



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

EFFECTOS DE LA RESTRICCIÓN PROTEÍICA EN LA RATA DURANTE
LA GESTACIÓN Y/O LACTANCIA SOBRE EL DESARROLLO
TESTICULAR DEL NEONATO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JOSÉ SERGIO MILLÁN CANALES



MÉXICO, D. F. A 26 DE JUNIO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: CARMEN GIRAL BARNES

VOCAL: Profesor: ENRIQUE MORENO SÁENZ

SECRETARIO: Profesora: ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: JOSÉ IGNACIO PARAMO RAMÍREZ

2° SUPLENTE: Profesor: GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DEL
“INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

ASESORA DE TESIS

SUSTENTANTE

DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

JOSÉ SERGIO MILLÁN CANALES

A la Dra. Elena Zambrano, por alentarme a cerrar un ciclo en mi vida, por toda su paciencia, por ser el ejemplo constante de superación profesional y por comprenderme en las situaciones difíciles que se me presentaron, siempre estaré infinitamente agradecido porque sin su ayuda otras personas en mi situación hubieran desertado.

A la Q. F. B. Guadalupe Leticia Rodríguez, por su valiosa enseñanza y por toda su paciencia, por ser la mejor amiga que se puede tener, por hacer tan agradable mi estancia en este proyecto y por el sin fin de risas combinadas con arduas horas de trabajo.

Al Bioquímico Luis Antonio Reyes, por todo su apoyo, por ser un buen compañero de trabajo y sobre todo por ser un buen amigo.

A todos mis amigos y compañeros que han estado conmigo y que hicieron bastante agradable mi estancia en la facultad de Química.

A todo el Equipo de trabajo del Depto. de Biología de la Reproducción, que en todo momento me brindaron su apoyo y extendieron su mano para ayudarme en este proyecto.

A mi mamá

Por darme tanto amor, por ser la guía perfecta de la familia, por ser el ejemplo de una persona trabajadora que dio todo por el simple hecho de hacer que sus dos hijos fueran personas profesionales. Jamás olvidare aquella pregunta que un día me hicieron y decía así ¿qué fue lo que te inspiro a terminar? Mi respuesta fue rápida y precisa, mi inspiración fue ver el esfuerzo de mis padres y en especial el de mi madre, por eso este título es tuyo Q. F. B. Fidela Canales Baños.

A mi papá

No hay palabras para describir el cariño y ejemplo que he recibido de ti, jamás se me va olvidar que diste todo durante cuatro años en los que ni siquiera estrenaste un atuendo nuevo, porque era mas grande tu ilusión de ver culminada una etapa en mi vida que la necesidad propia, por eso este título es tuyo Q. F. B. Candelario Millán Vázquez.

A mi hermano Lic. Lully Millán Canales

Por todas las risas compartidas por ser el mejor amigo en mi vida, por todos los ejemplos, por haber tenido la fortuna de compartir toda nuestra infancia y desmanes, pero sobre todo por hacerme sentir tan orgulloso de ti.

A mi querida esposa Juanita

Llegaste a mi vida desde que era un niño y desde que te vi por primera vez supe que te iba amar por el resto de la vida, gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, gracias por quererme tanto, por darme todo tu apoyo y gracias por darme el mas grande tesoro de mi vida, mi pequeño Sergio. Te amo.

A mi pequeño Sergio Eduardo

Llegaste de una manera imprevista en nuestras vidas, pero las cosas grandes suelen llegar así, cambiaste mi vida de una manera inimaginable, me hiciste crecer muchísimo y en tan poco tiempo, ya son tú y tu mamá los dueños de mi vida. Mi pequeño,

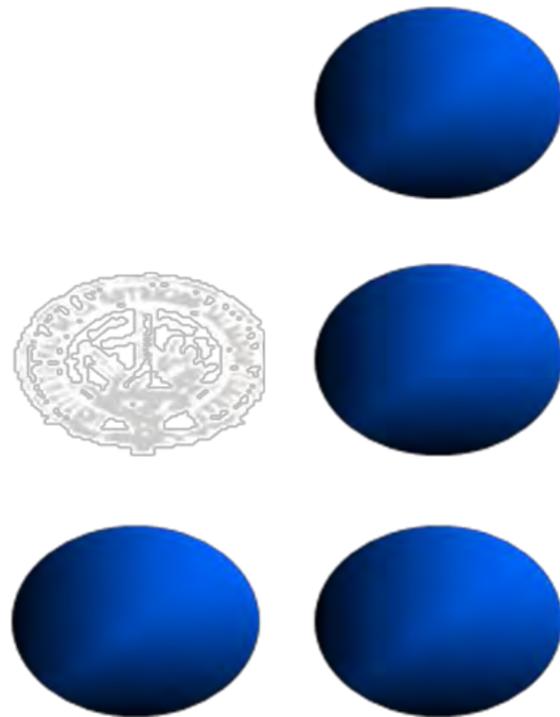
este es el mejor ejemplo que te puedo dar, porque es el mismo que mis padres me dieron a mi, te quiero.

A mi cuñada Mode

Gracias por estar con mi hermano, que a de ser tan fácil para ti, porque hacen muy bonita pareja, te pido que lo comprendas y que lo alientes a cumplir todos sus sueños y te doy las gracias por haber decidido pertenecer a nuestra familia.

A mi abuelita

Por cuidarme, por ser un ejemplo de persona, por mantener siempre unida a la familia y por todos sus consejos que me han ayudado a ser una persona de bien.



INCMNSZ

Este trabajo se realizó en el departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, bajo la asesoría de la Dra. Elena Zambrano González, con apoyo de CONACyT- BRE10507101 y con la ayuda del programa CNBES con folio No. 20080052806.

Índice

Índice	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	4
1. Diferenciación y desarrollo sexual	5
2. Hipotálamo e hipófisis	6
3. Generalidades del eje reproductivo masculino	8
4. Célula de Sertoli	9
5. Barrera hematotesticular	11
6. Esteroidogénesis	12
7. Espermatogénesis	13
8. Programación del desarrollo	14
9. Programación del desarrollo en el eje reproductivo masculino	15
III. Justificación	17
IV. Hipótesis	19
V. Objetivos	21
VI. Materiales y Métodos	23
1. Modelo biológico	24
2. Dietas experimentales isocalóricas	25
3. Grupos experimentales	26
4. Manejo de la madre durante la gestación y la lactancia	27
5. Nacimiento de las crías	27
6. Sacrificio de las crías	27
7. Marcadores bioquímicos	
• Análisis de las concentraciones séricas de FSH por RIA	28
• Análisis de las concentraciones séricas de Testosterona por RIA	28
8. Marcadores moleculares	
• Extracción de RNA	28
• Obtención de DNA complementario	29
• Reacción en cadena de polimerasa	30

• Electroforesis	31
• Obtención de sondas específicas marcadas con digoxigenina	32
• Southern Blot	32
9. Estudios histológicos	33
10. Resumen de los experimentos realizados durante la etapa neonatal	34
11. Análisis estadístico	34
VII. Resultados	35
1. Parámetros morfométricos de las crías macho al nacimiento	36
2. Curva de crecimiento de las crías macho hasta el destete	36
3. Peso de testículos a distintas edades	37
4. Marcadores bioquímicos	
• Concentración de FSH en suero de crías macho de 14 días de edad	39
• Concentración de testosterona en suero de crías macho de 14 días de edad.	40
5. Marcadores moleculares	
• Expresión relativa de los receptores de FSH y LH, a 7 días de edad	41
• Expresión relativa de los receptores de FSH y LH, a 14 días de edad	42
6. Apertura de luz tubular	43
VIII. Discusión	45
IX. Conclusiones	50
X. Bibliografía	52

I.

Resumen

Resumen

La programación del desarrollo es un término que define los procesos mediante las cuales, condiciones que pueden ser o no adversas, durante periodos críticos (vida fetal o postnatal), incrementan la susceptibilidad a padecer enfermedades en vida adulta.

Esté termino actualmente se conoce como la hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad.

Los periodos críticos durante el desarrollo pueden ser la gestación y/o lactancia donde se va a presentar mayor vulnerabilidad a condiciones subóptimas, para la constante división celular típica de estos estadios del desarrollo. El efecto y el tiempo de exposición a estas condiciones varían de un órgano a otro. Dichas condiciones pueden ser: exposición alta o baja de hormonas o de nutrientes, exposición a nicotina o alcohol, o condiciones anormales físicas en la madre durante la gestación como la presión arterial alta.

Los estudios retrospectivos en humanos correlacionan el bajo peso al nacimiento con enfermedades en vida adulta típicas del Síndrome Metabólico, también se han realizado estudios en ratas preñadas las cuales fueron restringidas proteínicamente durante la gestación y/o lactancia, encontrándose en las crías macho retraso en los marcadores de desarrollo sexual tales como; descenso de testículos y retracción del prepucio, también se encontró disminución en los valores séricos de LH y testosterona en etapas adultas lo que llevó a menor cuenta espermática que fue un factor determinante que condujo a un envejecimiento prematuro de la fertilidad. Sin embargo, los cambios fisiológicos, celulares y moleculares ya deben de estar programados desde etapas tempranas del desarrollo.

Es por eso que el objetivo del presente trabajo es determinar en etapas neonatales algunos marcadores celulares y moleculares por los cuales la restricción nutricional materna durante la gestación y lactancia retrasa el de desarrollo sexual y conduce a un envejecimiento prematuro de la capacidad reproductiva de las crías macho en la vida adulta.

Para lo cual se trabajó con ratas Wistar preñadas de 10 a 12 semanas de edad con peso aproximado de 240g las cuales fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dietas isocalóricas, dieta C (control, caseína 20%) o dieta R (restringida, caseína 10%). Al

nacimiento se ajustó la camada a 10 crías. Se tuvieron cuatro grupos experimentales: control en la gestación y en la lactancia (CC), restringido en ambos periodos (RR), restringido en la lactancia (CR) o en la gestación (RC). El empleo de este modelo permitió observar una gran variedad de efectos debido a la restricción proteínica sobre el desarrollo sexual neonatal de las crías macho.

Al nacimiento se determinaron parámetros morfométricos de las crías macho, posteriormente se sacrificaron a distintas edades (15, 16 y 17 días) por medio de decapitación utilizando una guillotina. En sangre se determinó la concentración de FSH y de testosterona a los 14 días de edad. También se extrajeron y se pesaron los testículos. El testículo derecho se utilizó para estudiar la expresión de los receptores de FSH y LH; y el testículo izquierdo se utilizó para estudiar por medio de histología la apertura de luz tubular testicular.

Los resultados demuestran que las crías macho al nacimiento provenientes de madres restringidas proteínicamente tienen mayor relación cefálico-abdominal lo que nos indica que la desnutrición es moderada donde los nutrientes favorecen el crecimiento del cerebro y no de otros órganos como el testículo, ya que presenta menor peso al día del sacrificio con respecto al grupo control.

Los resultados encontrados en los valores séricos de FSH y testosterona no son significativos, sin embargo para la expresión de los receptores de FSH y LH a los 7 y 14 días de edad en el grupo RC si lo son, observándose aumentada la expresión y la aparición de la luz tubular testicular se retrasó en todos los grupos restringidos y en todas las edades.

Se sabe que la proliferación de la célula de Sertoli se lleva a cabo en edades neonatales y que en el proceso de maduración de estas células migran a la periferia del túbulo testicular para permitir el paso de la luz. Si este proceso no ocurre en tiempo y forma adecuados las células mueren. Esto explica en gran medida que el tamaño de los testículos sea menor en los grupos restringidos.

En concreto la restricción proteínica materna durante la gestación y/o lactancia repercute en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-testículo desde etapas neonatales en las crías macho retrasando el desarrollo testicular.

II.

Introducción

1. Diferenciación y desarrollo sexual.

Los cromosomas sexuales se separan por división meiótica, es por eso que los espermatozoides contienen un cromosoma X o Y. En contraste lo óvulos sólo pueden tener un cromosoma X. Cuando un óvulo es fertilizado por un espermatozoide que transporta el cromosoma X, el cigoto XX resultante se convertirá en hembra. En forma alternativa, cuando el espermatozoide fertilizante contiene un cromosoma Y, la combinación XY asegurará el desarrollo de un macho^{1,2}.

Sin embargo en la actualidad se sabe que sólo en una pequeña parte del cromosoma Y se encuentra el gen llamado *SRY* (*Región del Y que determina el sexo*) que permite la diferenciación testicular¹⁷.

En condiciones normales el individuo XY, tiene sólo un alelo del gen *SRY* y sólo un alelo del gen *DAX1* (factor represor testicular) cuyo gen se encuentra en el cromosoma X, en estas condiciones *SRY* es predominante y permite la diferenciación testicular con la expresión de genes típicamente testiculares como *SOX9* y *AMH* (hormona antimuleriana)^{18,19}.

Durante las seis primeras semanas de vida fetal en el humano y durante los primeros siete días de vida fetal en la rata, la gónada primitiva se halla en ambos sexos y se encuentra conectada con el riñón primitivo. En ausencia de los genes testiculares, la gónada se convierte en ovario, mientras que la diferenciación testicular ocurre en presencia de dichos genes^{6,4}.

Los testículos fetales están organizados como agregados de células germinales y de células de Sertoli, mientras que las células de Leydig se hallan en el área intersticial.

Aunque el sexo gonadal está determinado por genes en el cromosoma Y, el desarrollo del sexo genital depende de hormonas secretadas por las gónadas en desarrollo. En general los órganos genitales femeninos se desarrollan en forma espontánea, mientras que la secreción de diversas hormonas masculinas secretadas por los testículos fetales es responsable del desarrollo de las estructuras genitales masculinas¹⁷.

Dos grupos de conductos son responsables del desarrollo de los tractos reproductores y están presentes hasta la séptima semana de vida en el humano y en la rata hasta el octavo día. El conducto de Müller da origen a las estructuras femeninas, mientras que las masculinas se derivan del conducto de Wolff. En el macho, la regresión del conducto de Müller tiene lugar bajo la influencia de la hormona antimuleriana, secretada por las células de Sertoli fetales²⁰.

Por otro lado las células de Leydig producen andrógenos, responsables de la estabilización de los conductos de Wolff y de su diferenciación en epidídimo, conducto deferente y vesículas seminales, así como de la masculinización del seno urogenital y de

los genitales externos. La diferenciación de las células de Leydig, su proliferación y su actividad estereoidogénica dependen del estímulo gonadotrófico proporcionado por la gonadotrofina coriónica humana (hCG) placentaria en los primeros seis meses de vida intrauterina en el humano y para la rata en los primeros 14 días fetales, después de este periodo estos procesos dependen de la hormona leuteinizante (LH) hipofisaria. Tanto la hCG como la LH se unen a un mismo receptor de membrana presente en las células de Leydig, responsables de traducir la señal (Figura 1).

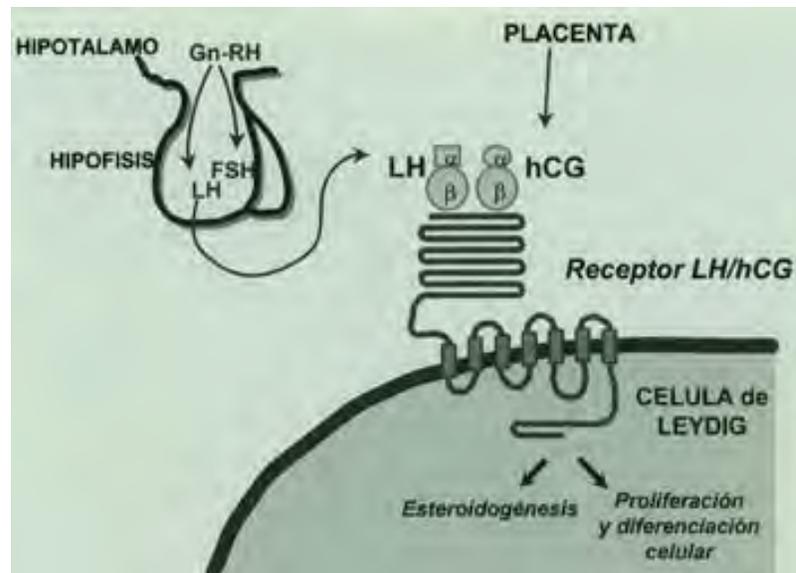


Figura 1. Regulación hormonal de la diferenciación, proliferación y producción de esteroides en la célula de Leydig.

2. Hipotálamo e Hipófisis

El eje hipotálamo-hipófisis-testículo desempeña un papel muy importante en el desarrollo y diferenciación sexual.

En distintos mamíferos como el humano y los roedores la hipófisis se divide en dos partes: hipófisis anterior (adenohipófisis) e hipófisis posterior (neurohipófisis)¹⁷. Estos dos lóbulos presentan actividades autocrinas y paracrinas inmediatamente después de la diferenciación de estas dos áreas de la hipófisis. Ambas estructuras rudimentarias son evidentes en el humano después de la cuarta semana de vida fetal, mientras que en la rata ocurre alrededor del día noveno de vida fetal¹⁷, es por eso que el sistema hipotálamo-hipófisis desde muy temprana edad en vida fetal es capaz de tener función endocrina¹⁷.

La secreción de hormonas comienza en el hipotálamo ubicado en el cerebro, abajo del tálamo, donde las neuronas Gonadotropinérgicas del área preóptica medial hipotalámica sintetizan la hormona liberadora de gonadotropinas (*GnRH= gonodotropin releasing hormone*) de 10 aminoácidos¹, que es transportada por la porta hipotálamo-hipofisaria hacia la hipófisis anterior, esto ocurre alrededor de la quinta semana en el humano y en la rata alrededor del noveno día de vida fetal¹⁷.

La hipófisis anterior secreta inmediatamente después dos hormonas muy importantes para el eje reproductivo masculino como son: la hormona leuteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Estas hormonas son liberadas a circulación periférica con el fin de alcanzar su órgano blanco en la gónada¹.

El eje hipotálamo-hipófisis-testículo se encuentra regulado por asas de retroalimentación negativa (Figura 2)².

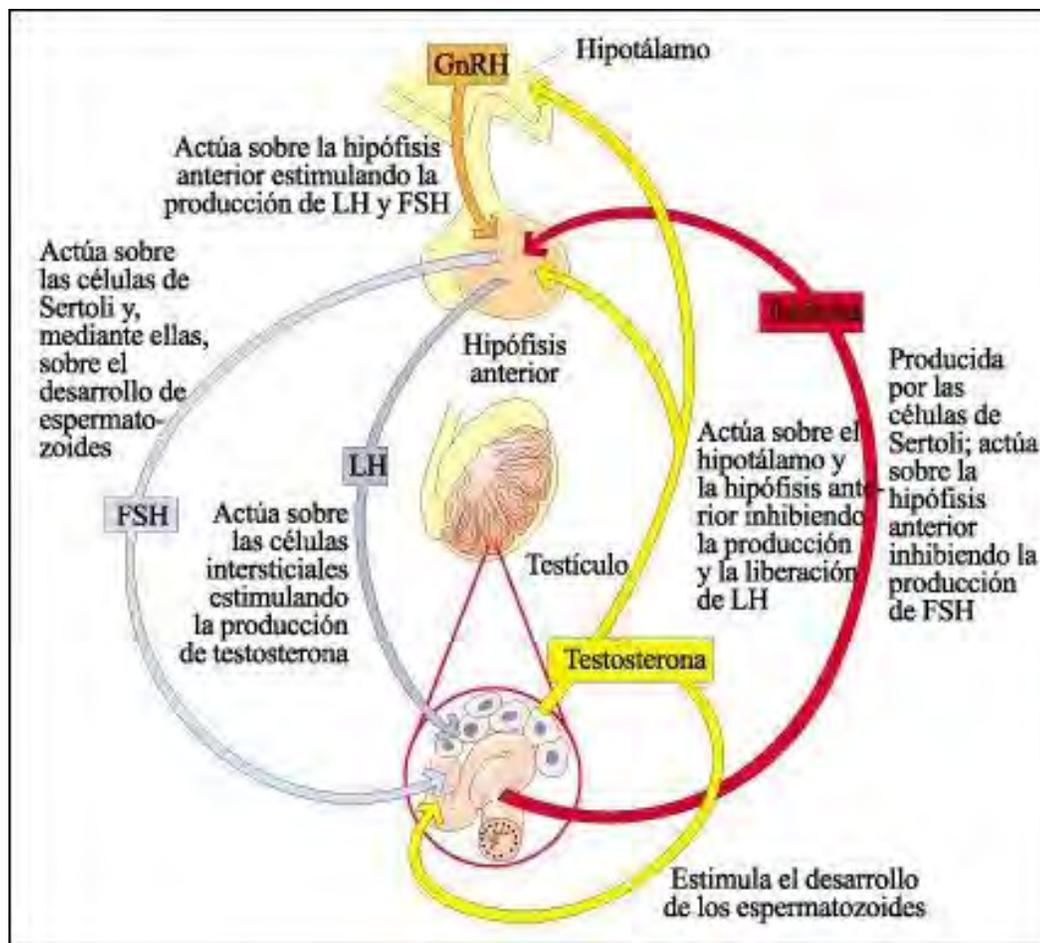


Figura 2. Eje hipotálamo hipófisis testículo¹⁷.

3. Generalidades del Eje reproductivo masculino

Los testículos son pequeñas glándulas ovoides situadas en una estructura a manera de bolsa y revestida de piel llamada escroto. Cada testículo está cubierto por una capa fibrosa blanca que se divide en lóbulos y cada lóbulo está compuesto por uno a tres tubos seminales o seminíferos diminutos y enrollados. Los túbulos seminíferos drenan en ambos extremos en una red filamentos a partir de la cual los conductos eferentes la vacían en el epidídimo. El epidídimo, adyacente al testículo, consiste en una cabeza, un cuerpo y una cola y está conectado con el conducto deferente (Figura 3)⁴.

Las principales funciones del epidídimo son la maduración y almacenamiento de los espermatozoides. Cuando los espermatozoides llegan a la cabeza del epidídimo no son móviles y a medida que éstos viajan a través del cuerpo hasta la cola del epidídimo adquieren movilidad y son capaces de poder fertilizar el óvulo ⁵.

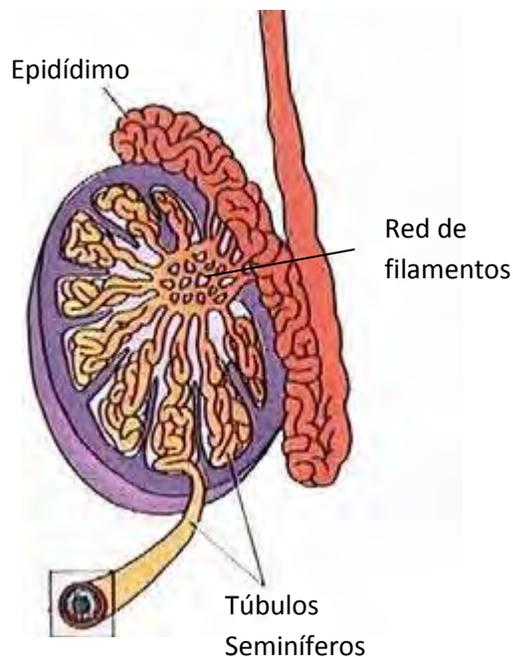


Figura 3. Esquema general del Testículo

El espacio intersticial ocupa un tercio del volumen testicular total y contiene las células de Leydig productoras de andrógenos, vasos sanguíneos, linfáticos y nerviosos. Además en el espacio intersticial hay colágeno, fibras elásticas y un gran número de macrófagos (Figura 4)³.

Las paredes de los túbulos seminíferos están recubiertas por células germinales primitivas y por células de Sertoli, que son células grandes y complejas, y se consideran reguladores principales de la espermatogénesis en respuesta a la hormona folículo estimulante para la cual poseen receptores de superficie celular (Figura 4)^{15, 27}.

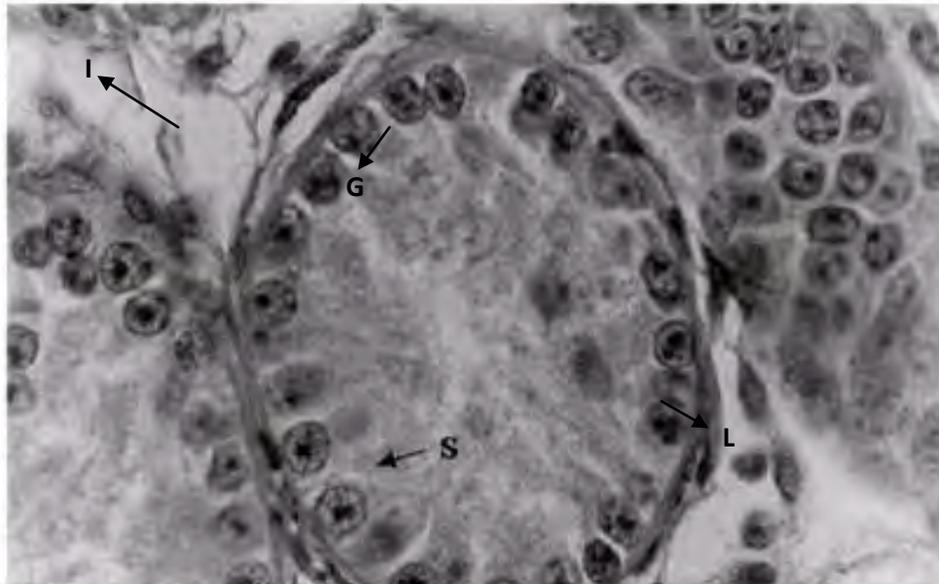


Figura 4. Corte transversal de un testículo. G= Célula Germinal. S= Célula de Sertoli. L= Célula de Leydig. I=Intersticio¹⁷.

4. Célula de Sertoli

La célula de Sertoli es la primera célula que se puede identificar al microscopio en un testículo fetal y sólo prolifera en etapas neonatales cuando las células son inmaduras, es por esto que en la vida adulta ya no proliferan (Figura 5)²⁹. La célula de Sertoli es la que determina el tamaño de los testículos en la vida adulta y también existe una relación entre el número de células de Sertoli con la capacidad de llevar a cabo una óptima espermatogénesis⁴¹.

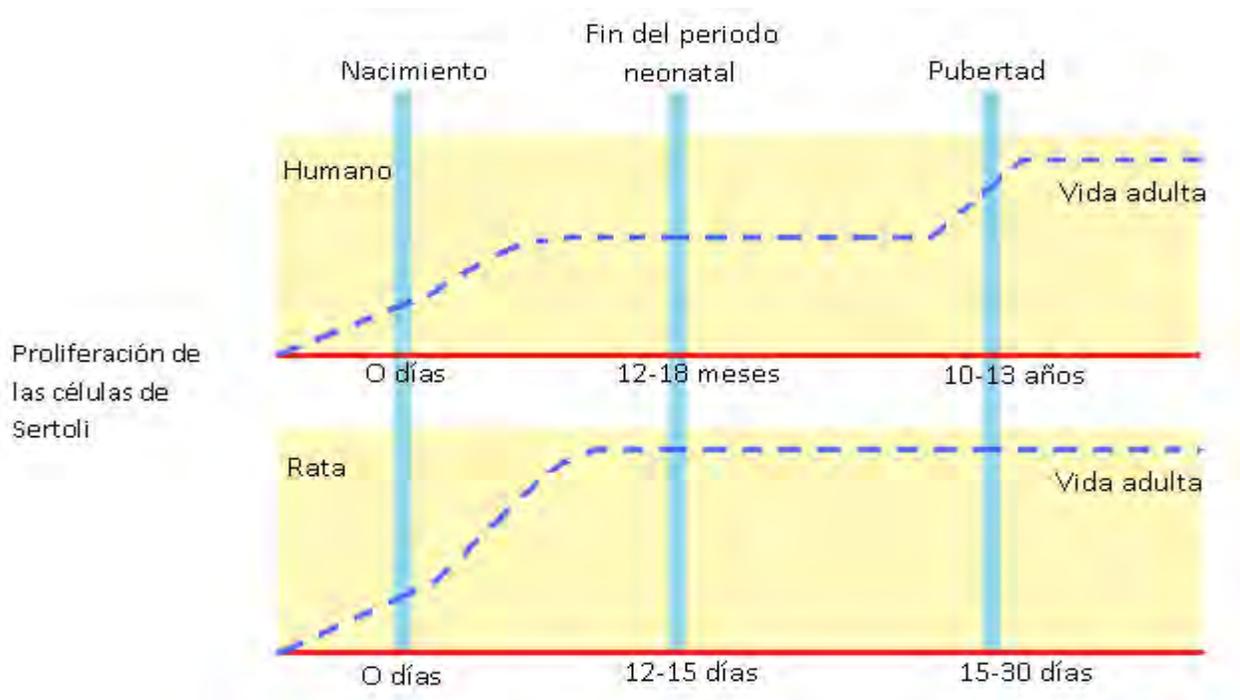


Figura 5. Proliferación de las células de Sertoli en humanos y ratas en distintas etapas de la vida. Línea azul punteada: proliferación de las células de Sertoli con respecto al tiempo²⁹.

La FSH ejerce su efecto endocrino sobre las células de Sertoli, ya que es el único tipo celular en el testículo que posee receptor para dicha hormona. La célula de Sertoli necesita de FSH para una adecuada proliferación. También produce proteínas tales como: la proteína fijadora de andrógenos (ABP) y la inhibina entre otras¹⁶.

La ABP tiene gran afinidad por la testosterona y es la responsable de mantener las concentraciones altas de testosterona en la luz tubular para ser transportada hasta el epidídimo (Figura 6). La inhibina regula la secreción de FSH a nivel hipofisario (Figura 2)¹⁶.

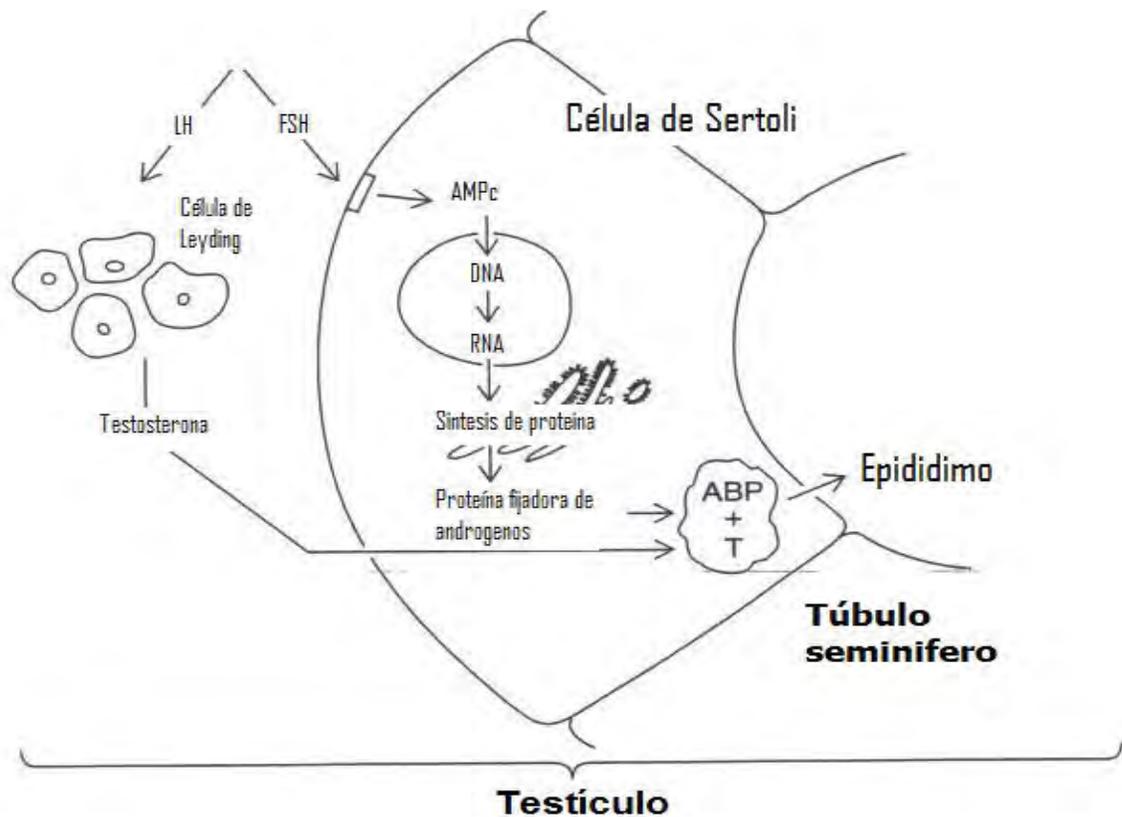


Figura 6. Señalización en la célula de Sertoli, para la síntesis de la ABP.

5. Barrera hemato-testicular

Los túbulos seminíferos en un principio contienen células germinales y células de Sertoli dispersas por el túbulo, sin orden alguno, en el proceso de maduración hay migración a la periferia tanto de células germinales como de células de Sertoli. En la rata macho aproximadamente a los 14 ó 15 días de edad termina el reacomodo de células de Sertoli en la periferia del túbulo, lo que permite que aparezca la luz tubular y se forme la barrera hemato-testicular¹⁶ que son uniones impermeables que evitan el paso de moléculas grandes desde el tejido intersticial hasta la región cercana a la luz tubular. El líquido en la luz tubular es muy diferente al plasma: contiene cantidades muy reducidas de proteína y glucosa, pero es muy rico en andrógenos y estrógenos, K^+ , inositol, y ácidos glutámico y aspártico. Esta barrera también protege a las células germinales de los agentes nocivos presentes en la sangre al evitar que penetren al túbulo y también ayuda a establecer un gradiente osmótico que facilita el movimiento de líquidos al interior de la luz tubular⁶.

6. Esteroidogénesis

Los testículos secretan varias hormonas sexuales masculinas, que colectivamente reciben el nombre de andrógenos y que son la testosterona, la dihidrotestosterona y la androstendiona¹.

Las células de Leyding tienen receptores para la hormona leuteinizante (LH) hipofisaria, cuando dicha hormona se une a su receptor se inicia una serie de señales a través de segundos mensajeros vía AMP cíclico, estimulando la síntesis de la proteína reguladora aguda de esteroides (StAR), esta proteína acelera el transporte de colesterol desde la membrana externa de la mitocondria hasta la membrana interna de la mitocondria.

El colesterol puede sintetizarse de *novo* a partir del acetato, sin embargo en la rata los tejidos esteroidogénicos lo obtienen de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), una vez que el colesterol se encuentra dentro de la mitocondria la proteína P450_{scc} (enzima divisora de la cadena lateral) convierte el colesterol a pregnenolona, paso limitante en la biosíntesis de andrógenos, principalmente en la producción de testosterona²².

La testosterona, hormona principal de los testículos, es un esteroide C₁₉ con un grupo –OH en posición 17. Se sintetiza a partir del colesterol que es transportado al interior de la mitocondria por medio de la StAR donde se convierte en pregnenolona²².

La enzima 17 alfa-hidroxilasa cataliza la hidrólisis de la pregnenolona en posición 17 y luego es objeto de una rotura de las cadenas laterales para formar deshidroepiandrosterona por medio de la enzima 17, 20 liasa, esta vía es más relevante en el humano²³.

En los roedores la pregnenolona se deshidrogena a progesterona por medio de la enzima 3 beta-HSD (3beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa), posteriormente sufre una hidrólisis en posición 17 por la enzima 17 alfa-hidroxilasa y se forma la 17-hidroxiprogesterona, por último se forma androstenodiona una reacción catalizada por la enzima 17, 20 liasa²³.

La deshidroepiandrosterona es un precursor de la androstenodiona en una reacción catalizada por la enzima 3 beta-HSD. La formación de testosterona tiene lugar por la reducción de un grupo hidroxilo presente en la androstenodiona dicha reacción la cataliza la 5alfa reductasa (Figura 7)²².

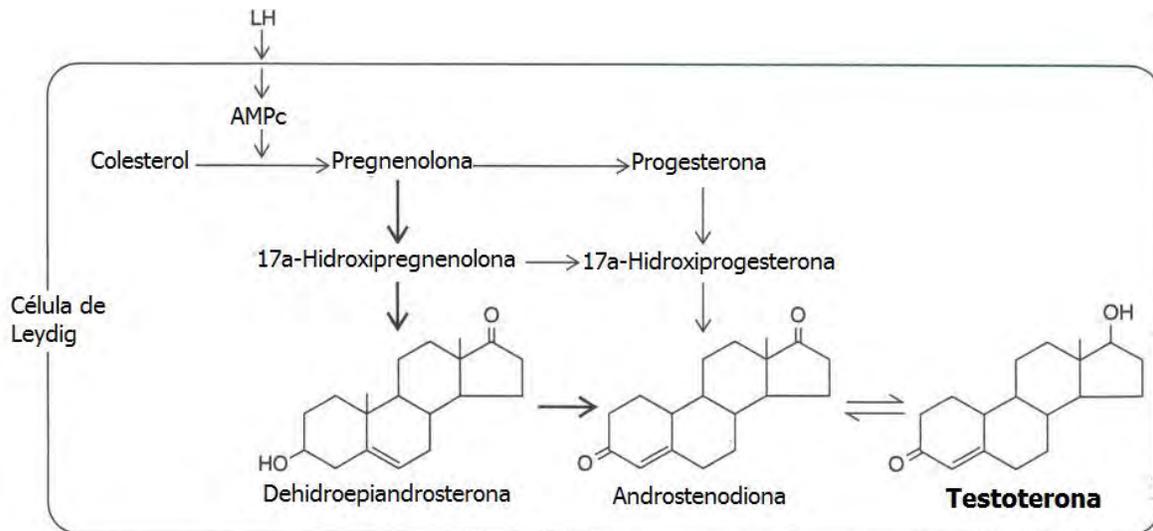


Figura 7. Esteroidogénesis en la célula de Leydig

7. Espermatogénesis

La espermatogénesis es una serie de procedimientos mediante los cuales las células germinales inmaduras o espermatogonias se transforman a células germinales maduras o espermatozoides.¹ La espermatogénesis se produce en todos los túbulos seminíferos durante la vida adulta, como consecuencia de la estimulación por las hormonas gonadotropicas de la adenohipófisis (LH y FSH)¹⁵.

Los túbulos seminíferos contienen una gran cantidad de células germinales denominadas espermatogonias, localizadas en dos o tres capas a lo largo del borde externo de la estructura tubular. Proliferan continuamente para reponer su número, y una porción de ellas se diferencia para formar espermatozoides^{1,4}.

La espermatogénesis puede dividirse en tres fases: multiplicación mitótica de las células madre (espermatogonias), meiosis y espermiogénesis^{2,4}.

Primera fase: La división y la maduración de las células madre inmaduras tiene lugar en el compartimiento adluminal de los túbulos cerca de la membrana basal. La división mitótica conduce a la formación de más células madre que permanecen en reproceso hasta el siguiente ciclo espermatogénico. Como consecuencia de mitosis sucesivas, las espermatogonias progresan de $A_1 \rightarrow A_2 \rightarrow A_3 \rightarrow A_4$ a tiempos intermedios (IN) a espermatogonias tipo B. Las espermatogonias progresan a espermatocitos primarios a través de un ciclo de mitosis^{2,4}.

Segunda fase: Esta fase involucra la división meiótica. Los espermatocitos primarios comienzan la división meiótica. La meiosis consiste en dos divisiones celulares consecutivas (cromosomas $4N \rightarrow 2N \rightarrow 1N$) acompañadas por sólo una duplicación de los cromosomas, de modo que las células resultantes (espermátides) contiene sólo la mitad del número de cromosomas (haploide: $1N$)^{2,4}.

Tercera fase: Esta fase se denomina espermiogénesis y es durante la cual se produce la transformación compleja de las espermátides en espermatozoides especializados^{2,4}.

Cada espermatozoide es una célula compleja altamente especializada que no crece ni se divide. Un espermatozoide principalmente contiene DNA, una cabeza y una cola⁶ entre otras cosas.

La cabeza está constituida en su mayor parte por material cromosómico y se encuentra recubierta por el acrosoma, un organelo rico en enzimas que participan en la penetración del óvulo. La cola móvil del espermatozoide está envuelta en su porción proximal por una vaina que contiene múltiples mitocondrias⁶.

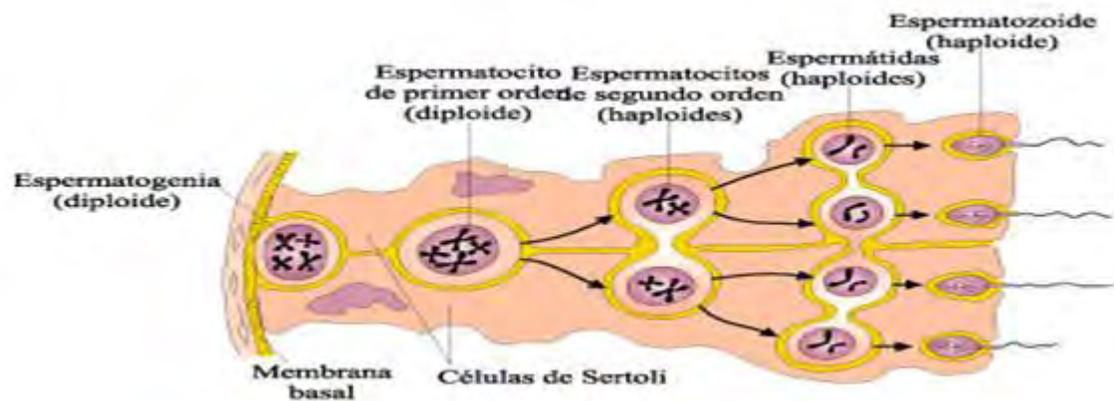


Figura 8. Espermatogénesis

8. Programación del desarrollo

La programación del desarrollo es un término que define los procesos mediante los cuales, condiciones que pueden ser o no adversas, durante periodos críticos (vida fetal o postnatal), incrementan la susceptibilidad a padecer enfermedades en vida adulta¹².

Los periodos críticos durante el desarrollo pueden ser la gestación y/o lactancia donde se va a presentar mayor vulnerabilidad a condiciones subóptimas, para la constante división celular típica de estos estadios del desarrollo. El efecto y el tiempo de

exposición a las condiciones subóptimas varían de un órgano a otro. Dichas condiciones pueden ser: Exposición alta o baja de hormonas o de nutrimentos, exposición drogas o fármacos, o condiciones anormales físicas en la madre durante la gestación como puede ser la presión alta ^{14, 40}.

En gran medida el desarrollo en edades tempranas depende del mapa genético heredado por nuestros padres, sin embargo el ambiente intrauterino y neonatal es muy importante para determinar el fenotipo del individuo¹⁴.

Durante la vida intrauterina, el feto reduce su crecimiento en respuesta a condiciones anormales ambientales, el número de células se puede incrementar o reducir, en un proceso adaptativo que le permite sobrevivir a corto plazo, sin embargo estos cambios son los que dan origen precisamente a enfermedades en vida adulta. Cuando existe discrepancia entre el ambiente intrauterino y el neonatal se producen procesos adaptativos predictivos, que le permiten sobrevivir al neonato a una condición distinta a la que fue preparado^{13, 12, 10}.

En el humano, el bajo peso al nacimiento se correlaciona con enfermedades en vida adulta típicas del Síndrome metabólico como: hipertensión⁴², enfermedades coronarias¹⁰, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa³⁸, diabetes tipo 2⁴³ y obesidad³¹.

Estudios epidemiológicos han demostrado que el estado nutricional de la madre es una causa determinante para la programación del desarrollo, el más conocido es el realizado con respecto al invierno hambriento Holandés. Durante la segunda guerra mundial entre 1944 y 1945 el ejército nazi mantuvo una ocupación en diferentes zonas de Holanda. Aunado al fuerte frío del invierno la población sufrió desnutrición debido a la escasez de alimentos. La cantidad de calorías consumidas en la dieta por día cayo casi un 50% (600 Kcal/día). El periodo de hambruna tuvo efectos permanentes sobre los niños recién nacidos de mujeres embarazadas durante este periodo, el efecto de la hambruna dependió del estadio del embarazo en el que se encontraba la mujer. El fenotipo de los individuos nacidos durante el invierno hambriento holandés ha permitido relacionar el bajo peso al nacimiento con las enfermedades antes mencionas ^{14, 44}.

9. Programación del desarrollo en el eje reproductivo masculino

La programación del desarrollo afecta de manera distinta a hembras y machos¹⁴, se ha demostrado que una dieta alta en grasa durante la gestación y/o lactancia eleva en vida adulta la presión sanguínea en las hembras y en los machos no⁴⁵.

La desnutrición durante la gestación y/o lactancia induce cambios en la diferenciación de un tejido, en la formación de gónadas o en la maduración de los

órganos, teniendo un efecto directo en la función de dichos órganos durante la vida adulta³⁶.

El desarrollo del eje hipotálamo hipófisis en vida fetal es muy susceptible a cambios en el estado nutricional de la madre³⁷, si no es el adecuado disminuye los niveles fetales de testosterona importantes para llevar a cabo una adecuada proliferación celular, reduciendo el número de células de Sertoli³⁷.

En un estudio previo realizado por nuestro equipo de trabajo utilizando ratas gestantes y/o lactantes las cuales fueron expuestas a restricción proteínica al 50% se demostró, que las crías macho provenientes de esas madres restringidas proteínicamente tuvieron retraso en marcadores de desarrollo sexual tales como: descenso de testículos y retracción del prepucio; también se encontró disminución en los valores séricos de LH y testosterona en etapas adultas lo que condujo a menor cuenta espermática y que posteriormente fue un factor determinante que llevó a envejecimiento prematuro de la fertilidad en el macho⁷.

Sin embargo el desempeño reproductivo del macho debe estar determinado desde etapas fetales y/o neonatales.

III.

Justificación

Como ya se sabe la desnutrición intrauterina y neonatal induce en el individuo una serie de procesos adaptativos predictivos que le permiten sobrevivir, sin embargo se compromete el desarrollo de los órganos, tales como el testículo.

Nuestro grupo de investigación ha comprobado en estudios anteriores que la restricción proteínica materna durante la gestación y/o lactancia, retrasa en las crías macho marcadores de desarrollo testicular tales como: descenso testicular y retracción del prepucio. También disminuye la cantidad de espermatozoides y hay envejecimiento prematuro de la tasa de fertilidad en la vida adulta del macho.

Sin embargo la restricción proteínica materna durante la gestación y/o lactancia debe retrasar el desarrollo testicular desde etapas neonatales y esto seguramente llegará a repercutir en el desempeño reproductivo del macho en vida adulta. A la fecha existen pocos estudios relacionados con el tema, pero se sabe que si la célula de Sertoli no prolifera en tiempo y forma adecuada degeneran y mueren.

Por lo que buscamos algún retraso en el desarrollo testicular en etapas neonatales debido a alguna alteración celular o molecular inducida por la restricción proteínica materna en la gestación y/o lactancia.

IV.

Hipótesis

Debido a la importancia que tiene la proteína en la alimentación al reducir su ingesta al 50% en la rata gestante y/o lactante se inducirá alguna alteración celular o molecular lo que retrasará el desarrollo testicular neonatal y que seguramente concordara con lo ya observado anteriormente en etapas adultas donde hay una disminución prematura de la tasa de fertilidad.

V.

Objetivos

Objetivo general

- Determinar en etapas neonatales algunas alteraciones a nivel celular o molecular que induzcan un retraso en el desarrollo testicular, debido a la restricción de proteína de la madre durante la gestación y/o lactancia.

Objetivos generales.

- Evaluar parámetros morfométricos al nacimiento de la crías macho neonatales cuyas madres fueron restringidas durante el embarazo y/o lactancia.
- Comparar la ganancia de peso de las crías provenientes de madres expuestas a restricción proteínica contra las crías provenientes de madres sin restricción alguna.
- Comparar el tamaño de los testículos al día del sacrificio de las crías cuyas madres fueron restringidas proteínicamente durante el embarazo y/o lactancia.
- Cuantificar a los 14 días de edad las concentraciones hormonales de FSH y testosterona en las crías macho provenientes de los cuatro grupos experimentales.
- Determinar la expresión del receptor para LH y FSH en testículos de ratas de 7 y 14 días de edad, expuestas a restricción proteínica materna.
- Evaluar la apertura de luz tubular en testículos desde los 15 hasta los 17 días de edad, de las crías macho cuyas madres fueron restringidas proteínicamente durante alguna etapa.

VI.

**Materialles y
Métodos**

1. Modelo biológico.

Se trabajó con 24 ratas hembras albinas nulíparas de la cepa Wistar de 10 a 12 semanas de edad y con un peso de 240 ± 20 g, las cuales fueron colocadas en cajas de acrílico en un cuarto del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12:12 horas), humedad y temperatura (75% humedad relativa y 23°C).

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Investigación en Animales (CINVA) del INCMNSZ.

Dichas ratas se colocaron con un macho de la misma cepa de fertilidad probada y sin tratamiento alguno para su apareamiento por cinco días. En la mañana del día siguiente se les realizó frotis vaginal utilizando un asa bacteriológica con el fin de observar en el microscopio espermatozoides y así señalar el inicio de la gestación (día cero).

Las ratas preñadas fueron separadas del macho y alimentadas *ad libitum* aleatoriamente con dietas experimentales isocalóricas (figura 9).

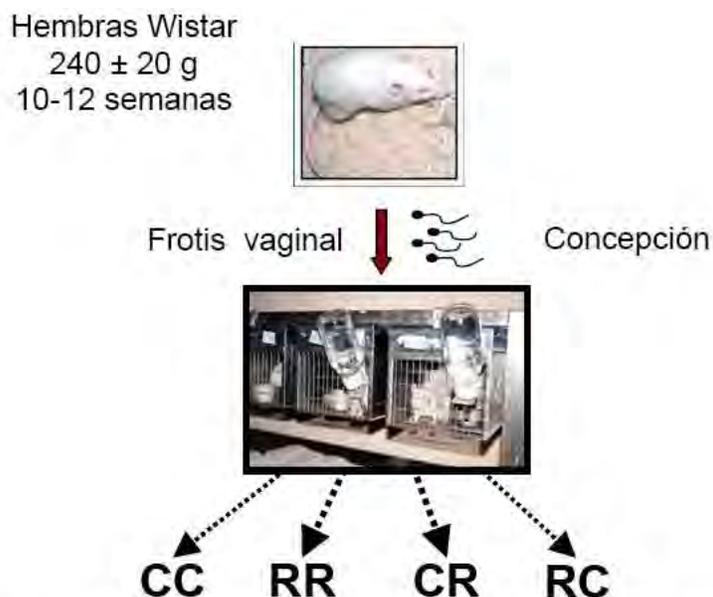


Figura 9. Ratas hembras Wistar de 10 a 12 semanas de edad con peso aproximado de 240 g fueron apareadas con machos de fertilidad probada y sin ningún tipo de tratamiento, la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal indicó el día de la concepción. Las hembras gestantes fueron distribuidas aleatoriamente en los grupos experimentales.

2. Dietas experimentales isocalóricas.

El uso de dietas experimentales a base de caseína ha sido reportado anteriormente por nuestro equipo de trabajo^{7,8}.

Las dietas experimentales utilizadas son a base de caseína, teniendo así la dieta Control (**C**) con 20% de caseína y la dieta Restringida (**R**) con 10% de caseína, cabe mencionar que tienen la misma cantidad de calorías por lo que se compensa con carbohidratos de acuerdo a lo reportado por Zambrano *et al.* (Tabla 1)^{7,8,11}.

Las dietas experimentales fueron elaboradas en la planta piloto de la Unidad Tecnológica de Alimentos del INCMNSZ, donde se pesaron los componentes según la cantidad requerida en una balanza (Sartorius: Peso total 610g Sensibilidad 0.001g) o en una báscula (Eura: Peso total 100kg. Modelo 2000/100) y se aseguró la distribución homogénea de la mezcla utilizando una mezcladora (Hobart: Modelo A200 The Hobart MFG. C.O) de paleta por 15 minutos, después se agregó agua hasta obtener una pasta moldeable, para poder formar galletas.

Las galletas formadas se dejaron secar a temperatura ambiente, hasta que tuvieron la dureza adecuada.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales.

	Dieta Caseína 20% (g/100g)	Dieta Caseína 10% (g/100g)
Caseína libre de Vitaminas	20	10
L- cistina dihidroclorada	0.3	0.15
Mezcla de Vitaminas AIN-93VX	1	1
Clorhidrato de Colina	0.165	0.165
Mezcla de Minerales Rogers-Harper	3.5	3.5
α -Celulosa-Fibra	5	5
Aceite de Maíz	5	5
Dextrosa Anhidra	32.5	37.5
Almidón de maíz	32.5	37.5
Contenido energético	3.85kcal/g	3.85kcal/g

Se emplearon dos dietas isocalóricas, C (control, caseína 20%) y R (restringida, caseína 10%). Todos los componentes fueron grado alimenticio. Los siguientes ingredientes fueron adquiridos de Harlan-Teckland, EUA: Caseína libre de vitaminas (cat.160090), L-cistina dihidroclorada (cat.10360), mezcla de vitaminas AIN-93-VX (cat. TD94047), mezcla de minerales Rogers-Harper (cat. 160170), dextrosa anhidra (cat. 160195) y almidón de maíz (cat.160170). De Sigma-Aldrich, St. Louis Mo,EUA, se obtuvieron: clorhidrato de colina (cat. C2004) y α -celulosa-fibra (cat. C8002). El aceite de maíz se obtuvo de la Gloria México.

3. Grupos experimentales.

La restricción proteínica materna de este trabajo consideró distintas ventanas críticas del desarrollo del eje reproductivo de las ratas macho^{7, 8, 14}. Por lo que se tuvieron cuatro grupos experimentales, los cuales se señalaron con dos letras, donde la primera corresponde a la dieta recibida por la madre durante la gestación y la segunda letra corresponde a la dieta recibida por la madre durante la lactancia (Figura 10).

Grupo **(CC)**: Dieta al 20% de caseína en la gestación y lactancia.

Grupo **(RR)**: Dieta al 10% de caseína en la gestación y lactancia.

Grupo **(CR)**: Dieta al 20% de caseína en la gestación y dieta al 10% en la lactancia.

Grupo **(RC)**: Dieta al 10% de caseína en la gestación y dieta al 20% en la lactancia.



Figura 10. Línea de tiempo de la dieta recibida por la madre durante la gestación y/o lactancia, donde se observan los cuatro grupos experimentales.

4. Manejo de la madre durante la gestación y la lactancia.

Durante la gestación las ratas se mantuvieron en cajas de acrílico y se les dio agua y alimento *ad libitum*.

Durante la lactancia se registró la ganancia de peso de las crías, siendo de más importancia para este trabajo las crías macho.

En todo el experimento se conservaron los ciclos de luz-oscuridad (12:12 horas), y se controló la humedad y temperatura ambiente (75% humedad relativa y 23°C).

5. Nacimiento de las crías.

Al día 2 después del parto (día 22 de gestación) las camadas fueron ajustadas a 10 crías tratando de guardar la proporción 1:1 macho hembra. Las crías al nacimiento se pesaron y se les midió algunos parámetros morfométricos utilizando un vernier como son: talla, diámetro cefálico, diámetro abdominal y distancia ano-genital (Figura 11).

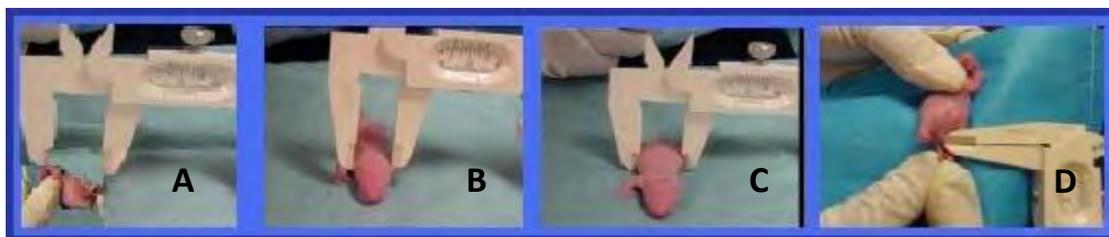


Figura 11. Parámetros morfométricos como talla (A), diámetro cefálico (B), diámetro abdominal (C) y distancia ano-genital (D).

6. Sacrificio de las crías.

Las crías macho se sacrificaron a distintas edades (7, 14, 15, 16 y 17 días) por medio de decapitación utilizando una guillotina. La sangre se recolectó en tubos eppendorf de 1.5mL para analizar en suero marcadores bioquímicos como: la concentración de FSH y de testosterona mediante Radio Inmuno Análisis (RIA). Los testículos se pesaron en una balanza (Sartorius: Peso total 610g Sensibilidad 0.001g), el testículo derecho se guardó en el ultracongelador a -75°C para determinar algunos marcadores moleculares como: expresión de los receptores de FSH y LH. El testículo izquierdo se fijó en para-formaldehído para ser evaluado por histología.

7. Marcadores bioquímicos

- Análisis de las concentraciones séricas de FSH por RIA a los 14 días de edad.

Para determinar la concentración de FSH en suero se utilizó la técnica de RIA de doble anticuerpo utilizando los reactivos donados por NIDDK (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Baltimore, MD). La concentración de FSH en suero de rata fue radiomarcada con ^{125}I mediante la técnica cloramina- T, seguido de la separación de proteínas libres y unidas [^{125}I], por Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich, Cat. S6147). Los resultados fueron expresados en términos del estándar de NIDDK-rata-FSH-RP2. Las muestras se analizaron por duplicado utilizando 100 μg de suero por muestra. El coeficiente de variación intraensayo fue 9%, el coeficiente de variación interensayo fue 14% y la sensibilidad fue de 0.035ng/mL.

- Análisis de las concentraciones séricas de testosterona por RIA a los 14 días de edad.

Para determinar la concentración de testosterona en suero se utilizó la técnica de RIA fase sólida donde se emplea un anticuerpo específico obtenido de un estuche comercial para rata de DPC Coat-a-Count (Diagnostic Production Corporation, Los Ángeles, CA, Cat; TKTT1). Las muestras se analizaron por duplicado utilizando 100 μg de suero por muestra. El coeficiente de variación intraensayo fue 5%, el coeficiente de variación interensayo fue 9% y la sensibilidad fue de 0.04ng/mL.

8. Marcadores moleculares

- Extracción de RNA

El RNA total se extrajo del testículo derecho de las ratas macho de 7 y 14 días de edad de cada grupo experimental por homogenización en el reactivo de Trizol TM (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA, Cat. 1559026) siguiendo su respectivo inserto, el cual nos dice lo siguiente:

1. Esterilizar todo el material a utilizar y llenar varios tubos Falcón de 15mL con H₂O+DEPC, para lavar el politrón (Tissue Tearor 398, Biospec Products, Inc, USA) tres veces entre cada muestra.
2. En un tubo Ependorf de 1.5mL añadir 1mL de reactivo de Trizol™ por cada 50-100mg de tejido y homogenizar con un politrón (Tissue Tearor 398, Biospec Products, Inc, USA).
3. Incubar el homogenizado a temperatura ambiente por 5min.
4. Agregar 0.2mL de CHCl₃ (Sigma, USA, Cat. C243225ML) por cada mililitro de reactivo de Trizol™.
5. Dar vortex por 15 segundos, incubar a 15-30°C por 3min.
6. Centrifugar las muestras a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C.
7. El RNA permanece en la parte acuosa. Transferir la parte acuosa a otro tubo Ependorf y precipitar el RNA utilizando Isopropanol (0.5mL/mL de Trizol™) grado Biología molecular.
8. Incubar las muestras toda la noche a -20°C.
9. Centrifugar las muestras a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C.
10. El RNA precipita, Decantar.
11. Lavar el precipitado con Etanol al 75% (1mL/mL de Trizol).
12. Agitar por vortex y Centrifugar a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C. Decantar.
13. Disolver el RNA con H₂O+DEPC.

El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro dentro del campo de la luz visible a una longitud de onda de 260 y 280 nm, para lo cual se utilizó una dilución 1:200.

- Obtención de DNA complementario.

Se tomó la cantidad equivalente 3µg de RNA y por medio de la técnica de la Transcriptasa Reversa se obtuvo el DNA complementario, utilizando el estuche Transcriptor *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Applied Science, USA, Cat. 13490320).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer Gene Amp, PCR System 960) el cual realizó ciclos a diferentes temperaturas (Tabla 2), en un programa específico.

Tabla 2. Programa de Transcriptasa Reversa.

Ciclo	Temperatura °C	Tiempo (min)
Desnaturalización	65	10
Elongación	55	30
Desactivación	85	5

Ciclos a diferentes temperaturas utilizados para la reacción de la transcriptasa reversa.

- Reacción en Cadena de Polimerasa.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa permitió incrementar más de 10^6 veces el DNA para lo cual se utilizó el estuche *Fast Start Taq DNA Polymerase* (Roche Applied Science, USA, Cat. 10940653), el cual tenía los componentes de la mezcla de reacción (Tabla 3), excepto los oligonucleótidos (Tabla 5).

Tabla 3a. Mezcla de Reacción para rFSH y rLH.

Componente	Cantidad (μ l)
cDNA	5
Agua Grado PCR	13.1
PCR Reacción Buffer 10X	2.5
Mezcla de dNTP (1mM)	1
Oligonucleótido sentido	1
Oligonucleótido anti-sentido	1
DMSO	1
DNA Taq Polimerasa	0.4
Total	25

Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa.

Tabla 3b. Mezcla de Reacción para ciclofilina.

Componente	Cantidad (μ l)
cDNA	3
Agua Grado PCR	16.1
PCR Reacción Buffer 10X	2.5
Mezcla de dNTP (1mM)	1
Oligonucleótido sentido	0.5
Oligonucleótido anti-sentido	0.5
DMSO	1
DNA Taq Polimerasa	0.4
Total	25

Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa.

La mezcla de reacción de la tabla 3a se realizó, para el receptor de FSH y para el receptor de LH. Para el gen constitutivo Ciclofilina se utilizó la mezcla de reacción tabla 3b.

Ambas mezclas se prepararon en tubos de 0.2 mL (Termowell™, DNase/RNase Free, Cat 6571) y se llevaron a cabo en el termociclador (Perkin Elmer Gene Amp, PCR System 960), el cual realizó 3 cambios de temperatura y los repitió 30 veces en un programa específico (Tabla 4).

Tabla 4. Programa de PCR.

	Temperatura °C	Tiempo (min)
Desnaturalización	95	30
Alineamiento	60	30
Elongación	72	30

Cambios de temperatura utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa, estos tres pasos se repitieron 30 veces.

Esta técnica incrementó el DNA de la secuencia específica, del receptor de FSH, del receptor de LH y del gen constitutivo Ciclofilina, hibridando con sus respectivas secuencias flanqueantes de oligonucleótidos (Tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos flanqueantes.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido anti-sentido	Peso
LH-R	5'-GAATGCTTTCCAAGGGATGA-3'	5'-CCTCAAAGATGGCGGAATAA-3'	470 pb
FSH-R	5'-GAGTCATCCCGAAAGGATCA-3'	5'-TAAAATGACTGGCCAGAGG-3'	494 pb
Ciclofilina	5'-CCCCACCGTGTCTTCGACAT-3'	5'-GCTGGTCTTGCCATTCTGGA-3'	451 pb

Oligonucleótidos flanqueantes utilizados para el estudio de la expresión de los genes del receptor de FSH y del receptor de LH.

- Electroforesis

El DNA amplificado se separó por medio de una electroforesis de agarosa al 1.2% en TBE 1X utilizando un voltaje constante de 90 volts durante 45 minutos. Posteriormente el DNA se desnaturalizó a cadena sencilla, para lo cual se hicieron dos lavados, el primero

con solución alcalina a pH=11 por 30 minutos y el segundo con solución neutra con pH=7.5 por 30 minutos.

El DNA separado en el gel se transfirió a una membrana de *nylon Z-Probe* (Bio-Rad, Hércules, USA Cat. 1620159) cargada positivamente, por medio de capilaridad.

El DNA fue fijado a la membrana por radiación UV (Gene Cross-Linker; Bio Rad).

- Obtención de sondas específicas marcadas con digoxigenina

Se extrajo RNA por medio de la técnica antes descrita de dos ovarios de una rata hembra albina nulípara de la cepa Wistar de 10 a 12 semanas de edad, con un peso de 240 ± 20 g y sin tratamiento alguno. Se obtuvo cDNA por medio de la Transcriptasa Reversa y se marcó la sonda específica mediante la reacción de PCR *Dig Probe Synthesis Kit* (Roche, Penzberg, Cat. 11636090910). Se purificó la sonda marcada que presentaba mayor peso molecular después de un corrimiento electroforético.

Esta técnica se realizó para marcar las sondas específicas a la secuencia de DNA de las enzimas y receptores de interés (Ciclofilina, rFSH, rLH), utilizando también los oligonucleótidos de la tabla 5.

- Southern Blot

Las membranas con DNA fijado se pre-hibridaron durante 24 horas en solución estándar de hibridación (SSC 20X, N-Laurilsarcosina 10%, Reactivo de bloqueo) a una temperatura de 68°C, después se hibridaron con la sonda marcada con digoxigenina durante 24 horas a 65°C.

Las membranas se lavaron conforme a lo que se explica en la tabla 6, después se colocaron dentro de folders de plástico y se incubaron por 7min con 1mL de la solución de revelado (996µL sol. de detección, 4µL sustrato de quimioluminiscencia CSPD Roche, Cat.165584), finalmente se expuso la membrana a una placa fotográfica (Lumi Film Chemiluminescent Film Roche Cat. 1166665700) por 2 horas a 37°C y se reveló. El análisis de la expresión de la secuencia génica de interés se realizó por medio de densidades ópticas utilizando un analizador de imágenes Eagle eyes-systems (Stratagene, EUA).

Tabla 6. Lavados de Southern Blot

Tiempo (min)	Temperatura	Solución
15	Ambiente	Sol. Lavado 1 (SSC 2X, SDS 0.1%)
15	Ambiente	Sol. Lavado 1 (SSC 2X, SDS 0.1%)
15	Ambiente	Sol. Lavado 2 (SSC 0.1X, SDS 0.1%)
15	68°C	Sol. Lavado 2 (SSC 0.1X, SDS 0.1%)
15	Ambiente	Sol. Lavado 2 (SSC 0.1X, SDS 0.1%)
5	Ambiente	Sol. Lavado 3(Tween 20 en ácido maléico)
45	Ambiente	Sol. Bloqueo 1X
45	Ambiente	Anti-digoxigenina, Sol. Bloqueo 1X (1:1000000)
15	Ambiente	Sol. Lavado 3(Tween 20 en ácido maléico)
15	Ambiente	Sol. Lavado 3(Tween 20 en ácido maléico)
15	Ambiente	Sol. de Detección (Tris-HCl 1M, NaCl 1M)

La anti-digoxigenina se obtuvo de Roche, Cat. 1093274

9. Estudios Histológicos

El testículo izquierdo extraído de cada grupo experimental se fijó en una solución al 4% de para-formaldehído en amortiguador de fosfatos a pH 7.4 por 12 horas, se quitó el exceso de fijador del tejido lavando tres veces en solución de fosfatos a pH 7.4 por intervalos de 15 minutos. Después se deshidrató el tejido utilizando diferentes concentraciones de alcohol en orden creciente (Tabla 7), posteriormente se realizó un lavado con Xilol por 60 minutos y por último se incluyó en bloque de parafina a 56°C por 60 minutos.

Tabla 7. Deshidratación del tejido con alcohol.

# de lavados	[Alcohol]	Tiempo (min)
2	80%	60
2	95%	60
2	Absoluto	60

Seguido de los lavados se realizó la inclusión en parafina.

Tras la inclusión se realizaron cortes seriados del testículo de 10 μ m, los cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se observaron al microscopio con un objetivo de 40X, donde se contaron los túbulos seminíferos cortados transversalmente. El porcentaje de apertura de luz tubular se determinó con respecto al número total de túbulos transversales presentes en el corte histológico para todos los grupos y a las edades de 14, 15, 16 y 17 días.

10. Resumen de los experimentos realizados durante la etapa neonatal.

Al día del nacimiento se registraron parámetros morfométricos, a los 7 y 14 días de edad se determinó la expresión del receptor de FSH y LH, a los 14 días de edad se cuantificó la concentración de FSH y testosterona en suero, también a esta edad y a los 15, 16 y 17 días de edad se observó la apertura de luz tubular y se registró el peso testicular. Durante todo el experimento se registró la ganancia de peso de las crías macho hasta el fin de la lactancia.

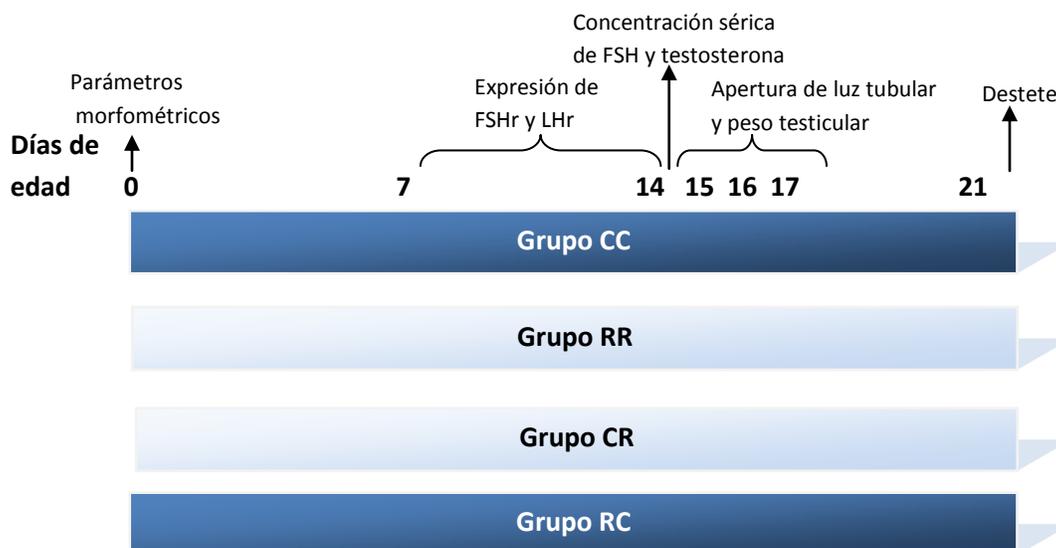


Figura 12. Línea de tiempo donde se muestran los experimentos realizados, desde el día cero (nacimiento) hasta el destete (día 21 de lactancia)

11. Análisis estadístico

Para los resultados de los parámetros morfométricos de las crías al nacimiento se utilizó la t de Student y para los resultados del peso del testículo, marcadores bioquímicos, moleculares e histológicos se utilizó la ANOVA de una sola vía, seguida por la prueba Post Hoc de Tukey.

La n=6 camadas por grupo para la curva de crecimiento y parámetros morfométricos, y n=4 crías por grupo seleccionadas al azar para los demás experimentos.

VII.

Resultados

1- Parámetros morfométricos de las crías macho al nacimiento

El peso, el diámetro cefálico y el diámetro abdominal fue menor en el grupo restringido, observándose además que dicha diferencia fue estadísticamente significativa $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ con respecto al grupo control.

La distancia ano genital absoluta y la distancia ano genital relativa al peso mostraron fue mayor en el grupo restringido con respecto al grupo control, dicha diferencia fue estadísticamente significativa $p < 0.01$.

La misma tendencia se observó en la relación cefálico-abdominal donde el grupo restringido mostró mayor relación con respecto al grupo control $p < 0.01$ (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros morfométricos

	C	R
Peso (g)	6.31 ± 0.09	6.2 ± 0.1
Talla (cm)	5.6 ± 0.25	5.7 ± 0.3
Distancia Ano-Genital (mm)	3.28 ± 0.05	3.69 ± 0.07*
Distancia Ano-Genital (mm/g)	0.51 ± 0.01	0.6 ± 0.02*
Diámetro Cefálico (mm)	11 ± 0.07	10.8 ± 0.07*
Diámetro Abdominal (mm)	14.13 ± 0.18	13.83 ± 0.13 ***
Relación Cefálico/Abdominal	0.74 ± 0.005	0.78 ± 0.005*

Parámetros morfométricos al nacimiento de las crías macho provenientes de madres que fueron alimentadas en la gestación con dieta C (control, caseína 20%) o con dieta R (restringida, caseína 10%). t de student, media ± error estándar; n= 6 camadas por cada grupo; * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$ Vs C

2.- Curva de crecimiento de las crías macho hasta el destete

Se observa cómo las crías de las madres del grupo control en ambos periodos (CC) son las que ganan mas peso al igual que las crías de las madres del grupo restringido sólo en la gestación (RC), siendo mas pequeñas las crías de las madres del grupo restringido en ambos periodos (RR). Las crías de las madres restringidas en la lactancia (CR) también mostraron un crecimiento lento igual a las crías de las madres (RR) (Figura 13).

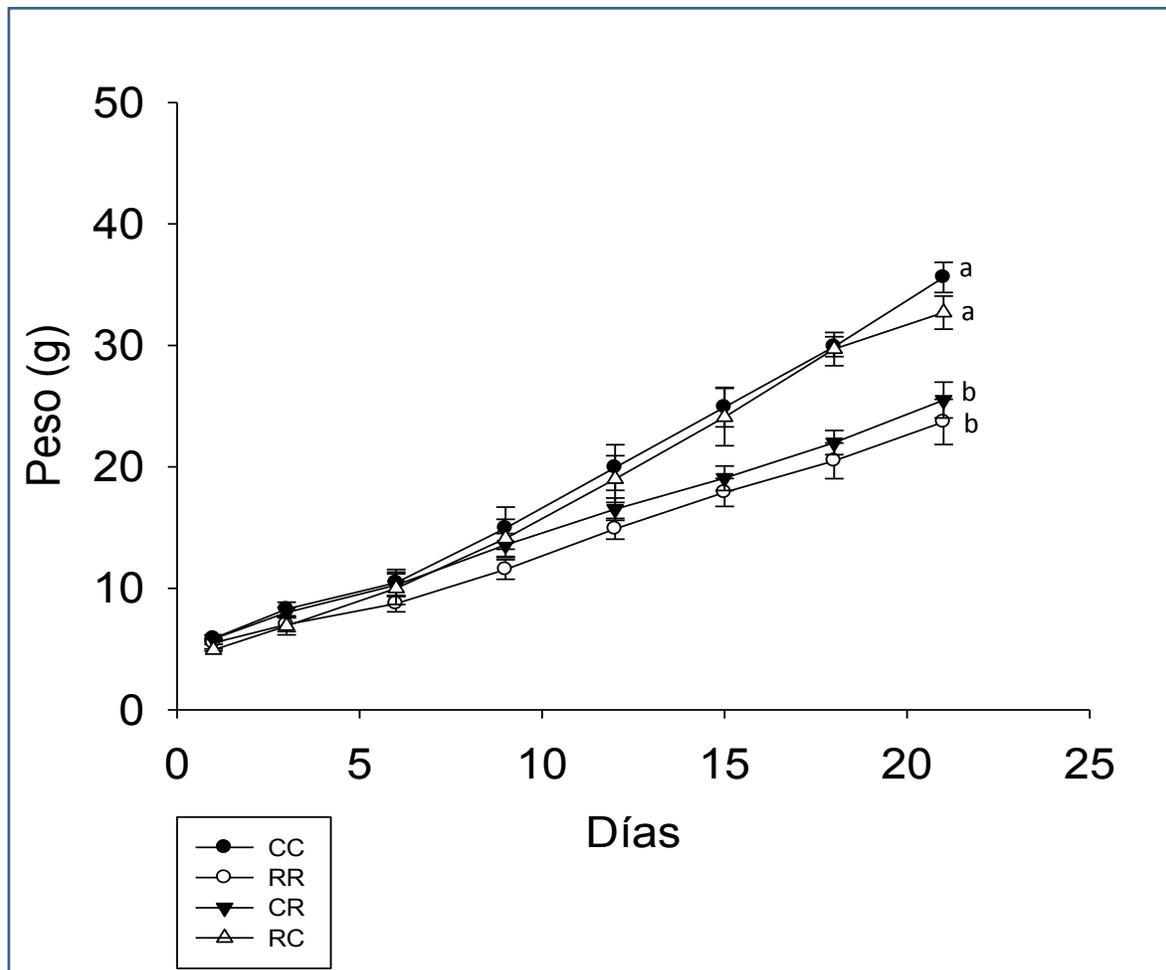


Figura 13. Curva de crecimiento de las crías macho desde el nacimiento hasta el destete (día 21 de edad) provenientes de madres que fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dieta C (control, caseína 20%) o con dieta R (restringida, caseína 10%). ANOVA. Media \pm error estándar. $p < 0.01$ para letras distintas $n=6$ camadas por cada grupo.

3.- Peso de testículos a distintas edades.

- 15 días de edad.

El peso corporal y el peso absoluto del testículo son menores en cualquiera de los tres grupos restringidos para esta edad, datos que además son estadísticamente significativos $p < 0.01$ con respecto al grupo control.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso relativo del testículo (peso del testículo/peso corporal) (Tabla 9).

Tabla 9. Testículo izquierdo más el derecho a los 15 días de edad

	CC	RR	CR	RC
Peso Corporal (g)	34.0 ± 1.3a	23.2 ± 0.5b	21.07 ± 0.3b	24.6 ± 0.3b
Peso Absoluto Testículo (mg)	68.5 ± 0.2a	43.4 ± 0.2b	39.0 ± 0.08b	44.7 ± 0.07b
Peso Relativo Testículo %	0.2 ± 0.005	0.187 ± 0.008	0.18 ± 0.005	0.18 ± 0.007

Peso absoluto y relativo de la suma del testículo izquierdo y derecho a los 15 días de edad, provenientes de madres que fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dieta C (control, caseína 20%) o con dieta R (restringida, caseína 10%). ANOVA. Media ± error estándar. $p < 0.01$ para letras distintas n=6 crías por cada grupo

- 16 días de edad.

Los datos para el peso corporal a esta edad mostraron diferencias estadísticamente significativas en los tres grupos restringidos, teniendo que el grupo CR es el que muestra menor peso corporal.

El peso absoluto del testículo a esta edad es menor $p < 0.01$ para cualquiera de los tres grupos restringidos con respecto al grupo control. Sin embargo el peso relativo del testículo sólo es diferente $p < 0.01$ en el grupo RC con respecto al grupo control (Tabla 10).

Tabla 10. Testículo izquierdo más el derecho a los 16 días de edad

	CC	RR	CR	RC
Peso Corporal (g)	35.4 ± 0.6a	24.1 ± 0.07c	20.7 ± 0.4d	28.3 ± 0.13b
Peso Absoluto Testículo (mg)	74.1 ± 0.4a	51.8 ± 0.1b	46.6 ± 0.08b	46.5 ± 0.3b
Peso Relativo Testículo %	0.2 ± 0.008a	0.21 ± 0.007a	0.22 ± 0.004a	0.16 ± 0.01b

Peso absoluto y relativo de la suma del testículo izquierdo y derecho a los 16 días de edad, provenientes de madres que fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dieta C (control, caseína 20%) o con dieta R (restringida, caseína 10%). ANOVA. Media ± error estándar. $p < 0.01$ para letras distintas n=6 crías por cada grupo

- 17 días de edad

En esta edad se conserva la misma tendencia que la encontrada en los 16 días de edad para el peso corporal.

El peso absoluto del testículo en los tres grupos restringidos muestra un menor peso con respecto al grupo control, dato que además es estadísticamente significativo, haciendo énfasis en el grupo CR ya que es el de menor tamaño. El peso relativo del testículo fue menor en el grupo RC (Tabla 11).

Tabla 11. Testículo izquierdo más el derecho a los 17 días de edad

	CC	RR	CR	RC
Peso Corporal (g)	38.6 ± 1.0a	26.5 ± 0.3c	22.3 ± 0.3d	32.3 ± 0.5b
Peso Absoluto Testículo (mg)	82.8 ± 0.2a	58.8 ± 0.3bc	51.5 ± 0.06c	62.0 ± 0.1b
Peso Relativo Testículo %	0.21 ± 0.002ab	0.22 ± 0.009a	0.23 ± 0.003a	0.19 ± 0.001b

Peso absoluto y relativo de la suma del testículo izquierdo y derecho a los 17 días de edad, provenientes de madres que fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dieta C (control, caseína 20%) o con dieta R (restringida, caseína 10%). ANOVA. Media ± error estándar. $p < 0.01$ para letras distintas n=6 crías por cada grupo

4.- Marcadores bioquímicos

- **Concentración de FSH en suero de crías macho de 14 días de edad.**

La concentración de FSH en suero de las crías macho de 14 días de edad para el grupo CR fue menor $p < 0.01$ con respecto al grupo control y a los demás grupos. En el grupo RR y en el grupo RC, la concentración de FSH en suero de las crías macho de 14 días de edad no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (Figura 14).

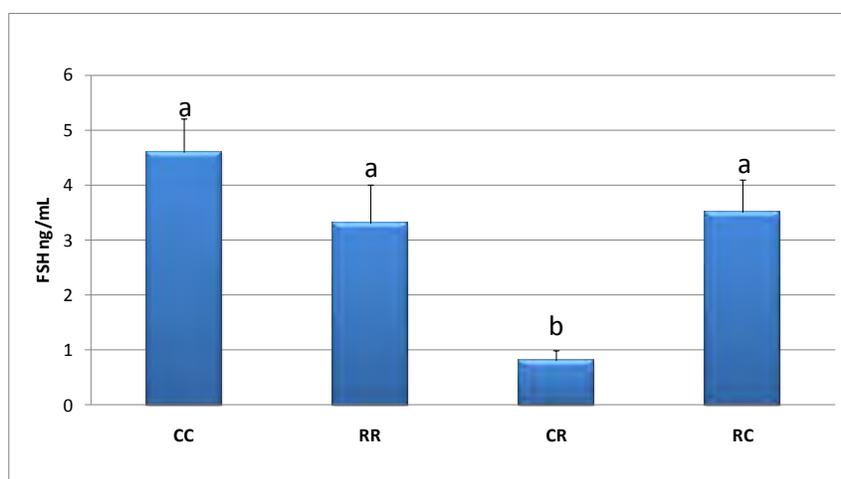


Figura 14. Concentración de FSH en suero de las crías macho de 14 días de edad provenientes de madres que fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dieta C (control, caseína 20%) o con dieta R (restringida, caseína 10%). ANOVA. Media ± error estándar. $p < 0.01$ para datos con letras diferentes. n=6 crías por cada grupo.

- **Concentración de testosterona en suero de crías macho de 14 días de edad.**

En la concentración de testosterona solo hubo diferencias entre el grupo RC y CR, pero no fueron diferentes al grupo control (Figura 15).

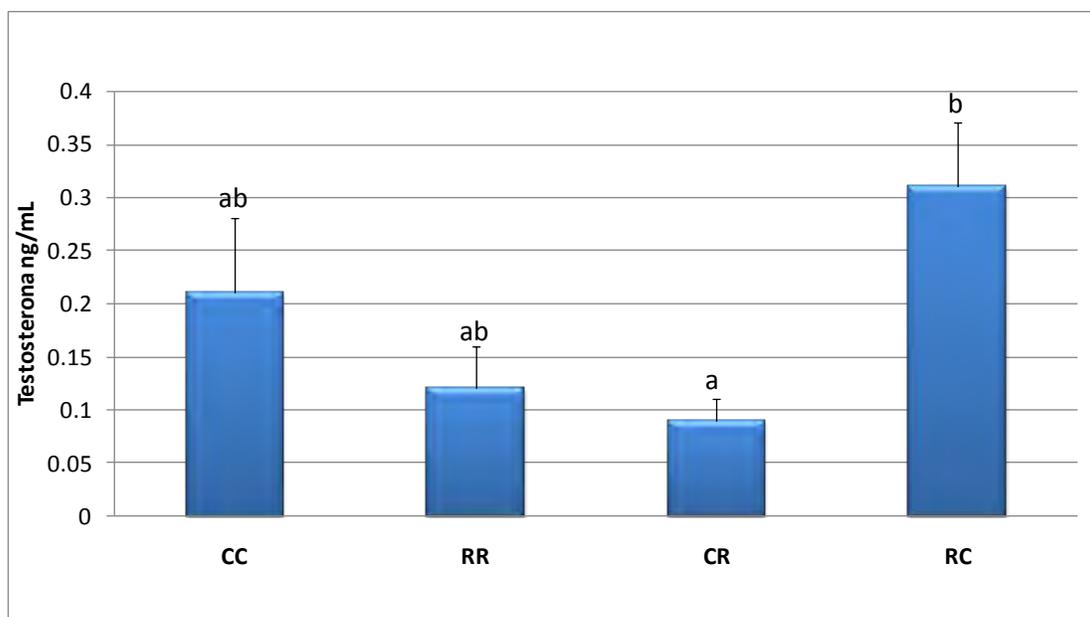


Figura 15. Concentración de testosterona en suero de las crías macho de 14 días de edad provenientes de madres que fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dieta C (control, caseína 20%) o con dieta R (restringida, caseína 10%). ANOVA. Media \pm error estándar. $p < 0.01$ para datos con letras diferentes. $n=6$ crías por cada grupo.

5.- Marcadores moleculares

- **Expresión relativa de los receptores de FSH y LH, a los 7 días de edad.**

Se observa sobre expresión relativa en el receptor FSH para el grupo RC con respecto al grupo control $p < 0.05$, también se observa un aumento en la expresión del receptor de FSH para el grupo CR, sólo que el resultado no es estadísticamente significativo.

La expresión relativa del receptor de LH a los 7 días de edad se encuentra aumentada en el grupo RC con respecto al grupo control, dicho resultado es estadísticamente significativo $p < 0.01$. La expresión del grupo CR y RR no muestra ninguna diferencia (Figura 16).

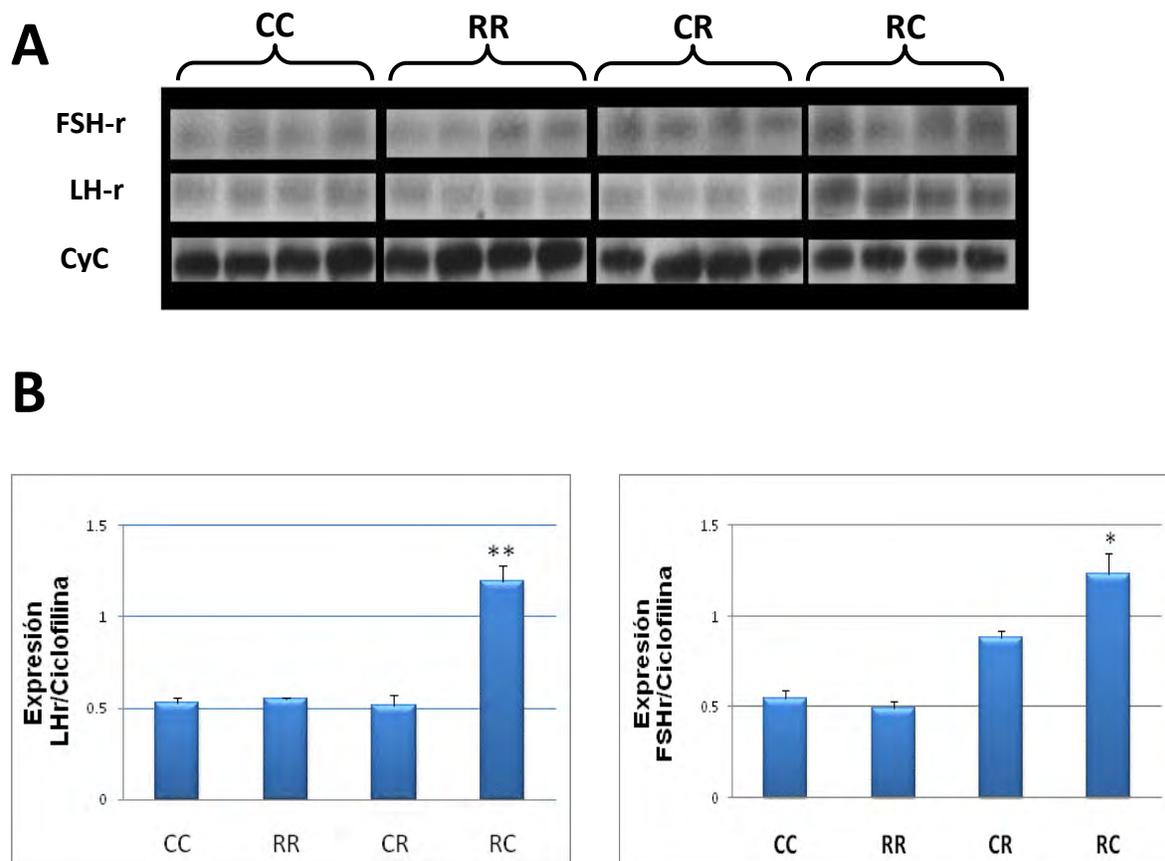


Figura 16. Expresión relativa del receptor de FSH y del receptor de LH a los 7 días de edad. En la figura se observan dos paneles, panel A y B. En el panel A se encuentran los *southern blots* correspondientes a los genes del receptor de FSH, del receptor de LH y de la ciclofilina. En el panel B se encuentran las densitometrías correspondientes a los genes con respecto al gen constitutivo ciclofilina. Las crías macho provienen de madres que fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dieta C (control, caseína 20%) o con dieta R (restringida, caseína 10%). ANOVA. Media \pm error estándar. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ Vs CC $n=6$ camadas por cada grupo.

- **Expresión relativa de los receptores de FSH y LH, a los 14 días de edad.**

Existe sobreexpresión $p < 0.01$ del receptor de FSH en el grupo RC con respecto al grupo control.

De igual manera la expresión del receptor de LH en el grupo RC, se observó aumentada $p < 0.05$. Para el grupo RR y para el grupo CR no se observó diferencia alguna (Figura 17).

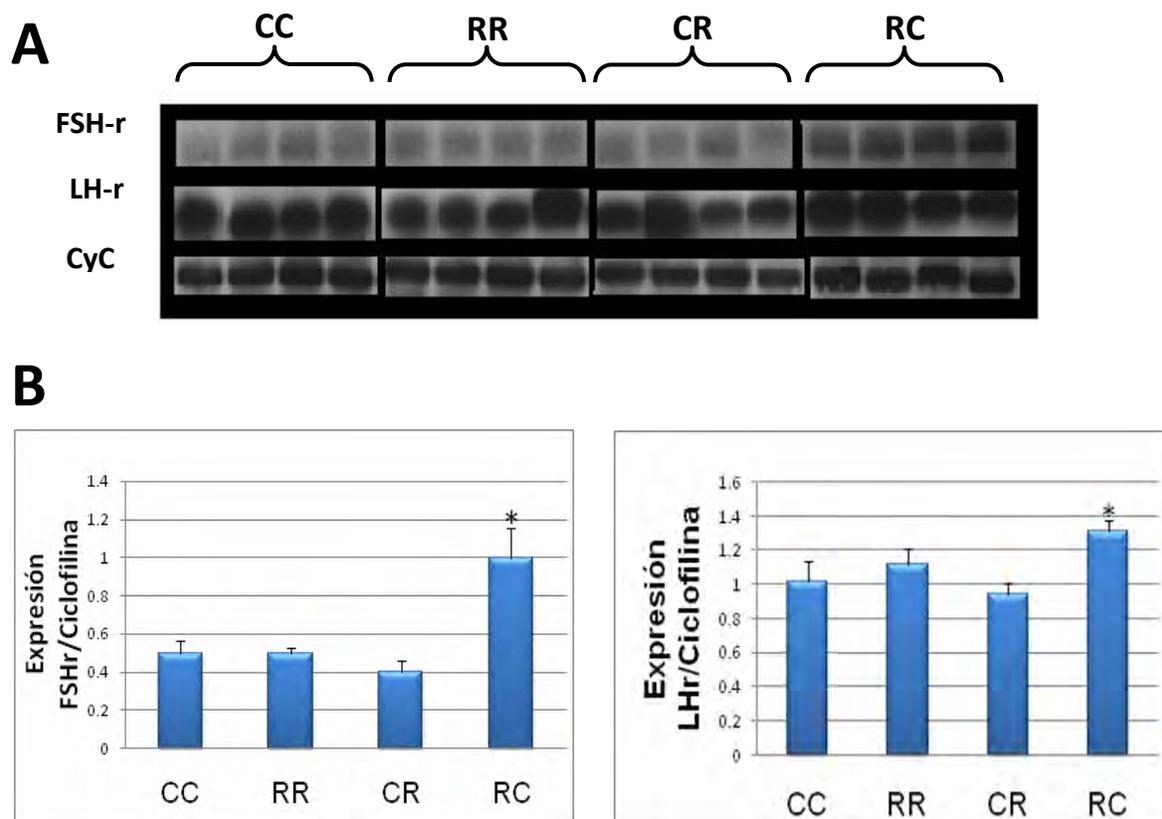


Figura 17. Expresión relativa del receptor de FSH y del receptor de LH a los 14 días de edad. En la figura se observan dos paneles, panel A y B. En el panel A se encuentran los *southern blots* correspondientes a los genes del receptor de FSH del receptor de LH y de la ciclofilina. En el panel B se encuentran las densitometrías correspondientes a los genes con respecto al gen constitutivo ciclofilina. Las crías macho provienen de madres que fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dieta C (control, caseína 20%) o con dieta R (restringida, caseína 10%). ANOVA. Media \pm error estándar. * $p < 0.01$ Vs CC n=6 camadas por cada grupo.

6.- Apertura de luz tubular

Para determinar el porcentaje de luz tubular, se contaron todos los túbulos transversales de un corte histológico de testículo, incluyendo los que no y los que si presentaban apertura de luz tubular (Figura 18).

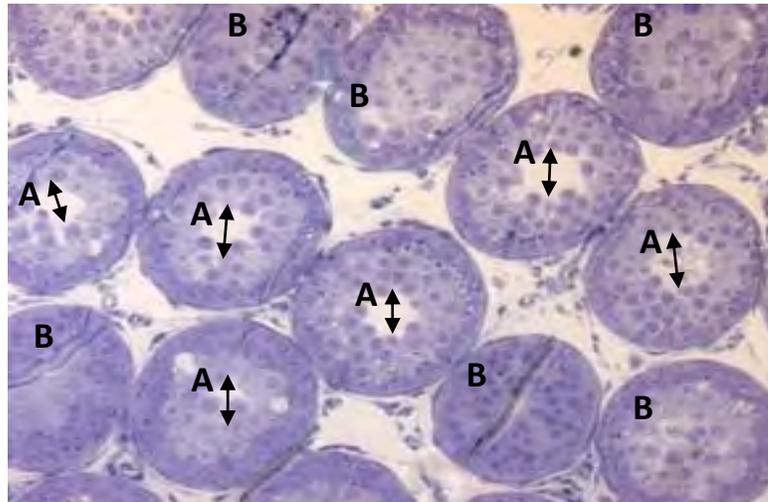


Figura 18. Corte de 10µm de testículo incluido en parafina y teñido con hematoxilina y eosina. Se observa con el objetivo 40x. **A=** túbulos seminíferos con apertura de luz. **B=** túbulos seminíferos sin apertura de luz. Las crías macho provienen de madres que fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dieta C (control, caseína 20%) o con dieta R (restringida, caseína 10%).

Al día 14 de edad el 10% del total de los túbulos del grupo control ya presentaban apertura de luz, mientras que para cualquiera de los tres grupos restringidos ni siquiera un solo túbulo presentó apertura de luz tubular.

Al día 15 de edad los resultados muestran que ya más del 50% del total de los túbulos del grupo control ya presentan apertura de luz tubular, mientras que en cualquiera de los tres grupos restringidos en uno o ambos periodos no se alcanza ni siquiera un 20% de apertura de luz tubular, dichos resultados son estadísticamente significativos con respecto al control $p < 0.01$. La misma tendencia se observa a los 16 y a los 17 días de edad.

Cabe resaltar que para la edad más grande en la que se realizó este estudio (17 días de edad) también se observó el mismo comportamiento, donde ya más del 70% de los túbulos del grupo control presentan apertura de luz tubular, mientras que para los tres grupos restringidos no se alcanza ni siquiera el 30% de apertura de luz tubular (Figura 19).

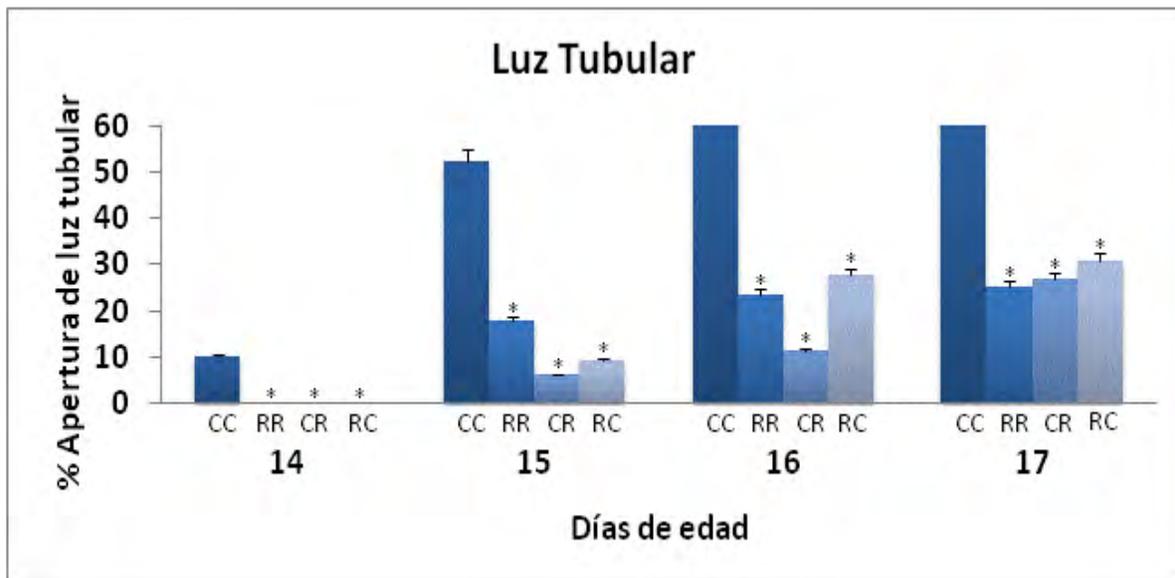


Figura 19. Apertura de luz tubular en cortes histológicos de testículos a distintas edades de las crías macho provenientes de madres que fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dieta C (control, caseína 20%) o con dieta R (restringida, caseína 10%). ANOVA. Media \pm error estándar. * $p < 0.01$ Vs CC a la misma edad $n=6$ camadas por cada grupo.

VIII.

Discusión

Los estudios previos demuestran que la restricción proteínica materna durante la gestación y/o lactancia afecta a las crías machos en su desarrollo testicular en edades adultas debido a cambios fisiológicos, bioquímicos, celulares y moleculares que podrían conducir al macho a temprana disminución en la tasa de fertilidad en vida adulta⁷, sin embargo el efecto de la restricción proteínica va a depender de la discrepancia que exista entre el ambiente intrauterino y el post natal en el que se desarrolle la cría macho⁴⁶, es por eso que se esperan distintos cambios en los cuatro grupos experimentales utilizados.

El grupo CR, no se preparó intrauterinamente para un ambiente postnatal adverso, por lo que al encontrarse en este ambiente tuvo que hacer ajustes que le permitieran sobrevivir, sin embargo en este proceso se podría comprometer el desarrollo de algunos órganos.

Por lo contrario el grupo RC, al crecer intrauterinamente en un ambiente de restringido proteínicamente, se preparó para un medio adverso en la vida post natal, sin embargo al no ser así, las repuestas adaptativas no fueron las mejores, ya que este grupo, es el que desarrolla obesidad en vida adulta con diversas alteraciones metabólicas que pudieran repercutir en el desarrollo sexual^{7, 8, 11, 31}.

En este aspecto el grupo que mejor respuesta tendría sería el RR, ya que se adaptó para sobrevivir a un medio ambiente adverso y creció en el medio para el cual se preparó. Esto corresponde con la hipótesis de la restricción nutricional crónica, que nos dice que los individuos que presentan este tipo de restricción deberían estar mejor adaptados al medio pobre en alimento en comparación con los que no han sido habituados a el.

En estudios anteriores se observó que la restricción proteínica materna durante la gestación elevó las concentraciones séricas de glucocorticoides (cortisol en el humano, corticosterona en la rata)⁷, por lo cual se produjo sobre exposición fetal a corticosterona, que se asocia al bajo peso en el nacimiento³⁵, tal y como se observó en nuestros resultados.

La concentración de testosterona también se incrementa en ratas gestantes⁷, lo cual ha sido la base para estudiar la programación que existe por exposición temprana a andrógenos^{25, 27}, los cuales en su totalidad muestran masculinización genital²⁴,

observándose un incremento en la distancia ano-genital, utilizado como marcador de diferenciación sexual al nacimiento.

En nuestros resultados las crías machos de madres restringidas durante la gestación, presentaron incremento en este parámetro morfométrico, que sin duda alguna se debe a las concentraciones altas séricas de corticosterona y testosterona típicas de este grupo durante este periodo.

Otro parámetro morfométrico observado al nacimiento y que se relaciona con la calidad del ambiente intrauterino es la relación cefálico-abdominal. La desproporción que existe entre el diámetro cefálico y diámetro abdominal es un indicador de desnutrición moderada, debido a que el flujo de nutrientes favorece al cerebro a costa de los órganos presentes en el estómago. Por lo contrario una relación simétrica indica desnutrición severa, donde el flujo de nutrientes es equitativo para el cerebro y los demás órganos, pero es muy pobre para ambos, sacrificando el crecimiento generalizado¹⁴.

En el experimento el tipo de desnutrición que se observó fue moderado, ya que se presentó desproporción entre el diámetro cefálico y el diámetro abdominal.

La ganancia de peso materno durante la gestación depende en gran medida de la calidad de alimentos que recibe y se encuentra muy relacionada con la ganancia de peso fetal. En este trabajo el efecto de la restricción proteínica materna durante la gestación, lactancia o ambos periodos, correspondió a las respuestas predictivas adaptativas, que se esperaban en los distintos grupos, las crías macho del grupo RC nacieron con peso significativamente menor a las del grupo control sin embargo lo recuperan para la segunda mitad de la lactancia, igualando en peso a las del grupo control, estos datos concuerdan con la observado en estudios anteriores donde las crías que nacen con bajo peso al encontrarse en un ambiente postnatal de abundancia empiezan a ganar peso y por lo general desarrollan obesidad en vida adulta^{7, 8, 11, 31}.

De igual manera esto concuerda con lo observado en estudios anteriores por la Dra. Zambrano¹¹, donde se realizó una curva de crecimiento hasta los 120 días de edad de crías ratas provenientes de madres expuestas a restricción proteínica encontrándose los mismos resultados, donde los grupos RR y CR son los que tiene menor peso y nunca alcanzan en tamaño a los del grupo CC.

Durante el desarrollo de los órganos existen periodos críticos donde hay mayor plasticidad, es decir mas probabilidad de que el genotipo cambie por la influencia del medio ambiente¹⁰, como paso durante la gestación y/o lactancia en los grupos restringidos, donde se comprometió el desarrollo del testículo reflejándose en la

disminución de su peso absoluto, que se observó durante todas edades estudiadas (15, 16 y 17 días).

En la rata, la gestación es un periodo muy importante para la maduración del eje hipotálamo-hipófisis^{17, 19}, donde el estado nutricional de la madre es muy importante para la adecuada secreción de las hormonas responsables de la diferenciación, proliferación y maduración celular testicular (LH y FSH) de las crías.

La programación de la capacidad reproductiva comienza desde la gestación donde el eje hipotálamo-hipófisis-gónada es muy susceptible a cambios en la nutrición³⁶.

Se ha estudiado la ontogenia en función del hipotálamo fetal en el ganado ovino, administrando un antagonista de la secreción de gonadotrofinas⁴⁷. En conjunto, estos resultados demuestran que existe una ventana crítica durante la gestación donde el desarrollo testicular se ve afectado por la inactivación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Las concentraciones de FSH se observaron disminuidas, al igual que la masa testicular y el número de células de Sertoli en etapas neonatales⁴⁷.

También la desnutrición ocasiona disminución en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-testículo^{7, 36, 39}. En nuestros resultados se esperaba que hubiera una clara disminución de los valores de FSH y de testosterona en los grupos restringidos, sin embargo no fue así, pero si hay un retraso en la apertura de luz tubular lo que nos dice que la maduración de la célula de Sertoli se está viendo retrasada debido a la restricción proteínica.

Es importante mencionar que la proliferación de la célula de Sertoli se lleva a cabo bajo la influencia de la hormona FSH a través de su receptor en dicha célula y que sólo prolifera en los primeros días de vida postnatal, en la rata aproximadamente hasta 14 días de edad. Se sabe que cuando la célula de Sertoli termina de proliferar es porque ya se encuentra madura y empieza a formar la barrera hematotesticular abriendo paso a luz tubular^{16, 48, 49}. En nuestros resultados se esperaba que hubiera diferencias significativas en las concentraciones de FSH, sin embargo no fue así y si lo fue para la apertura de luz tubular, lo que nos indica directamente que hay un retraso en la maduración testicular, bastante importante ya que las células de Sertoli que no migran a la periferia degeneran y mueren⁹.

Como sabemos la reproducción es uno de los procesos primordiales dentro del organismo, por lo que al haber una desventaja el organismo busca mecanismos que le permiten adaptarse por lo que la sobre expresión del receptor de FSH en el grupo RC

puede ser un mecanismo adaptativo que le permitió llevar a cabo la maduración de la célula de Sertoli en este grupo.

Por otra parte la LH ejerce su acción a través de su receptor en células de Leyding estimulando la esteroidogénesis y así la producción de testosterona. Una manera indirecta de medir el funcionamiento del complejo sustrato receptor es midiendo el producto final, en este caso la testosterona, en nuestros resultados no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de testosterona, lo que nos dice que también las células adoptan mecanismos que les permiten funcionar mejor, ese es el caso del grupo RC ya que presenta sobre expresión del receptor de LH, que le permitió mantener las concentraciones de testosterona.

Como ya se había mencionado, si el desarrollo testicular no ocurre en tiempo y forma adecuada las células degeneran y mueren⁹, por lo que desde un inicio las crías macho provenientes de madres restringidas durante la gestación y/o lactancia inician con desventajas, que durante la juventud no se notan, sin embargo en edades adultas empieza a observarse menor cuenta espermática, que conduce a un envejecimiento prematuro de la tasa de fertilidad⁷.

Conclusiones

El estado nutricional de la madre durante la gestación y/o lactancia es muy importante para el desarrollo sexual en los machos, cualquier cambio en la alimentación conducirá retraso en el desarrollo sexual.

En consecuencia la restricción proteínica materna durante la gestación y/o lactancia programará alteraciones funcionales en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo desde etapas neonatales en las crías macho que retrasan el desarrollo testicular, lo que origina el envejecimiento prematuro de la fertilidad.

Con base en los resultados obtenidos se encontró una ventana crítica durante el desarrollo sexual en las crías macho como lo es el perinatal.

Bibliografía

1. Guyton Arthur C. John E. Hall. ***Tratado de fisiología Médica***. Interamericana McGraw Hill. 9° edición. México 1996. Pp.1099-1114
2. Best West John. ***Bases fisiológicas de la práctica médica***. Panamericana. 12° edición. Argentina 1993. Pp 1018-1034
3. Fabrini A. and E. S. E. Hafez. ***Human reproduction***. Harper and Row. New York 1980. Pp 35-48
4. Artur W. Ham. David H. Cormack, Ph. D. ***Histología de Ham***. Oxford University Press. 9° edición. 1988. Pp 798-824
5. Parvinen M. ***Regulation of the seminiferous epithelium***. Endocrinology Rev 3: 404-417 1982
6. Ganong William F. ***Fisiología Médica***. El manual moderno 15° edición. México 1996. Pp 473-482
7. Zambrano E., Rodríguez-González G. L., Guzmán C., García-Becerra R., Boeck L., Díaz L., Menjivar M., Larrea F. and Nathanielsz P. W.. ***A maternal low protein diet pregnancy and lactation in the rats impairs male reproductive development***. J Physiol 2005; 563-1: 275-284
8. Guzmán C., Cabrera R., Cárdenas M., Larrea F., Nathanielsz P. W. and Zambrano E. ***Protein restriction during fetal neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny***. J Physiol 2006; 572-1: 97-108
9. Viguera-Villaseñor Rosa María, Moreno-Mendoza Norma Angélica, Reyes-Torres Gabriela, Molina-Ortiz Dora, Cárdenas León Mario, Rijas Castañeda Julio Cesar. ***The effect of estrogen on testicular gonocyte maturation***. J Reproductive Toxicology 2006
10. Baker D. J. P., PhD, MD. ***The developmental origins of adult disease***. Journal of Nutrition 2004; Vol. 23-6: 588s-595s

11. Zambrano E., Bautista C, J., Deás M., Martínez-Samayoa P. M., González-Zamorano M., Ledesma H., Morales J., Larrea F. and Nathanielsz P. W. ***A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat.*** J Physiol 2006; 571-1: 221-230
12. Langley- Evans Simon C. ***Developmental programming of health and disease.*** Proc. Nutr. Soc. 2006; 65-1: 97-105
13. Wu Guoyao, Fuller W., Meininger Cynthia J, and Spencer Thomas E. ***Maternal Nutrition and fetal Development.*** The Journal of Nutrition 2004; 2169-2172
14. Nathanielsz Peter W. ***Animal Models That Elucidate Basic Principles of Developmental Origins of Adult Diseases.*** 2006; Vol. 47-1: 73-82
15. Larry Jhonson, Donald L. Thompson Jr., Dickson D. Varner. ***Role of Sertoli cell number function on regulation of spermatogenesis.*** Animal Reproduction Science 2008; 105: 23-51
16. Petersen Cecilia. ***The Sertoli Cell-A Hormonal Target and Super Nurse for Germ Cells That Determines Testicular Size.*** Horm Res 2006;66:153-161
17. Audrey M. Cummings and Robert J. Kavlock. ***Function of sexual glands an mechanism of sex differentiation.*** The journal toxicological Sciences 2004; Vol. 29-3: 167-178.
18. McElreavey, K. Vilain , E. Abbas, N. Herskowitz, I. Fellous, M. ***A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY repress a negative regulator of male development.*** Proc. Natl. Acad 1993; 90: 3368-72
19. Swain, A. and Lovell-Badge, R. ***Mammalian sex determination: a molecular drama.*** Genes Dev 1999; 13: 755-67
20. Allard S., Adin P., Guedard L., Di Clemente N., Josso N., Orgebin Crist M. C., Picard J. Y., Xavier F., ***Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct regression: involvement of beta-catenin.*** Development 2000: 127; 3349-60.

21. Brian P. Hermann, Kaori Hornbaker, Daren A. Rice, Michele Sawadogo and Leslie L. Heckert. ***In vivo regulation of FSH-receptor (Fshr) by the transcription factors USF1 and USF2 is cell.*** Endocrinology 2008
22. Stocco DM. ***The role of the StTAR protein in steroidogenesis: challenges for the future.*** J Endocrinol 2000; 164(3): 247-53.
23. Tresguerres J. A. F. ***Fisiología humana.*** McGraw-Hill Interamericana 2^{da} edición. Madrid 1999. Pp 1034-1039
24. Welsh Michelle, Philippa T.K. Saunders, Fiske Mark, Hayley M. Scott, Gary R. Hutchison, Lee B. Smith, and Richard M. Sharpe. ***Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism.*** The Journal of Clinical Investigation 2008; 118-4: 1479-1490
25. Atanassova N., McKinnell C., Walker M., Turner K. J., Fisher J. S., Morley M., Millar M. R., Groome N. P., And Sharpe R. M.. ***Permanent Effects of Neonatal Estrogen Exposure in Rats on Reproductive Hormone Levels, Sertoli Cell Number, and the Efficiency of Spermatogenesis in Adulthood.*** Endocrinology 1999; vol 140-11: 5365-5373
26. Boulogne Barbara, Olaso Robert, Levacher Christine, Durand Philippe And Habert Reneâ. ***Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during fetal and neonatal development.*** International Journal of Andrology 1999; 22: 356-365
27. Heather Johnston, Paul J. Baker, Margaret Abel, Harry M. Charlton, Gary Jackson, Lynne Fleming, T. Rajendra Kumar, And Peter J. O'shaughnessy. ***Regulation of Sertoli Cell Number and Activity by Follicle-Stimulating Hormone and Androgen during Postnatal Development in the Mouse.*** Endocrinology 2003; 145(1):318–329
28. Toppari, Jorma, Larsen, John Chr. ***Male reproductive health and environmental xenoestrogens.*** Environmental Health Perspectives Supplements 1996; 104-4
29. Richard M. Sharpe, Chris McKinnell, Catrina Kivlin and Jane S. Fisher. ***Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood.*** Reproduction 2003 **125**, 769–784
30. Karen A. L. Tan, Karel De Gendt, Nina Atanassova, Marion Walker, Richard M. Sharpe, Philippa T. K. Saunders, Evi Denolet, and Guido Verhoeven. ***The Role of***

- Androgens in Sertoli Cell Proliferation and Functional Maturation: Studies in Mice with Total or Sertoli Cell-Selective Ablation of the Androgen Receptor.*** Endocrinology 2004; 146(6):2674–2683
31. Jonathan C. K. Wells. ***The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect.*** Biol. Rev. (2007), 82, pp. 143–172.
32. Fowden A L and Forhead A J. ***Endocrine mechanisms of intrauterine programming.*** Society for Reproduction and Fertility 2004; 1470–1626: 1741–7899
33. Hayley M Scott, Gary R Hutchison, Matthew S Jobling, Chris McKinnell, Amanda J Drake, Richard M Sharpe. ***Relationship between androgen action in the ‘male programming window’, fetal Sertoli cell number and adult testis size in the rat.*** Endocrinology 2008
34. William H Walker and Jing Cheng. ***FSH and testosterone signaling in Sertoli cells.*** Society for Reproduction and Fertility 2005; 1470–1626: 1741–7899
35. Caroline E. Bertram and Mark A. Hanson. ***Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids.*** Reproduction (2002); **124**: 459–467
36. Stewart M. Rhind, Michael T. Rae and Nigel Brooks. ***Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis.*** Reproduction 2001; 122: 205-214
37. Leonhardt Marion, Lesage Jean, Croix Dominique, Dutriez-Casteloo Isabelle t, Jean Beauvillain C. and Dupouy Jean P. ***Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty.*** Biology of reproduction 2003; 68: 390-400
38. Ravelli A. C., Van der Meulen J. H., Michaels R. P. ***Glucose tolerance in adults after prenatal exposure of famine.*** Lancet 1998; 351: 173-177
39. Fowden A. L and Forhead A. J. ***Endocrine mechanisms of intrauterine programming.*** Reproduction 2004; 1: 515-526
40. Martin-Gronert M. S. and Ozanne S. E.. ***Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring.*** Biochemical Society 2006; 34-5: 779-782

41. Orth JM, Gunsalus GM and Lamperti AA ***Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid numbers in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development.*** *Endocrinology*(1988); **122**: 787–794
42. Godfrey K., Barker D J., Peace J, Cloke J., Osmand C., ***Regulation of fingerprints and shape of the palm to fetal growth and adult blood pressure.*** *BMJ* 1993; 307:405-409
43. Holness M. J., Langdown M. L., Sugden M. C., ***Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and development of type 2 diabetes mellitus.*** *Biochem J.* 2000; 349-3: 657-665
44. Barker D. J. P., ***Mothers, babies and health in later life 2^{da} ed. Edinburg.*** Churchill Livingstone.
45. Khan I., Dekou V., Hanson M., Poston L., Taylor P., ***Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring.*** *Circulation* 2004; 110: 1097-1102
46. Gluckman P. D., Hanson M. A. ***Living with the past: evolution, development and patterns of disease.*** *Science* 2004; 305: 1733-1736
47. Brooks A. N. and Thomas G. B. ***Ontogeny and function of the pituitary gonadal axis during fetal developmental sheep.*** *Reproductions in domestic animals* 1995; 30: 158-162.
48. Karel De Gendt, Johannes V. Swinnen, Philippa T. K. Saunders, Luc Schoonjans, Mieke Dewerchin, Ann Devos, Karen Tan, Nina Atanassova, Frank Claessens, Charlotte Le´ cureuil_, Walter Heyns, Peter Carmeliet, Florian Guillou, Richard M. Sharpe†, and Guido Verhoeven. ***A Sertoli cell-selective knockout of the androgenreceptor causes spermatogenic arrest in meiosis.*** *Medical Sciences* 2004; 101-5; 1327-1332.
49. Sarah J Meachem, Saleela M Ruwanpura, Jessica Ziolkowski, Jacquelyn M Ague, Michael K Skinner and Kate L Loveland. ***Developmentally distinct in vivo effects of FSH on liferation and apoptosis during testis maturation.*** *Journal of Endocrinology* 2005; 186: 429–446.



XXX REUNIÓN BIENAL DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE INVESTIGADORES EN REPRODUCCIÓN HUMANA

El Encargo Alida...



Certificamos que **Rodríguez-González G.L.; Millán J.S; Viguera-Villaseñor R.M.; Larrea F; Zambrano E.**

ha participado en carácter de **Trabajo de investigación: Efectos de la restricción proteínica materna de la rata en la maduración de los gonocitos testiculares de la progenie**

en la presente Reunión.

Buenos Aires, abril de 2007

Carlos Nagle
Presidente Comité Organizador

Edith A. Pantelides
Presidente Comité Científico

Luis Bahamondes
Presidente ALIRH

Auspicia



medicina

BUENOS AIRES VOL. 67 SUPL. 1 - 2007

*XX Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana
de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH)*



Este bioensayo presentó para la variable PV una sensibilidad de 90.00%, especificidad de 62.50% y una clasificación correcta de 77.78%. Para la variable VS una sensibilidad de 77.78%, especificidad de 44.44% y una clasificación correcta de 61.11%. La variable GP mostró una alta sensibilidad pero muy baja especificidad y una clasificación correcta de 66.67%. **Conclusión:** La administración de MRL (1.21 g/Kg) por 14 días y la evaluación del peso prostático es un adecuado bioensayo para MR. Así mismo, el tratamiento combinado es más efectivo que por separado al reducir los niveles del zinc a valores similares al control. Parece existir una regulación diferencial entre el tamaño de la próstata y el nivel del zinc.

71. GONADOTROPINAS (FSH, LH, PRL) Y TESTOSTERONA EN VARONES A NIVEL DEL MAR Y EXPUESTOS A LA ALTURA (3280 y 4540 m). Mujica E¹, Zuñiga H¹, Cebrenos H¹, Allaga J², Ronceros G³, Pondiano W¹, Torres J¹.

¹Instituto Nacional de Biología Andina, Facultad de Medicina, UNMSM, Lima, Perú; ²Escuela de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias y Filosofía, UPCH, Lima, Perú; ³Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, UNMSM, Lima, Perú.

Es conocido que la exposición a la hipoxia de altura modifica la secreción y/o el metabolismo de diferentes hormonas entre ellas la de los ejes reproductivo, sin embargo los valores reportados por diferentes autores difieren entre ellos, esto se debería a diferentes factores entre ellos al nivel de altitud estudiado. Con el objeto de establecer los valores de las hormonas del eje masculino en la exposición aguda a la altura en relación a los niveles de altitud, presentamos el presente trabajo en donde mostramos los primeros datos ya que aumentaremos nuestra casuística a fin de tener valores referenciales en diferentes altitudes. **Objetivos:** 1.- Obtener los valores de gonadotropinas (LH, FSH, PRL) y testosterona en varones nativos del nivel del mar y expuestos a 3280 m y 4540 m de altitud. 2.- Comparar los valores de gonadotropinas (LH, FSH, PRL) y testosterona obtenidos a nivel del mar, a 3280 m y a 4540 m de altitud. 3.- Comparar los valores obtenidos con los existentes en la literatura. Se trabajó dos grupos experimentales: Huancayo (3280m), Morococha (4540m). Se determinó el buen estado de salud de los sujetos experimentales mediante un examen clínico. En condiciones de reposo, en ayuno y en las primeras horas de la mañana se tomó la muestra de sangre del antebrazo para análisis de: FSH, LH, PRL y Testosterona por RIA. Dos días antes del viaje los sujetos de experimentación fueron sometidos a las mismas pruebas de altura. En la altura se trabajó los días 1, 3 y 5 de exposición. **Resultados y conclusiones:** En el grupo expuesto a 3280 m no encontramos diferencias significativas en los valores de FSH, LH, PRL y T con respecto al nivel del mar hasta los 5 días de exposición. En el grupo expuesto a 4540 m se encontró diferencia significativa en los valores de PRL (< 0.05) desde el 3º día de exposición. No se encontró diferencia significativa en los valores de FSH. Se encontró diferencia significativa en los valores de LH (< 0.05) y T al 5º día de exposición. **Conclusiones:** El eje hipofísico testicular sufre variación en su secreción hormonal por efecto de la exposición aguda a las grandes alturas no así a medianas alturas.

72. EFECTO DE 7 α -METIL-19-NORTESTOSTERONA SOBRE LA ACTIVIDAD SECRETORA Y PROLIFERATIVA DE CÉLULAS DE HIPERPLASIA BENIGNA Y CARCINOMA PROSTÁTICO HUMANO EN CULTIVOS PRIMARIOS. Mendoza P¹, Sánchez C¹, Contreras H¹, Vergara J¹, Acevedo C², Huidobro C³, Noé G³, Castellón E¹

¹Laboratorio de Andrología Celular y Molecular, Programa de Fisiología y Biofísica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile; ²Servicio de Urología, Hospital Clínico, Universidad de Chile; ³Instituto Chileno de Medicina Reproductiva.

La 7 α -metil-19-nortestosterona (MENT) es un andrógeno sintético con actividad androgénica y anabólica más potente que la testosterona (T). Estudios en animales han mostrado que MENT es resistente a la reducción por la enzima 5 α -reductasa. Estas propiedades le otorgan ventajas potenciales como andrógeno para terapia de reemplazo y anticonceptivo masculino. Estudios clínicos en hombres sanos han mostrado que niveles circulantes de MENT 10 veces menores que los de T mantienen los efectos androgénicos deseados y no alteran ni el volumen prostático ni los niveles del antígeno prostático específico (PSA). Actualmente no hay investigaciones a nivel celular para determinar los posibles efectos de este andrógeno sobre la glándula prostática hiperplásica o con lesión maligna. El objetivo de este trabajo fue evaluar comparativamente los efectos de MENT, T y dihidrotestosterona (DHT) sobre la proliferación celular y la secreción de PSA en cultivos primarios de células provenientes de hiperplasia prostática benigna (HPB) y carcinoma de próstata (CaP). **Metodología:** Los cultivos de HPB y CaP se trataron con 1, 10 y 100 nM de T, MENT y DHT por 24 y 48 horas. La proliferación celular se evaluó mediante la formación de cristales de 3-(4,5-dimetiltilazol-2-yl)-2,5-difenil metano (MTT) por espectrofotometría y la expresión de la proteína Ki-67 por inmunocitoquímica. La secreción de PSA se midió mediante el inmunoensayo enzimático de micro partículas. Además, se examinó la potencia de los andrógenos en presencia de finasterida, para determinar la influencia de la 5 α -reductasa. **Resultados y conclusiones:** En ausencia de finasterida, MENT estimula el crecimiento de células de HPB y de CaP con una potencia similar a T y un orden de magnitud menor que DHT. La potencia de MENT sobre la actividad secretora de ambos cultivos fue un orden de magnitud mayor y menor que T y DHT, respectivamente. En presencia de finasterida los efectos de T disminuyeron y no se modificaron las respuestas a MENT ni DHT. Esto indica que en ambos cultivos la 5 α -reductasa se mantiene activa y puede transformar T en DHT y comprueba, en células humanas, que MENT no es sustrato de la 5 α -reductasa. Se concluye que MENT es un buen candidato como sustituto de andrógeno para tratamientos prolongados. En caso de patología prostática, debido a que MENT se requiere en dosis muy bajas, se prevé un efecto considerablemente inferior al de T sobre la proliferación celular y la secreción de PSA, sin embargo su uso debe considerarse y controlarse estas acciones. Financiado por Population Council, USA.

73. EFECTOS DE LA RESTRICCIÓN PROTEÍNICAMENTE MATERNA DE LA RATA EN LA MADURACIÓN DE LOS GONOCITOS TESTICULARES DE LA PROGENIE. Rodríguez-González GL, Millán JS, Viguera-Villaseñor RM, Larrea F, Zambrano E

Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.

En la rata macho, los primeros 3 a 5 días postnatales son cruciales para el inicio exitoso de la espermatogénesis y futura capacidad reproductiva, si por alguna razón la maduración no se lleva a cabo en la forma adecuada en esa época, los gonocitos degeneran. Estudios en la rata han demostrado que la desnutrición durante el desarrollo reduce la capacidad reproductiva del macho en la vida adulta, sin embargo poco se conoce sobre los efectos de un ambiente subóptimo perinatal en el desarrollo sexual de la rata. **Objetivos:** Estudiar la maduración de los gonocitos testiculares (proliferación y migración) de ratas macho provenientes de madres restringidas proteínicamente durante el embarazo y la lactancia. **Metodología:** Se emplearon ratas Wistar preñadas alimentadas con dietas isocalóricas con contenido normal (C) o restringido (R) de proteína. Al nacimiento la camada fue ajustada a 12 crías. Los grupos experimentales fueron: control (CC), restringido durante el embarazo y la lactancia (RR), restringido únicamente en la lactancia (CR) o durante el embarazo (RC). Al día 7 postnatal se obtuvieron los testículos, los cuales fueron fijados en solución de Karnovsky e incluidos en Epon 812; se realizaron cortes de 1 μ m de grosor y teñidos con azul

de toluidina para ser observados al microscopio óptico. Se contaron el número de células de Sertoli y gonocitos totales (ubicados en el centro y los que migraron a la lámina basal) en al menos 36 cordones seminíferos que se encontraron en corte transversal. Los datos son expresados como la media \pm EE y los grupos comparados por ANOVA. **Resultados:** El número de células de Sertoli por cordón seminífero fue menor en ambos grupos restringidos durante la gestación (RR y RC), la cantidad de gonocitos totales fue menor en todos los grupos experimentales con respecto al control, sin embargo, únicamente fue significativo en los grupos CR y RC. La migración de los gonocitos a la periferia se vio retrasada en el grupo RR con respecto al resto de los grupos, el % de gonocitos que migraron a la lámina basal a los 7 días de edad fue de CC: 98%, RR: 11%, CR: 94% y RC: 89%. **Conclusión:** La restricción proteínica materna en la rata disminuye en la progenie la proliferación celular testicular y la migración de los gonocitos a la lámina basal. La ausencia de la correcta maduración de los gonocitos puede ser la causa de la posterior disminución de la tasa de fertilidad en la vida adulta.

74. ESTUDIO DE LA ASOCIACION ENTRE LA EXPRESION DE PROTEINAS DE MULTIRRESISTENCIA A DROGAS Y EL GRADO DE MALIGNIDAD TUMORAL EN EL CANCER DE PRÓSTATA. Vergara J¹, Morales B², Huidobro C², Contreras HR¹, Castellón E¹

¹Laboratorio de Andrología Celular y Molecular, Programa de Fisiología y Biofísica, ICSM, Facultad de Medicina, U. de Chile; ²Servicio de Anatomía Patológica, Hospital DIPRECA; ³Servicio de Urología, Hospital Clínico U. de Chile.

La expresión aumentada de proteínas de multiresistencia a drogas (MDR) se ha descrito en algunos tipos de cáncer. El cáncer prostático es especialmente resistente a la quimioterapia y existe poca y contradictoria información acerca de los cambios en la expresión de estas proteínas y su relación con el grado de malignidad tumoral. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de proteínas MDR en carcinoma prostático humano de distintos grados de malignidad. **Metodología:** Se realizó un análisis inmunohistoquímico de tres proteínas MDR: Gly-P, MRP-1 y LRP en tejido obtenido de archivos de biopsias de los Hospitales J. J. Aguirre de la Universidad de Chile y DIPRECA, correspondientes a hiperplasia prostática benigna (HPB), carcinoma prostático con bajo y alto grado de Gleason y un grupo con metástasis positivas. Se utilizaron anticuerpos policlonales específicos y el sistema de amplificación de estreptavidina-biotina-peroxidasa y diaminobencidina. **Resultados y conclusiones:** Se encontró que la expresión de las tres proteínas estudiadas estaba asociada exclusivamente a las células epiteliales glandulares. Gly-P mostró una distribución en membranas y su intensidad fue mayor en los tumores de mayor malignidad. MRP-1 se distribuyó en membranas y homogéneamente en el citoplasma. La proteína LRP se expresó muy intensamente en epitelios glandulares transformados y no se observó marca en epitelio normal vecino. En el grupo de biopsias de HPB se observó una marcación inmunológica muy leve para las 3 proteínas estudiadas. Concluimos que los patrones de expresión de las proteínas Gly-P, MRP-1 y LRP son similares a los descritos en otros tipos de tejidos. Se observó una asociación positiva entre los niveles de estas proteínas MDR y el grado de malignidad tumoral, lo que podría sugerirnos como posibles marcadores pronósticos y potenciales blancos terapéuticos en el cáncer prostático.

75. ANÁLISIS DE LOS PROCESOS DE CARCINOGENÉISIS E INFLAMATORIO MEDIADO POR LAS PROTEINAS p, COX-2 Y MASTOCITOS EN LA PRÓSTATA HUMANA. Wallers G, Quiroz P, Silva I, Inostroza J, Cuevas J, Huidobro C, Rodríguez H

Laboratorio de Reproducción, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El cáncer de próstata es la tercera causa de muerte por enfermedad neoplásica en los hombres Chilenos. La aparición y progresión de tumores es promovida por un microambiente de inflamación en el cual se reclutan mastocitos y factores pro-inflamatorios que inducen la enzima ciclooxigenasa-2 promoviendo la aparición de características malignas. La familia de las proteínas p (p300, p50 y p65) han sido correlacionadas con cáncer en distintos órganos incluida la próstata. Su sobreexpresión se asocia a la progresión y desarrollo de las características malignas de las células neoplásicas desde un estado inflamatorio previo y a un cambio en la composición del estroma glandular. **Objetivos:** Cuantificar la presencia de la familia de proteínas p (p50, p65 y p300), COX-2, mastocitos y la citoarquitectura glandular de la próstata humana normal y neoplásica. **Material y método:** Las biopsias de tejidos prostáticos humanos se obtuvieron de la Corporación Nacional del Cáncer (CONAC), con consentimiento informado de los pacientes. En secciones de 5 μ m de espesor montadas sobre portaobjetos silanizados se desarrollaron técnicas histológicas especiales e inmunohistoquímicas específicas para las proteínas p300, p65, p50, y COX-2 con anticuerpos primarios de Lab Vision Co. y revelados a través de DAB (Edilab Ltda). Por imágenes digitalizadas y cuantificación a través del software Image J (NIH, 2006), se analizaron las muestras. **Resultados:** Se observa una expresión diferencial de las proteínas de la familia p300, p65, p50 y COX-2 en los distintos tejidos prostáticos en estudio. En tejidos normales la presencia de las proteínas p y de COX-2 es baja; en contraste a lo observado en tejidos neoplásicos donde se identifican valores elevados de estas proteínas y de COX-2. La glándula muestra gran presencia de mastocitos. El estroma de los tejidos cancerosos muestra una composición alta en fibras elásticas y colágeno, con baja presencia de células musculares lisas, que es diametralmente opuesta a la mostrada en la próstata normal. **Conclusión:** La aparición de características malignas en las células prostáticas está correlacionada con el aumento de la expresión de las proteínas de la familia p (p300, p65, p50), COX-2 y con un cambio en la conformación histológica de la arquitectura de la glándula prostática, cambios asociados posiblemente a un estado inflamatorio previo subclínico con una importante presencia de mastocitos.

76. CALIDAD DEL HUESO EN MUJERES DE EDAD MEDIANA. Navarro Despaigne DA¹, Mayans Reina G², Almarales Sierra C², Sosa Palacios O², Rivas Alpizar E², Nicolau Mena O¹

¹Instituto Nacional de Endocrinología; ²Facultad de Estomatología, Ciudad Habana

El déficit estrogénico post menopausia en unión de otros factores (étnicos y culturales) constituyen factores de riesgo para Osteoporosis. Identificar personas con riesgo de fractura permitirá establecer medidas terapéuticas para evitarlas. El ultrasonido de calcáneo es un método económico, rápido y útil para detectar mala calidad del hueso. En nuestro medio, el 15% de la población tiene 50 años y más sin embargo, no se dispone de estudios referentes a Osteoporosis. **Objetivos:** Determinar la frecuencia de mala calidad ósea en mujeres de edad mediana y precisar algunos factores asociados a la misma. **Metodología:** Estudio descriptivo transversal. Grupo constituido por mujeres con edades entre 40 y 59 años procedentes de: a) la atención primaria de salud (n = 252), y b) la Clínica de climaterio y Osteoporosis (ClimOs) n = 70 de ellas 30 padecían Diabetes Mellitus tipo 2 y 40 no. Como grupo control evaluamos 34 mujeres entre 18 y 25 años, sanas. En cada mujer se precisó edad actual, color de piel, tabaquismo, etapa del climaterio, tiempo de evolución de la diabetes, tratamiento hipoglucemiante y niveles de hemoglobina glicosilada. Se precisó la calidad del hueso mediante ultrasonido de calcáneo (SONOST 2000), según valores del BUA (atenuación del sonido /mm²/min) y del SOS (velocidad del sonido) db/MHz, que permitieron establecer valores del punto T (diferencias entre grupo de estudio y control) considerando mala calidad a valores de BUA menores de 65, 25, y de SOS de 1538,5. Diferencias entre grupos mediante Chi cuadrada.

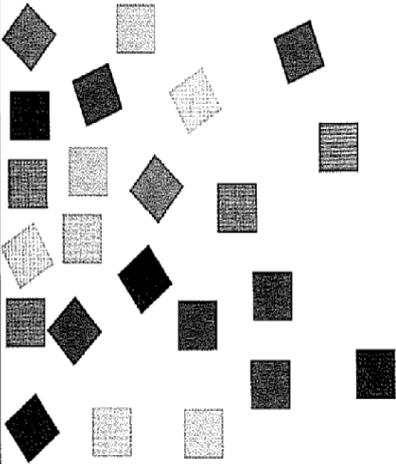


Otorgan la presente
Constancia

A _____
José Sergio Millán

Por su _____
participación

Bases Biológicas de la Conducta XIII Curso
impartido del 16 al 19 de octubre con duración de 30 hrs.
Tlaxcala, Tlax. a 19 de octubre de 2008




Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Director, CTBC-UAT


Dr. José Antonio Arias Montaño
Presidente, SMCF

Efectos de la Restricción Proteínica en la Rata durante la Gestación y/o Lactancia sobre el Desarrollo Testicular del Neonato

José Sergio Millán Canales, Guadalupe Leticia Rodríguez González,

Fernando Larrea Gallo y Elena Zambrano González

Unidad de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
"Salvador Zubirán" (México).

Los primeros dos días de vida son importantes para un buen inicio en el desarrollo testicular de la rata macho, si por alguna razón existe una condición no óptima para su crecimiento, se retrasa la maduración del túbulo seminífero y como consecuencia se ve afectada la espermatogénesis y la esteroidogénesis. Estudios en la rata han demostrado que el estado nutricional de la madre durante la gestación y/o la lactancia es importante debido a que si no es la adecuada, la capacidad reproductiva de las crías macho en vida adulta disminuye.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la restricción proteínica en la gestación y/o lactancia sobre el desarrollo testicular neonatal, cuantificando la concentración sérica de Testosterona y de FSH, midiendo la expresión del receptor de FSH y de LH, y observando apoptosis celular y apertura de luz tubular.

Se trabajó con ratas Wistar preñadas de 10 a 12 semanas de edad con peso aproximado de 240g las cuales fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dietas isocalóricas, dieta C (control, caseína 20%) o dieta R (restringida, caseína 10%). Al nacimiento se ajustó la camada a 10 crías. Se tuvieron cuatro grupos experimentales: control en la gestación y en la lactancia (CC), restringido en ambos periodos (RR), restringido en la lactancia (CR) o en la gestación (RC). Las crías macho se sacrificaron a distintas edades (14 y 15 días) de lactancia por medio de decapitación utilizando una guillotina. La sangre se recolectó para determinar la concentración de

Ciudad de Tlaxcala, México, 16-19 de octubre de 2008

FSH y de testosterona mediante Radio Inmuno Análisis. Los testículos fueron extraídos para determinar su peso al día del sacrificio y se utilizaron para distintos experimentos. El testículo derecho se guardó en el SEVCO a -75°C para evaluar algunos marcadores moleculares como: expresión de la enzima P450 α , del receptor de FSH y del receptor de LH, mediante la técnica de Southern blot. El testículo izquierdo se fijó en Karnovsky o para-formaldehído y se incluyeron en Epon 812 o en parafina; se realizaron cortes de 1 μm de grosor y se tiñeron con azul de toluidina para observar apertura de luz tubular al microscopio óptico o apoptosis por la técnica de TUNEL. La apertura de luz tubular y el peso de testículo se determinaron a los 14 y 15 días de edad, mientras que los demás experimentos sólo se determinaron a los 14 días de edad. Los datos se expresaron como la media \pm EE y los grupos se compararon por ANOVA; $p < 0.05$ para letras distintas.

Encontramos que el peso absoluto (mg) de los testículos a los 14 días de edad fue menor en los grupos restringidos en la lactancia (RR y CR), sin embargo a los 15 días de edad ya se presentó disminución para los tres grupos restringidos con respecto al control (CC: $68.5 \pm 0.2a$, RR: $43.2 \pm 0.2b$, CR: $39.0 \pm 0.08b$, RC: $44.7 \pm 0.07b$). La concentración de FSH (ng/mL) fue menor en el grupo CR, mientras que la concentración de testosterona no se encontraron diferencias significativas sin embargo se observa una tendencia a ser menor en los dos grupos restringidos en la lactancia (RR y CR) (CC: 0.21 ± 0.07 , RR: 0.12 ± 0.04 , CR: 0.09 ± 0.02 , RC: 0.31 ± 0.06). La apertura de luz tubular se vio retrasada a los 14 y 15 días de edad en todos los grupos experimentales con respecto al grupo control (Figura 1a). El número de células apoptóticas por túbulo seminífero fue mayor en los tres grupos restringidos (figura 1b). La expresión relativa de la enzima P450 α no mostró diferencias significativas, mientras que la expresión relativa del receptor FSH se vio aumentada en el grupo RC (CC: $0.5 \pm 0.06a$, RR: $0.5 \pm 0.02a$, CR: $0.4 \pm 0.06a$, RC: $1.0 \pm 0.15b$), este mismo comportamiento se observó en el receptor de LH (CC: $1.0 \pm 0.1a$, RR: $1.1 \pm 0.09a$, CR: $0.9 \pm 0.07a$, RC: $1.3 \pm 0.06b$).

Tronco Curso Bases Biológicas de la Conducta
PLASTICIDAD FENOTÍPICA II (síntesis)

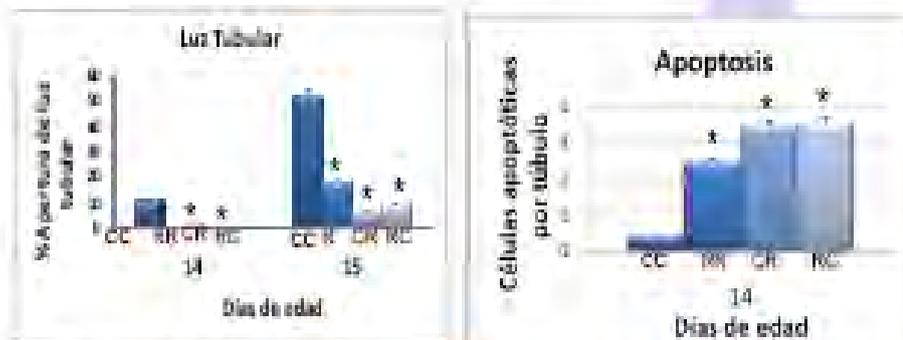


Figura 3. a) % Apertura de luz tubular en cortes histológicos de testículos a 14 y 15 días de edad. b) Células apoptóticas por túbulo en cortes histológicos de testículos a 14 días de edad.

Se trabajó con crías macho provenientes de madres que fueron alimentadas en la gestación y/o lactancia con dieta C (control, caseína 20%) o con dieta R (restringida, caseína 10%). ANOVA. Media \pm error estándar. * $p < 0.05$ Vs CC n=6 camadas por cada grupo.

Conclusión. La restricción proteínica materna en la gestación y/o lactancia repercute directamente sobre el desarrollo testicular neonatal, ya que retrasa la apertura de luz tubular, incrementa la cantidad de células apoptóticas y altera la expresión de los receptores para gonadotropinas, lo que puede conducir a menor producción de espermatozoides y a disminuir la capacidad reproductiva de la cría macho en la vida adulta.

Referencias

- Zambrano F, Rodríguez-Cruzález GL, Guzmán C, Gaita-Becerra R, Brack L, Díaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW (2005) A maternal low protein diet pregnancy and lactation in the rats impairs male reproductive development. J Physiol 563:275-284.