). Role of glucocorticoids in the stress-induced suppression of testicular steroidogenesis in adult male rats. *Hormones and Behavior* 26: 350–363.
- Ortega H, Salvetti N. (2007). Intraovarian localization of growth factors in induced cystic ovaries in rats. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 102: 94–102.
- Paul C, Rhind SM, Kyle CE, Scott H, McKinnell C, Sharpe RM. (2005). Cellular and Hormonal Disruption of Fetal Testis Development in Sheep Reared on Pasture Treated with Sewage Sludge. *Environmental Health Perspectives* 113: 1580–1587.
- Pedrana G, Sloboda DM, Pérez W, Newnham JP, Bielli A, Martin GB. (2008). Effects of pre-natal glucocorticoids on testicular development in sheep. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 37: 352–358.
- Pentikäinen V, Erkkilä K, Dunkel L. (1999). Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *American Journal of Physiology* 276: E310–E316.
- Phillips D. (2001). Fetal growth and programming of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 28: 967–970.
- Print CG, Loveland KL. (2000). Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. : 423–430.
- Purchas R. (1973). The response of circulating cortisol levels in sheep to various stresses and to reserpine administration. *Australian Journal of Biological Sciences* 26: 477–489.
- Recabarren SE, Rojas-García PP, Recabarren MP, Alfaro VH, Smith R, Padmanabhan V, Sir-Petermann T. (2008). Prenatal testosterone excess reduces sperm count and motility. *Endocrinology* 149: 6444–6448.
- Rhind SM, Rae MT, Brooks AN, Bioscience I, Park A 2001. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis\*. *Reproduction* 122: 205–214.
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The EMBO journal* 16: 2262–2270.
- Rooij DG de, Russell LD (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of andrology* 21: 776–798.
- Ross M, Pawlina W (2007). *Histología. Texto y Atlas color con Biología celular y Molecular*. Editorial Panamericana, Buenos Aires, pp 974.
- Ruifrok A, Johnston D. (2001). Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology* 23: 291–299.
- Russell LD, Chiarini-garcia H, Korsmeyer SJ, Knudson CM. (2002). Bax-Dependent Spermatogonia Apoptosis Is Required for Testicular Development. *Biology of Reproduction* 66: 950–958.
- Said T, Paasch U, Glander H, Agarwal A. (2004). Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction Update* 10: 39–51.



- Sakamaki K, Satou K. (2009). Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of Fish Biology* 74: 727–753.
- Salveti NR, Ortega HH, Veiga-Lopez A, Padmanabhan V. (2012). Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess on ovarian cell proliferation and apoptotic factors in sheep. *Biology of Reproduction* 87: 22, 1–10.
- Sapolsky R, Romero L, Munck A. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews* 21: 55–89.
- Sapsford C. (1964). Changes in the size of germ cell nuclei during the development of the testis of the ram and rat. *Australian Journal of Zoology* 12: 127–149.
- Sasagawa I, Yazawa H, Suzuki Y, Nakada T 2001. Stress and testicular germ cell apoptosis. *Archives of Andrology* 47: 211–216.
- Schanbacher B, Gomes W, VanDemark N 1974. Developmental changes in spermatogenesis, testicular carnitine acetyltransferase activity and serum testosterone in the ram. *Journal of animal Science* 39: 889–892.
- Schultz R, Isola J, Parvinen M, Honkaniemi J, Wikström AC, Gustafsson JA, Pelto-Huikko M. (1993). Localization of the glucocorticoid receptor in testis and accessory sexual organs of male rat. *Molecular and Cellular Endocrinology* 95: 115–120.
- Schwartz J, Morrison JL. (2005). Impact and mechanisms of fetal physiological programming. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288: R11–5.
- Scott H, Mason J, Sharpe R. (2009). Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocrine reviews* 30: 883–925.
- Seckl JR, Holmes MC. (2007). Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal “programming” of adult pathophysiology. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism* 3: 479–488.
- Shaha C, Tripathi R, Mishra D. (2010). Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical transactions of the Royal Society of Biological Science* 365: 1501–1515.
- Sloboda DM, Moss TJ, Gurrin LC, Newnham JP. (2002). The effect of prenatal betamethasone administration on postnatal ovine hypothalamic – pituitary – adrenal function. *Journal of Endocrinology* 172: 71–81.
- Sofikitis N, Pappas E. (2005). Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Human Reproduction Update* 11: 229–259.
- Squires E. (2006). *Endocrinología animal aplicada*. Zaragoza.
- Stojanoski MM, Nestorović N, Negić N, Filipović B, Sosić-Jurjević B, Milosević V, Sekulić M. (2006). The pituitary-adrenal axis of fetal rats after maternal dexamethasone treatment. *Anatomy and Embryology* 211: 61–69.
- Szitanyi P, Janda J, Poledne R. (2003). Intrauterine undernutrition and programming as a new risk of cardiovascular disease in later life. *Physiological research* 52: 389–395.

- Tangalakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM. (1992). Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Experimental Physiology* 77: 709–717.
- Tesarik J, Ubaldi F, Rienzi L, Martinez F, Iacobelli M, Mendoza C, Greco E. (2004). Caspase-dependent and -independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis. *Human Reproduction* 19: 254–261.
- 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. *Anatomy and Embryology* 211: 273–282.
- Wang R, Nakane PK, Koji T. (1998). Autonomous Cell Death of Mouse Male Germ Cells during Fetal and Postnatal Period. *Biology of Reproduction* 58: 1250–1256.
- Ward IL, Weisz J. (1980). Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science* 207: 328–329.
- Yamamoto CM, Hikim AP, Lue Y, Portugal AM, Guo TB, Hsu SY, Salameh WA, Wang C, Hsueh AJ, Swerdloff RS. (2001). Impairment of spermatogenesis in transgenic mice with selective overexpression of Bcl-2 in the somatic cells of the testis. *Journal of Andrology* 22: 981–991.
- Yazawa H, Sasagawa I. (2000). Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. *Human Reproduction* 15: 1917–1920.
- Yazawa H, Sasagawa I, Nakada T. (2000). Acute effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on testicular germ cell apoptosis and vascular neutrophil adhesion in rats. *Archives of Andrology* 44: 167–172.
- Yazawa H, Sasagawa I, Suzuki Y, Nakada T. (2001). Glucocorticoid hormone can suppress apoptosis of rat testicular germ cells induced by testicular ischemia. *Fertility and Sterility* 75: 980–985.

## Reproduction in Domestic Animals

Reprod Dom Anim doi: 10.1111/rda.12164  
ISSN 0936-6768

### Apoptosis-Related Protein Expression During Pre- and Post-Natal Testicular Development After Administration of Glucocorticoid *in utero* in the Sheep

G Pedrana<sup>1</sup>, MH Viotti<sup>1</sup>, E Souza<sup>1</sup>, D Sloboda<sup>2</sup>, GB Martin<sup>3</sup>, D Cavestany<sup>1</sup> and HH Ortega<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; <sup>2</sup>McMaster University, Hamilton, ON, Canada; <sup>3</sup>UWA Institute of Agriculture M085, The University of Western Australia, Crawley, W.A, Australia; <sup>4</sup>Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe, Argentina

#### Contents

Pre-natal glucocorticoids are used in women at risk of preterm delivery to induce foetal lung maturation. However, glucocorticoids can produce negative outcomes for other tissues such as the reproductive system. We therefore tested the effects of pre-natal betamethasone on testicular morphology and apoptotic protein immune expression during pre- and post-natal development. Pregnant ewes ( $n = 42$ ) bearing singleton male foetuses were randomly allocated to receive intramuscular injections of saline or betamethasone (0.5 mg/kg) at 104, 111 and 118 days of gestation (DG). Testes were collected at 121 and 132 DG, and at 45 and 90 post-natal days (PD) and subjected to morphometric analysis (volume densities of sex cords and interstitial tissues; sex cord diameter). Immunohistochemistry (% stained area) was used to assess active caspase-3, Bax, Bcl-2 and cell-cycle proteins (PCNA). Compared with control values, betamethasone treatment decreased sex cord diameter at 121 DG, 45 and 90 PD, and sex cord volume at 90 PD. Active caspase-3 was decreased by betamethasone at 121 DG and 90 PD, but Bax was increased in all betamethasone groups. Bcl-2 and PCNA decreased in the betamethasone groups at 121 DG and 45 PD, but increased at 132 DG and 90 PD. We conclude that high levels of pre-natally administered glucocorticoid reduce foetal testicular development, perhaps via changes in the balance

On the other hand, pre-natal glucocorticoid administration can be highly beneficial and is commonly used in pregnant women at risk of preterm delivery to enhance survival of the offspring (Bishop 1981) by improving foetal lung maturation (Liggins and Howie 1972; Ikegami et al. 1997). However, *in utero* glucocorticoids in animals and humans can also reduce birth weight (Ikegami et al. 1997) and increase predisposition to cardiovascular and metabolic diseases (Tangalakis et al. 1992; Nyirenda et al. 1998; Fowden et al. 2006). In addition, glucocorticoids regulate the balance between mitosis and apoptosis and can therefore affect the total cell number in developing tissues and organs (King and Cidlowski 1998).

Pre-natal maternal stress can also contribute to sexual dysfunction and infertility (Phillips and Lakshmi 1989; Moberg 1991), perhaps mediated by a decrease in blood testosterone in male foetuses (Ward 1994) induced by high concentrations of glucocorticoids (Sapolsky et al. 2000; Yazawa et al. 2001; Piffer et al. 2009), with potential consequences for future spermatogenesis. In the sheep, the foetal, post-natal and pre-pubertal testis comprise mostly interstitial tissue including the *endo-*