



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

DETERMINACIÓN DE ALTERACIONES EN LAS POBLACIONES
CELULARES DEL TESTÍCULO DE RATAS ADULTAS, MEDICADAS
CON PIRIMETAMINA EN LA ETAPA NEONATAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

CARLOS DURAND MONTAÑO

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Oscar Gutiérrez Pérez
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

ASESORA INTERNA
M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez
FES ZARAGOZA, UNAM



08 de mayo del 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a mis padres quienes desde mi primer día de vida me entregaron la suya, siempre preocupados por mi porvenir y mi bienestar, logrando que yo creciera como persona y finalizara una de mis tantas metas la cual es de gran importancia, ya que me dará las bases para mi vida futura.

También se lo dedico a Nubia Monserrat Serrano Macedo quien siempre estuvo conmigo en las buenas y en las malas, y me apoyó de manera incondicional para que yo pudiera realizar este trabajo.



AGRADECIMIENTOS

A la M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez y al Dr. Oscar Gutiérrez Pérez por su apoyo constante e incondicional a lo largo del desarrollo de mi investigación.

Gracias al INPed, en particular al Dr. Oscar Gutiérrez Pérez y a la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor, por permitirme participar en uno de sus proyectos de investigación y por el apoyo que me dieron para la elaboración del mismo.

Al técnico Pedro Medina Granados por sus consejos en la elaboración de las técnicas de inmunohistoquímica y a la Dra. Margarita Chávez Saldaña junto con Juan Carlos Gutiérrez Santana por su ayuda en el RT-PCR.

Además, agradezco a todos los compañeros del laboratorio de Biología de la Reproducción de la torre de investigación (INPed) por todos sus comentarios que siempre fueron bienvenidos.

Y finalmente, y no por ello menos importante, a los sinodales del examen profesional por su enorme disponibilidad para la revisión escrita de la tesis profesional.



ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	4
1) <i>Incremento en la infertilidad masculina</i>	4
2) <i>Generalidades y modo de acción de la pirimetamina</i>	4
3) <i>Importancia de los Folatos</i>	7
4) <i>Descripción anatomofisiológica de los testículos y de los diferentes tipos celulares que lo integran</i>	8
4.1) <i>Células de Leydig</i>	9
4.2) <i>Proliferación de las células de Sertoli</i>	11
4.3) <i>Gonocitos</i>	12
4.4) <i>Espermatogénesis</i>	13
4.4.1) <i>Fases de la espermatogénesis</i>	13
5) <i>Factores hormonales que estimulan la espermatogénesis</i>	17
6) <i>Eje Hipotálamo-Hipofisario-Gonadal Masculino</i>	18
7) <i>La rata como modelo experimental para el estudio de alteraciones reproductivas</i>	20
8) <i>Efectos de la PIR en ratas y ratones adultos</i>	21
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
<i>Objetivo general</i>	26
<i>Objetivos específicos</i>	26
MATERIALES Y MÉTODO	27
<i>Cálculo de la muestra</i>	29
<i>Cuantificación de células testiculares realizado en cortes semifinos</i>	29
<i>Determinación del índice de maduración del epitelio seminífero (índice de Johnsen)</i> ..	30
<i>Determinación de proliferación celular mediante inmunocitoquímica</i>	31
<i>Determinación de proliferación celular mediante RT-PCR</i>	31



<i>Valoración de la concentración espermática</i>	34
<i>Obtención de los porcentajes de motilidad</i>	35
<i>Evaluación de la morfología espermática</i>	36
<i>Porcentaje de viabilidad</i>	36
<i>Análisis estadístico</i>	36
<i>Consideraciones éticas</i>	37
RESULTADOS	38
<i>Determinación del índice de maduración del epitelio seminífero (Johnsen) y área epitelial</i>	38
<i>Cuantificación de poblaciones celulares de testículos en cortes semifinos</i>	39
<i>Determinación de proliferación celular mediante RT-PCR.</i>	42
<i>Evaluación de fertilidad y resultados del espermograma.</i>	43
ANÁLISIS DE RESULTADOS	
BIBLIOGRAFÍA	
Anexo I Soluciones	63
<i>Fórmula de la solución de medio mínimo de cultivo</i>	63
<i>Solución formulada para conteo espermático</i>	63
<i>Fórmulas para reactivos de la inclusión en parafina</i>	63
<i>Fórmulas para reactivos de la inclusión en Epon</i>	63
<i>Fórmulas para reactivos de inmunohistoquímica</i>	64



RESUMEN

La pirimetamina (PIR) inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa impidiendo la proliferación celular. Por ser la etapa neonatal un periodo crítico en el que se establecen, mediante proliferación, las diferentes poblaciones celulares testiculares, en el presente trabajo se analizó el efecto de la medicación con PIR durante los primeros 21 días de vida de la rata y su posible consecuencia sobre la fertilidad adulta. Para ello, se utilizaron 36 ratas Wistar divididas en tres grupos: grupo PIR, con 25 mg/kg/ PIR cada tercer día, grupo PAF (medicado con PIR y adicionado con 7.5 mg/kg/semana de ácido fólico), y grupo control (vehículo sin medicamento). A los 35 días de edad se detectó la expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) por inmunohistoquímica y por RT-PCR. A los 90 días, además de la expresión de PCNA, se realizó conteo de las poblaciones de células de Sertoli (CS) y germinales, y se evaluó el Índice de Johnsen (IJ). Lo anterior se complementó con pruebas de fertilidad y espermograma. A los 35 días de edad la aplicación de PIR disminuyó el porcentaje de células en proliferación (28.5 ± 7.1 vs. 64.6 ± 2.2 , $p < 0.05$). A los 90 días de edad, el grupo tratado con PIR presentó disminuciones significativas ($p < 0.05$) en los conteos de CS (7.0 ± 0.3 vs. 8.9 ± 0.3), células germinales (190.8 ± 5.9 vs. 244.9 ± 8.7), IJ (0.097 ± 0.03 vs. 0.099 ± 0.00), expresión de PCNA (20.8 ± 0.7 vs. 25.6 ± 0.9) y concentración espermática (28.3 ± 17.6 vs. 42.4 ± 23.4). Por otro lado, la adición de AF disminuyó los efectos negativos de la PIR sobre los conteos de CS y células germinales, IJ, expresión de PCNA y concentración espermática; ya que al compararse el grupo PAF con el grupo control no se registraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Por lo tanto, la aplicación de PIR durante los primeros 21 días de vida afecta los procesos de proliferación de la CS y de los gonocitos en una ventana crítica de proliferación de los mismos, lo cual se ve reflejado en una disminución de la concentración espermática en la rata adulta. El efecto inhibitor de la PIR es dependiente de la presencia del fármaco y su retiro favorece el restablecimiento de la proliferación, aunque la rata adulta no alcanza los parámetros de fertilidad y concentración espermática del control. Una mejoría se observa con la aplicación de AF con lo cual se protege al epitelio seminífero de manera que presenta los mismos parámetros que las ratas control adultas. En conclusión, la aplicación de PIR en una etapa susceptible de proliferación (neonatal), disminuye la concentración espermática en la rata adulta, aunque esta disminución en concentración se ve atenuada por la segunda etapa de proliferación de las CS que se da al inicio de la etapa puberal. De ahí, que la disminución en la concentración espermática en estas ratas no fuera un factor determinante de infertilidad, aunque si de subfertilidad en la rata adulta.

Palabras clave: Pirimetamina, ácido fólico, proliferación celular, células germinales, células de Sertoli, fertilidad.



INTRODUCCIÓN

La pirimetamina (PIR) es un medicamento ampliamente utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades parasitarias. Tal es el caso de la toxoplasmosis congénita, ya que impide la proliferación del parásito que provoca dicha enfermedad. Su mecanismo de acción es la inhibición de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (Nzila, 2006; Adelsberger y col., 2010), enzima que participa en el metabolismo de los folatos, los cuales son todo el grupo de vitaminas del complejo B y que se derivan del ácido fólico. Los folatos participan en la síntesis de purinas y pirimidinas, que a su vez, forman ácidos nucleicos, por lo que la inhibición de la DHFR frena su utilización e impide la replicación celular (Nzila, 2006; Noiriél y col., 2007; Zhang y col., 2011).

Los niños diagnosticados con toxoplasmosis congénita son tratados con PIR, desde el nacimiento hasta los primeros tres meses de edad, aunque los mejores resultados para el control de la enfermedad se dan con tratamientos que abarcan el primer año de vida. Se ha visto que la PIR posee una mayor afinidad por la DHFR del parásito, pero aun así afecta en una menor proporción al paciente. Esto se ve reflejado en las leucopenias transitorias que presentan algunos pacientes, en cuyo caso el fármaco debe ser retirado (Durlach y col., 2008; Durán, 2010). En esos casos, los leucocitos se ven afectados por ser un tipo celular con una alta tasa de proliferación, que es afectada por la PIR. Por otra parte, el periodo de tratamiento coincide con las etapas de proliferación y diferenciación de las células del testículo, procesos que determinarán las poblaciones celulares de la gónada funcional en el adulto. Debido al efecto inhibitorio de la PIR sobre la proliferación celular es muy probable que dicho proceso pudiera verse afectado.

Resultados sobre la acción de la PIR sobre los índices de fertilidad en ratas y ratones machos adultos, muestran que la fertilidad se ve disminuida de manera transitoria debido a una menor concentración espermática y a mayores índices de morfoanomalías (Cosentino y col., 1990; Awoniyi y col., 1993; Murakami y col., 2000; Tumkiratiwong y Lerkchundhakriat, 2011). La fertilidad recupera sus índices normales



al retirar el fármaco, sin embargo, esto se da en animales adultos que presentan ya un testículo funcional donde los procesos espermatoogénicos se encuentran bien establecidos (Kalla y col., 1997). No existen reportes de lo que acontece cuando el tratamiento se da en individuos jóvenes; como sería el caso de ratas durante sus primeros 21 días de vida. Este periodo coincide con la ventana de proliferación de las células germinales y las células de Sertoli de estos individuos, por lo que se puede suponer que si se inhiben dichos procesos en este periodo crítico, las células podrían no tener la capacidad para establecer las poblaciones celulares requeridas para mantener un testículo adulto totalmente funcional.

Por lo anterior, en el presente trabajo se determinó el grado de afección que el tratamiento con PIR provocó en los procesos de la proliferación celular del testículo en animales jóvenes y si estas alteraciones presentaron secuelas que alteraran la fertilidad de estos mismos individuos en su edad adulta. A continuación profundizaremos en algunos conceptos importantes en los que se fundamentó la justificación de esta tesis.



MARCO TEÓRICO

1) Incremento en la infertilidad masculina

La infertilidad se define como la incapacidad de una pareja, de concebir un hijo después de un año de relaciones sexuales frecuentes y sin utilizar ningún medio anticonceptivo. Actualmente, la infertilidad llega a afectar hasta un 20% de las parejas (1 de cada 6 o 10 parejas), en algún momento de su vida reproductiva (Vite y col., 2005; Góngora y col., 2011).

La infertilidad femenina representa aproximadamente del 30 al 70% de los problemas de infertilidad y sus causas suelen ser de múltiples orígenes (problemas hormonales, físicos y mecánicos, obesidad, stress (físico y psicológico), etc.) (Brugo, 2003; Vite y col., 2005; Rafaela, 2008). El factor masculino en la infertilidad representa de un 20 a 50% y puede ser causado por alteraciones en el ámbito testicular, obstrucción de conductos, patologías en la próstata, alteraciones en la eyaculación o erección y alteraciones en el semen, y es evaluada con una historia clínica, una evaluación andrológica (examen físico integral y espermograma de infertilidad), valoración endocrina y un análisis bioquímico del plasma seminal (Rodríguez y col., 2000; Teppa y Palacios, 2004; Aller y col, 2006). La infertilidad masculina tiene tendencia al incremento por causas que aún no se han definido (idiopáticas), aunque se han propuestos diversas etiologías como la obesidad, el estilo de vida, los contaminantes ambientales, las drogas y los fármacos. Recientemente, se han realizado estudios en diversos países en los que se demuestra el deterioro progresivo en la concentración y en la calidad espermática debido a dichos factores (Vigueras y col., 2006; Rodríguez y col., 2008).

2) Generalidades y modo de acción de la pirimetamina

Como hemos visto, muchos son los factores propuestos como causas potenciales de la infertilidad o subfertilidad masculina. De interés para el presente trabajo son los medicamentos que se utilizan en el tratamiento de una variedad de enfermedades



provocada por protozoarios; ejemplo de ello son la sulfadiazina y la pirimetamina (PIR) (Awoniyi y col., 1993; Durlach y col., 2008; Dasgupta y col., 2009; Adelsberger y col., 2010; Durán, 2010).

La PIR (2,4-diamino-5-*p*-clorofenil-6-etil-pirimidina) (Figura 1), es un fármaco que pertenece al grupo de las diaminopirimidinas y es utilizado solo o en combinación con sulfadiazina en el tratamiento de enfermedades parasitarias (Hastings y col., 2002; Martín 2004; Carbonari y col., 2005; Nzila 2006; Adelsberger y col., 2010). Entre esas enfermedades se encuentra la toxoplasmosis congénita, la cual es combatida con este fármaco en un periodo postnatal temprano, que puede ir del día de nacimiento hasta los tres meses de edad, pero que es más efectiva si se administra durante todo el primer año de vida en una dosis de 1 mg/kg/día durante 3 días, seguido de 1 mg/kg cada 2 días + sulfadiazina (Martín 2004; Rosso y col., 2007; Durlach y col., 2008; Durán, 2010). También es utilizada en el tratamiento de la Malaria (*Plasmodium falciparum*) y en pacientes inmunocomprometidos, donde pueden reactivarse infecciones preexistentes de *toxoplasma gondii*, como es el caso de pacientes VIH positivos (Mulenga y col., 1999; Hastings y col., 2002; Carbonari y col., 2005; Obonyoa y col., 2007; Adelsberger y col., 2010; Olayemi, 2010).

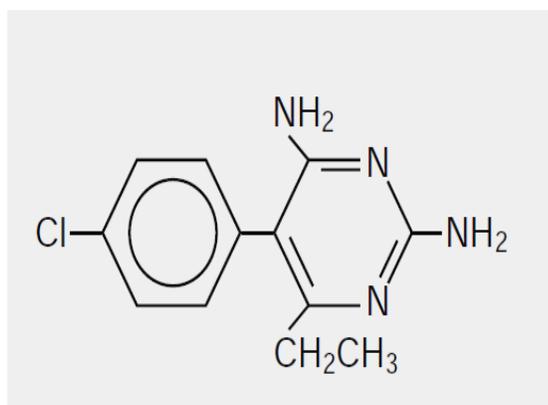


Figura 1. Estructura química de la Pirimetamina (Obtenida de Flórez, 2004).

La PIR, es un medicamento que se distribuye y metaboliza lentamente de manera homogénea en pulmón, hígado, riñón y bazo principalmente. Alcanza su máxima concentración a las 4 horas y tiene una vida media de 36 horas. Su eliminación es a



través de la orina en un porcentaje menor al 25 % y en heces fecales (Ambroise y Petersen, 2000). Se caracteriza por interferir en el metabolismo del ácido fólico al inhibir con gran selectividad a la DHFR; enzima encargada de la formación de tetrahidrofolato (H₄F) a partir de dihidrofolato (DHF) (Figura 2) (Hastings y col., 2002; López, 2002; Flórez, 2004; Carbonari y col., 2005; Gregson y Plowe, 2005; Borrero y col., 2004; Nzila, 2006; Melo y Cuamatzi, 2007; Müller, 2008 Adelsberger y col., 2010).

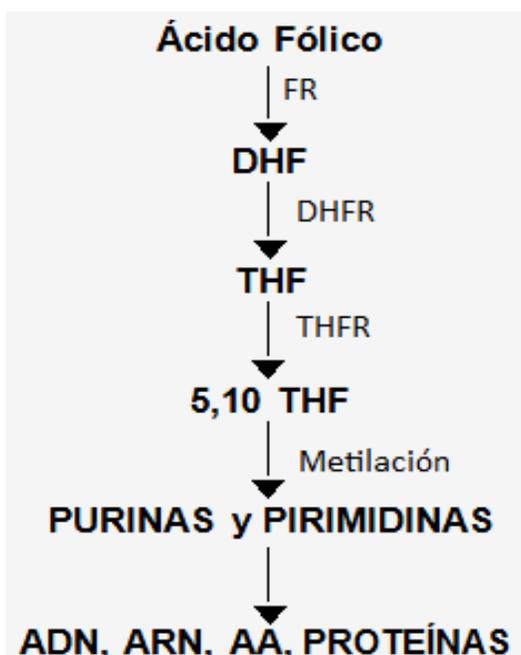


Figura 2. Esquema que muestra el lugar que ocupa la dihidrofolato reductasa (DHFR) en la formación de purinas y pirimidinas (Durand, 2012). Folato reductasa (FR), dihidrofolato (DHF), tetrahidrofolato (THF), ácidos nucleicos (AA).

La enzima DHFR está presente en el protozoario y en el huésped, sin embargo, la PYR es hasta 1000 veces más activa en la enzima del parásito (Rosowsky y col., 1995; Nzila y col., 2005; Gangjee y col., 2007; Dasgupta y col., 2009). También altera la enzima del huésped, lo que resulta en trombocitopenia al deprimir la replicación celular en la médula ósea, disminuir el número de leucocitos y alterar la



composición sanguínea, lo que deriva en anemia o leucopenia (Valdés y col., 1996; Martín, 2004).

3) Importancia de los Folatos

El término folato engloba a todo el grupo o familia de vitaminas “B”, derivadas del ácido pteroilglutámico (ácido fólico), las que tienen un papel importante en la reproducción celular (Arcot y col., 2002; Baracaldo y col., 2002). Los folatos son micronutrientes (se requieren en una mínima cantidad) y desempeñan funciones muy importantes en los procesos metabólicos de los organismos, ya que actúan como coenzimas en el tejido de los mamíferos que regulan la transferencia de unidades de un carbono, para lo cual sirven igualmente como aceptores y como donantes de dichas unidades (Baracaldo y col., 2002; Ramírez y col., 2007).

El ácido fólico está formado por un anillo de pteridina, ácido p-aminobenzoico y ácido glutámico (Figura 3), es soluble en agua y fue aislado por primera vez de la hoja de la espinaca. Tiene una estrecha interrelación metabólica en la síntesis de nucleótidos purínicos y pirimidínicos, es esencial para el crecimiento y diferenciación celular, metilación, reparación génica e inmunidad. Por su implicación en la síntesis de ADN, ARN, metabolismo de algunos aminoácidos y proteínas, su ausencia puede ocasionar daños en órganos que tienen una alta tasa de proliferación celular (Illera y col., 2000; Baracaldo y col., 2002; Gennaro, 2003; Jaber y col., 2003; Nzila y col., 2005; Nzila, 2006; Noiriel y col., 2007; Zhang y col., 2011). De interés para nuestro estudio son los reportes que asocian los bajos niveles de ácido fólico en el plasma seminal, con disminución en la densidad y la concentración espermática, así como un incremento en el daño al DNA espermático (Wallock y col., 2001; Boxmeer y col., 2009), ya que por lo tanto, una disminución o interferencia con el aporte de ácido fólico, parece impactar en la capacidad reproductiva del macho.

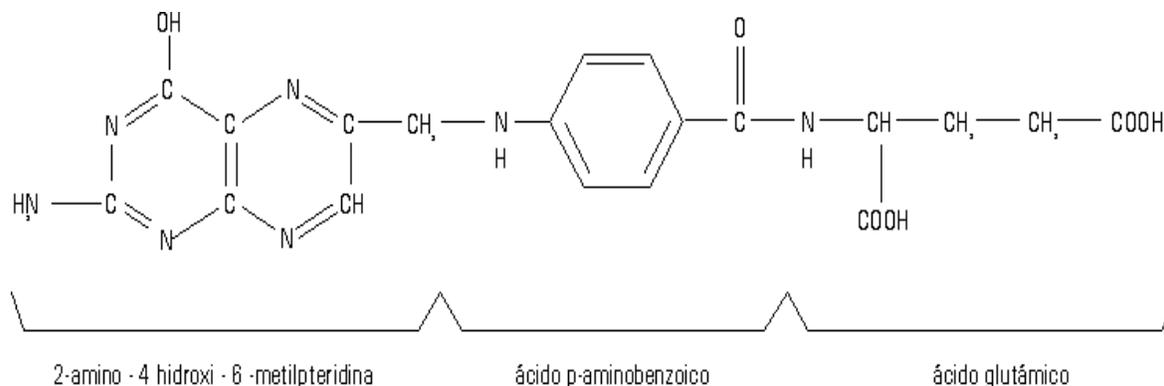


Figura 3. Estructura química del ácido fólico (Obtenida de Rodríguez, 1998).

4) Descripción anatomofisiológica de los testículos y de los diferentes tipos celulares que lo integran

Debido a que las poblaciones celulares del testículo son el punto de interés en el presente trabajo, se describirá la anatomofisiología de la gónada y algunas características de las células que lo integran:

Los testículos son las gónadas masculinas (Figura 4), productoras de los espermatozoides (espermatogénesis) y de las hormonas sexuales (testosterona) que mantienen la función reproductiva y las características sexuales secundarias. Están formados por una red de túbulos seminíferos que contienen diferentes tipos celulares (células de Leydig, de Sertoli y gonocitos) (Russell y Renato de Franca, 1995; Lee y Coughlin, 2002; Ganong 2002; Xia y col., 2005; Lambrota y col., 2006).

Están fijados a la pared del proceso vaginal, a lo largo de la línea de unión con el epidídimo, y suspendidos en el escroto localizado fuera de la cavidad abdominal, ya que para llevarse a cabo la espermatogénesis de manera normal deben estar de 2-4 °C por debajo de la temperatura corporal. Su posición en el escroto y la orientación del eje mayor de los testículos difieren con la especie (Hafez y Hafez, 2000; Guyton, 2001).

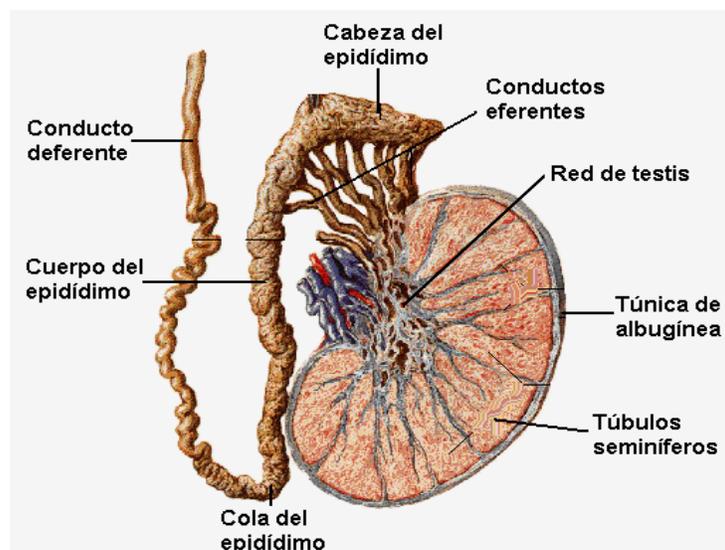


Figura 4. Representación esquemática del testículo (obtenida de auladeanatomia.com/genitais/testiculos.htm)

4.1) *Células de Leydig*

La fertilidad del macho adulto depende de la actividad de las células de Leydig (CL). Estas células descansan entre los túbulos seminíferos (por lo cual también se conocen como células intersticiales) y son las responsables de la producción de la testosterona y otros andrógenos que son liberados a las venas testiculares y los vasos linfáticos (Parthasarathy y Balasubramanian, 2008_a). Por lo anterior, algunos defectos en estas células, pueden tener un impacto significativo en la calidad de vida lo que se manifiesta en problemas sexuales que pueden conllevar a la infertilidad (Parthasarathy y Balasubramanian, 2008_a, 2008_b).

El proceso de diferenciación de las CL ocurre en dos fases, la primera ocurre dentro del testículo fetal y la segunda ocurre en la etapa postnatal (Kerr y Knell, 1998). La existencia de dicho proceso fue documentado en 1959 en estudios realizados en ratas, en los que actualmente es más estudiado la fase de diferenciación de las CL en la etapa postnatal (Mendis y Siril, 2001).

El desarrollo de las CL fetales se inicia en el útero. Dichas células comienzan la producción de testosterona por el día 15.5 de la etapa gestacional para la



diferenciación del sistema urogenital masculino (Sriraman y col., 2000). La hormona también participa en el descenso testicular porque participa en la síntesis del factor de crecimiento parecido a la insulina 3 (INSL3), que es liberado por el nervio genitofemoral (NGF) y favorece las contracciones del gubernáculo. También induce la expresión de receptores para la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés), de esta manera responde a los estímulos de esta misma y no necesitan de ella para su desarrollo (Sriraman y col., 2000; Chen y col., 2009; O'Shaughnessya y col., 2009; Weisser y col., 2011).

Las CL postnatales se forman durante la pubertad, y la testosterona que secretan es utilizada para el comienzo de la espermatogénesis, entre otras funciones (Chen y col., 2009; O'Shaughnessya y col., 2009). La diferenciación de las CL en etapa postnatal de la rata se lleva a cabo alrededor de la 2ª semana (día 10). Este proceso de desarrollo consiste de múltiples pasos en los cuales las células madre (células mesenquimales) pasan por diferentes estadios para diferenciarse a CL adultas maduras (Figura 5) (Kerr y Knell, 1998; Siril y col., 2000; Mendis y Siril, 2001).

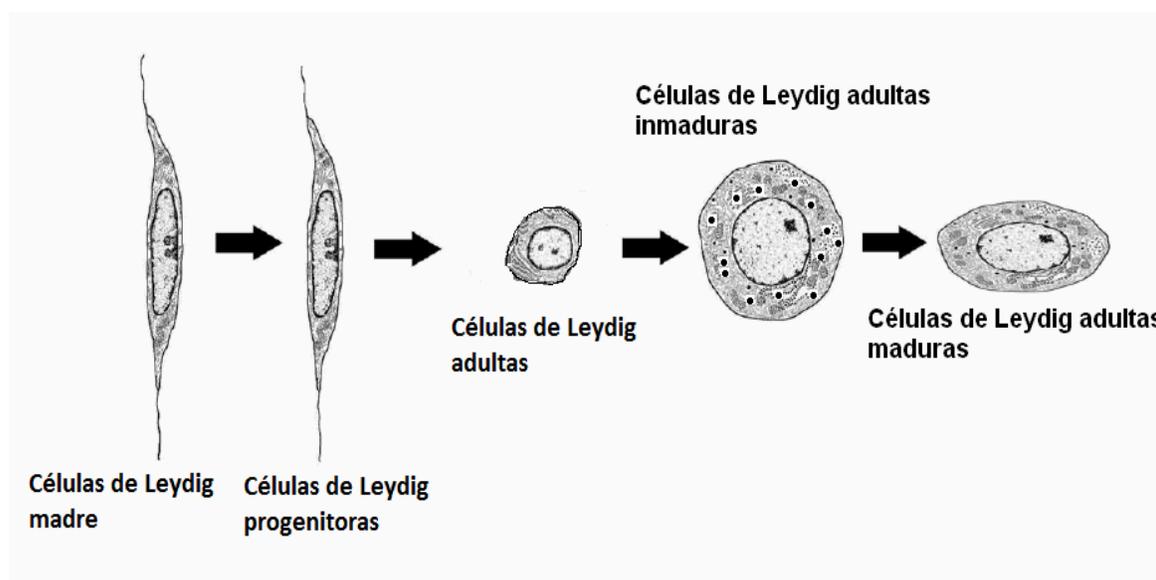


Figura 5. Muestra las diferentes etapas de la diferenciación de las células de Leydig (Obtenida de Mendis y Siril, 2001).



4.2) Proliferación de las células de Sertoli

Las células de Sertoli (CS) son células contenidas en los túbulos seminíferos que brindan el soporte estructural y metabólico a las células germinales durante la espermatogénesis. Al ser estimuladas por la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) estimulan la maduración de los espermatozoides (Buzzard y col., 2002; Walker y Cheng 2005).

El número de CS en el adulto está determinado por el tamaño de ambos testículos y la producción diaria de los espermatozoides. Esto se debe a que cada CS tiene la capacidad para soportar determinado número de células germinales y esta capacidad varía entre especies. El número de CS está determinado antes de la edad adulta (Buzzard y col., 2002; Sharpe y col., 2003; Walker y Cheng, 2005).

Existen evidencias que muestran que las CS proliferan durante dos etapas de la vida: en el periodo fetal o en el neonatal y en el periodo peripuberal en todas las especies. En algunas especies, un periodo puede ser más importante que el otro, además, de que existe confusión en especies tales como la rata, en la cual el periodo neonatal y el perinatal no se perciben muy bien, y dificulta la diferenciación de las CS, lo cual contrasta en los humanos ya que estos periodos están separados por décadas. De esta manera, se conoce que la proliferación de las CS en la rata se da en la etapa neonatal (día 12 al 15) y que durante el periodo peripuberal se da una proliferación compensatoria (día 15 al 30) (Figura 6) (Sharpe y col., 2003; O'Shaughnessy y col., 2009).

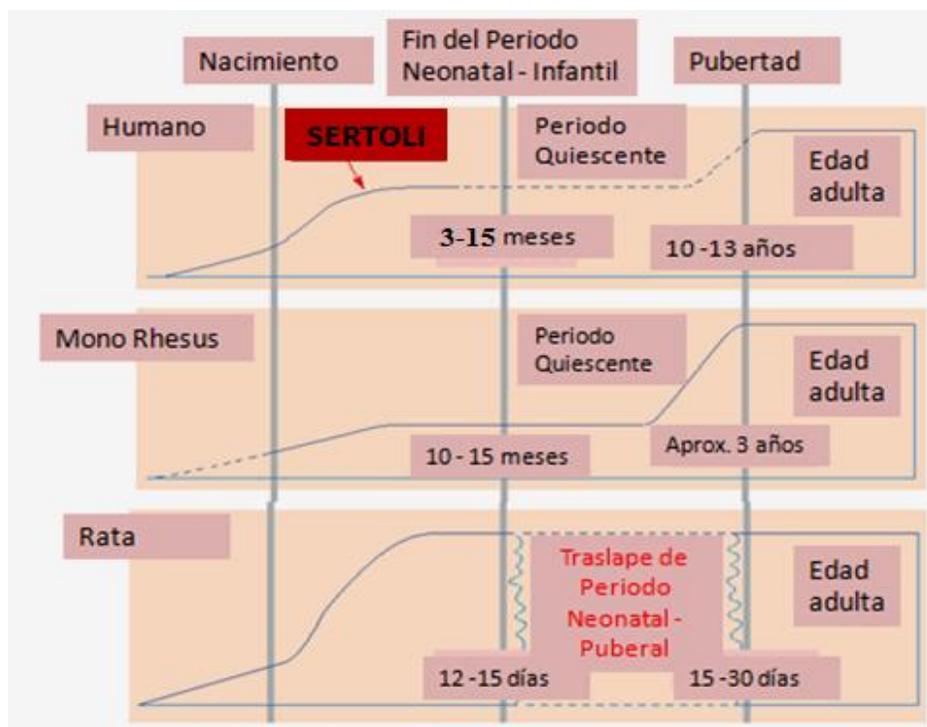


Figura 6. Muestra la proliferación de las células de Sertoli en los periodos neonatal y peripuberal (Modificada de Sharpe y col., 2003).

4.3) Gonocitos

Los gonocitos son los precursores de las células germinales (llamados espermatozoides) y en las ratas permanecen mitóticamente estáticos a partir del día 17 de la etapa gestacional. En el tercer día de la etapa postnatal, el 7.5% de los gonocitos proliferan y migran a la lámina basal; por eso los primeros 3-5 días de la vida postnatal son cruciales para el comienzo de la espermatogénesis y la fertilidad futura. Si por alguna razón la maduración no se da en este espacio, los gonocitos degeneran (Vergouwen y col., 1991; Viguera y col., 2006). Con base en ello, esta etapa ha sido identificada como una ventana edad-específica de vulnerabilidad para la exposición a diversos factores exógenos que podrían alterar la población celular.



4.4) Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso fisiológico donde se lleva a cabo la formación y maduración del espermatozoide en los túbulos seminíferos durante la vida sexual activa (Figura 7) y es estimulada por la acción de las hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) que son producidas por las células gonadotropas de la adenohipófisis (Johnson y col., 2000; Maeda y col., 2000; Royere y col., 2004; Franca y col., 2005; Málaga y col., 2005).

4.4.1) Fases de la espermatogénesis

1ª. Etapa

El comienzo de la espermatogénesis se da con la división mitótica de las espermatogonias que son células inmaduras localizadas en la lámina basal de los túbulos seminíferos. Estas células continúan dividiéndose hasta que el animal pierde su habilidad de seguir produciendo espermatozoides (Hess, 1999; Maeda y col., 2000; Guyton, 2001).

Las espermatogonias se clasifican en tres tipos: A, intermedia, y tipo B: las de tipo A son la siguiente subdivisión de la tipo A0 (stem cell o célula madre), la espermatogonia A0 se queda en la membrana basal de los túbulos seminíferos y tiene la habilidad de dividirse en 2 células hijas, una de las cuales llega a espermatogonia A1, que continua en el proceso de la espermatogénesis, mientras que la otra permanece como una stem cell. En la rata, la espermatogonia A1 tiene 6 divisiones mitóticas (Figura 7) (Hess, 1999; Maeda y col., 2000; Guyton, 2001).

2ª. Etapa

Las espermatogonias B entra en mitosis y se diferencian a espermatocitos primarios (cada espermatogonia B da origen a 2 espermatocitos primarios), los que se desarrollan y dividen por meiosis (I) hasta llegar a ser espermatocitos secundarios en el componente adluminal de las células de Sertoli. Al cabo de un tiempo, los

espermátocitos secundarios se dividen por meiosis (II) para formar las espermátides (Figura 7) (Hess, 1999; Maeda y col., 2000; Guyton, 2001).

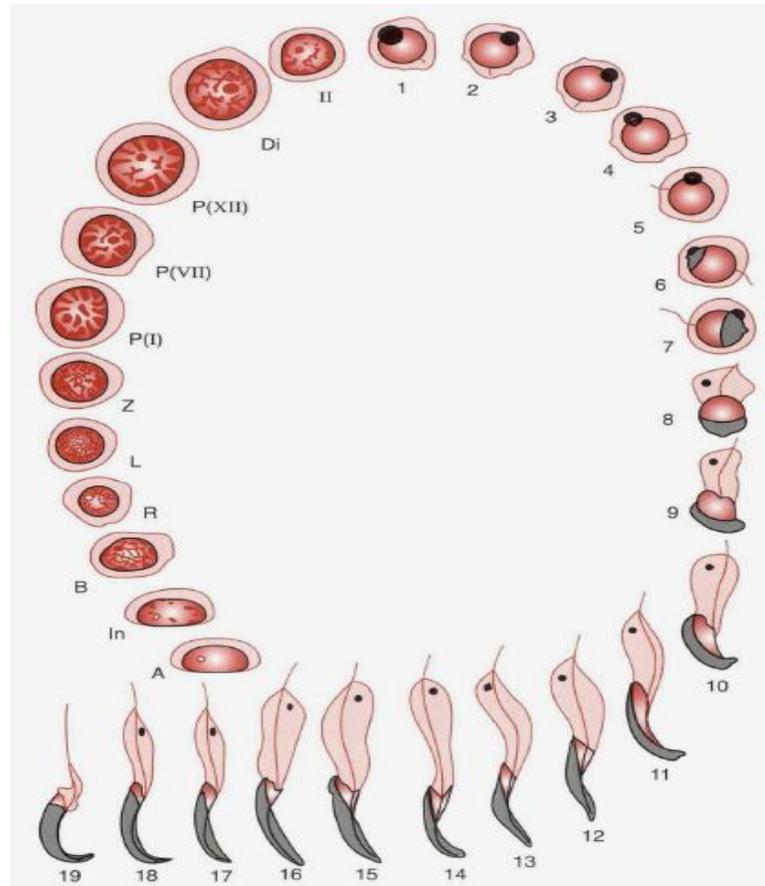


Figura 7. Fases del ciclo células de la espermatogénesis en la rata. A, espermatogonia tipo A; In, espermatogonia intermedia; B, espermatogonia tipo B; R espermátocito primario; L, espermátocito en leptoteno; Z, espermátocito en cigoteno; P (I), P (VII), /P (XII), temprano, intermedio y tardío espermátocito en paquiteno. Los números romanos indican la fase del ciclo en el cual se encuentran; Di, diploteno; II, espermátocito secundario; 1-19, pasos de la espermiogénesis (Obtenida de Maeda y col., 2000).

3ª. Etapa

También llamada **espermiogénesis**, que es el proceso por medio del cual las espermátides se transforman en espermatozoides maduros; que puede llevarse a cabo de una a tres semanas, dependiendo de la especie. Estas transformaciones consisten en la condensación y elongación del núcleo que se dirige a la periferia de



la célula, la formación del acrosoma a partir de la fusión de las vesículas producidas por el aparato de Golgi, formación del flagelo que se desarrolla a partir del centriolo que se localiza en el polo posterior de la espermátide, reorganización de las mitocondrias y pérdida del citoplasma (Maeda y col., 2000). En un principio, la espermátide tiene la forma de una célula epitelioide, lo cual no dura mucho ya que la célula comienza a alargarse para finalmente formar el espermatozoide (Maeda y col., 2000; Guyton, 2001).

La remodelación celular (espermiogénesis) que se produce durante la diferenciación de las espermátides en espermatozoides maduros consiste de cuatro fases:

Fase de Golgi. Se caracteriza por la presencia de gránulos con una gran cantidad de glicoproteínas que se acumulan en las vesículas del acrosoma contiguas a la envoltura nuclear formadas por el aparato de Golgi. La vesícula aumenta de tamaño y su contenido se acrecienta durante esta fase. Durante esta fase, los centriolos migran desde la posición yuxtannuclear hacia el polo posterior de la espermátide, donde el centriolo distal maduro se alinea perpendicularmente a la membrana plasmática iniciado el armado de los 9 dobletes microtubulares periféricos y los microtúbulos centrales que forman el axonema de la cola del espermatozoide (Figura 8). Por su parte, el centriolo proximal queda almacenado en la región del cuello del espermatozoide (Olivera y col., 2006; Ross y Pawlina, 2007).

Fase de capuchón. En esta fase la vesícula acrosómica se extiende sobre toda la mitad anterior del núcleo, mientras que la porción de la envoltura nuclear que se encuentra por debajo del capuchón acrosómico pierde su porosidad y sufre un engrosamiento, además de que se condensa el contenido nuclear iniciando el intercambio de sus proteínas nucleares (histonas), por unas proteínas más básicas y ricas en cisteína denominadas protaminas que se insertan en el surco menor del ADN favoreciendo su compactación (Figura 8) (Olivera y col., 2006; Ross y Pawlina, 2007).

Fase acrosomal. La espermátide gira de tal forma que la cabeza se enclava profundamente en la célula de Sertoli apuntando hacia la lámina basal. El núcleo condensado se aplana y se alarga por la formación del manguito o manchete que está formado por microtúbulos citoplasmáticos. Del centriolo distal surgen 9 fibras gruesas que dan origen a las fibras densas que se extienden dentro del flagelo por fuera de los microtúbulos del axonema. Por otro lado, las mitocondrias migran hacia el cuello del espermatozoide para formar una vaina helicoidal que proporcionará la energía necesaria para el movimiento del flagelo. Por último, se forman las vainas fibrosas compuestas por columnas longitudinales en forma de costillas que se extienden casi hasta el final del flagelo (Figura 8) (Olivera y col., 2006; Ross y Pawlina, 2007).

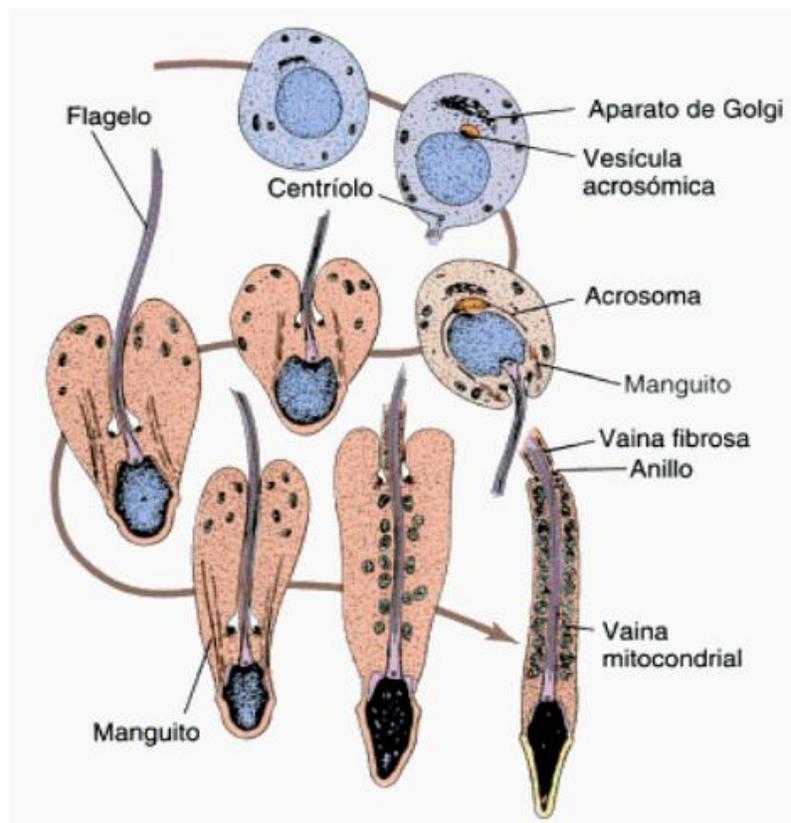


Figura 8. Imagen que muestra las modificaciones en la estructura de los orgánulos de la espermátide (Obtenida de Ross y Pawlina, 2007).



Fase espermiogénica de maduración. Aquí se observan las características finales del espermatozoide; forma de la cabeza característica de cada especie, cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma, la cola compuesta por pieza principal, media y terminal. Se da la eliminación por desplazamiento del exceso de citoplasma y de organelos que ya no serán de utilidad para el futuro del espermatozoide y se forma la gota citoplasmática. La fase espermiogénica de maduración termina con la espermiación o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero, favorecida por los movimientos peristálticos del epitelio seminífero y la liberación de enzimas de las CS. En este momento, los espermatozoides son transportados a la red de testis pasando por los conductos eferentes y de allí al epidídimo en donde sufrirán un proceso de maduración celular que les permitirá adquirir su potencial fecundante y cuyo rasgo más perceptible es la adquisición de la motilidad (Los espermatozoides se almacenan en la cauda del epidídimo) (Olivera y col., 2006; Ross y Pawlina, 2007).

5) Factores hormonales que estimulan la espermatogénesis

Varias hormonas desempeñan funciones fundamentales para la espermatogénesis, las cuales son:

Testosterona. Secretada por las CL localizadas en el intersticio testicular, es esencial para el crecimiento y división de las células germinales testiculares, que es el primer paso para formar los espermatozoides.

LH. Secretada por la adenohipófisis, estimula la secreción de testosterona por las CL.

FSH. También secretada por la adenohipófisis, estimula a las CS; sin esta estimulación no se produciría la diferenciación de espermátide a espermatozoide durante la espermiogénesis.



Estrógenos. Formados a partir de la testosterona por las CS cuando son estimuladas por la FSH, son también probablemente esenciales para la espermatogénesis.

Hormona de Crecimiento (GH). Así como la mayor parte de las hormonas antes mencionadas, es necesaria para controlar las funciones metabólicas de los testículos. Específicamente, la GH promueve la división temprana de las propias espermatogonias (Guyton, 2001).

6) Eje Hipotálamo-Hipofisiario-Gonadal Masculino

El hipotálamo y la hipófisis anterior participan en conjunto en la función de las funciones testiculares: espermatogénesis y esteroidogénesis. El hipotálamo segrega la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés) de las regiones preópticas y mediobasal que estimula la secreción de LH y FSH por las células gonadotropas de la adenohipófisis (Figura 9) (Yen y col., 2001; Palacios, 2008).

El monitoreo directo de la sangre venosa hipotalámico-hipofisiaria en animales evidencia que los pulsos de la GnRH estimulan la secreción de la LH. El concepto de un generador hipotalámico de pulsos de GnRH ha surgido como un ensamble multineuronal que puede liberar en forma episódica las descargas de GnRH (Yen y col., 1991).

La GnRH interactúa con los receptores de membrana, acoplados a proteínas G en las células gonadotropas de la adenohipófisis. Su administración aguda estimula la liberación fundamentalmente de la LH mediante mecanismos mediados por calcio o fosfoinosítidos como segundo mensajero (Yen y col., 2001; Palacios, 2008). A su vez, la LH actúa sobre la membrana de las CL mediante un receptor miembro de la familia de los receptores acoplados a proteínas G. La unión al receptor activa señales de transducción mediante la acción adenosín monofosfato cíclico (AMPc)



como segundo mensajero, activando la cascada de señalización inducida por el sistema del inositol trifosfato (IP_3) y la fosfolipasa C. Esta activación estimula la síntesis de enzimas necesarias para la producción de testosterona (Yen y col., 2001; Palacios, 2008).

Por otro lado, la FSH se une a su receptor localizado en la región basal de la membrana de la célula de Sertoli; miembro también de la familia de receptores acoplados a proteínas G. Dicha unión estimula la formación del AMPc, de manera similar a la LH, lo que activa la síntesis de varias proteínas, como la proteína ligadora de andrógenos (ABP), encargada de fijar a la testosterona en el túbulo seminífero, y la aromatasa que convierte testosterona en estradiol (Yen y col., 2001; Palacios, 2008).

Existen mecanismos de retroalimentación negativa entre los esteroides sexuales testiculares, la hipófisis y el hipotálamo, de manera que al aumentar aquellos, inhiben la secreción de GnRH y en consecuencia de las gonadotropinas. De igual manera, la testosterona actúa negativamente interfiriendo con la secreción de la LH, esto debido a que el hipotálamo tiene receptores especializados para el acoplamiento de la testosterona sin necesidad de que esta sea aromatizada. Otra hormona que también tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de FSH es la inhibina, producida por las CS y que es liberada en la última fase de la espermatogénesis. A su vez, la FSH estimula a las CS para la producción de inhibina. De esta manera, se da la funcionalidad del ciclo hipotálamo-hipófisis-gonadal masculino (Yen y col., 2001; Palacios, 2008).

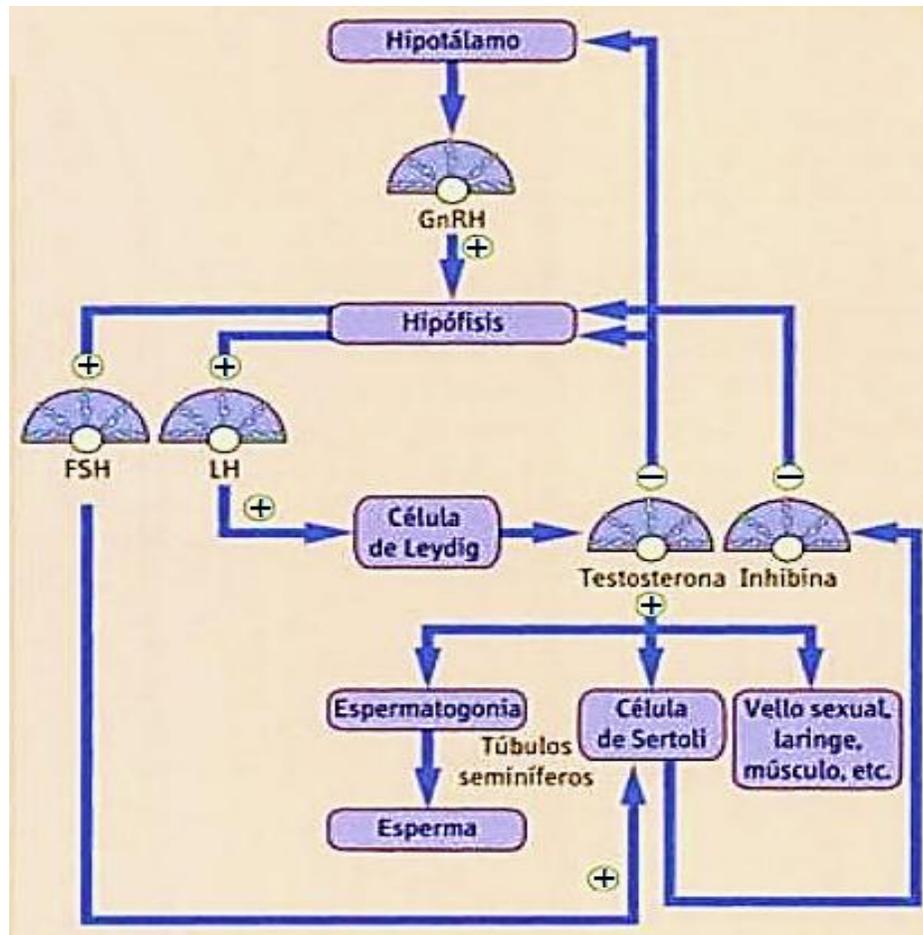


Figura 9. Representación esquemática de la regulación del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal masculino (Obtenida de Baynes, 2005).

7) *La rata como modelo experimental para el estudio de alteraciones reproductivas*

Para evaluar el efecto que la PIR pudiera tener sobre la población celular de los testículos de individuos jóvenes, en el presente estudio se utilizó a la rata como modelo experimental. La elección de este animal de laboratorio, se debió a que ha sido utilizado con anterioridad y de manera exitosa para realizar estudios sobre el efecto de la administración o exposición a fármacos vía útero, lactancia o etapas postnatales tempranas y su efecto sobre la reproducción (Arch y col., 2004). Es aceptado que la utilización de modelos experimentales con animales juveniles, permiten obtener datos, que la utilización de animales adultos no reporta, por lo cual



varios Comités Internacionales apoyan la utilización de animales jóvenes para valorar el efecto de diferentes fármacos en los procesos del continuo desarrollo postnatal (por ejemplo, en estudios del sistema nervioso central, aparato reproductor y sistema inmune). Por otra parte, en los mamíferos el aparato reproductor presenta una maduración lenta que alcanza su funcionalidad total inmediatamente antes del inicio de la edad adulta y que comparte una estructura y una regulación hormonal afín entre las diferentes especies. Por lo tanto, los datos obtenidos en este tipo de estudios aumentaran el conocimiento de las diferencias cinéticas y/o toxicológicas que la utilización de una droga representa entre individuos jóvenes y adultos (Baldrick, 2004; Herráez y col., 2004).

8) Efectos de la PIR en ratas y ratones adultos

En estudios realizados en roedores, tales como la rata y el ratón, se ha observado que la espermatogénesis se ve interrumpida por la aplicación de PIR, porque causa diversos niveles de infertilidad debido a que se detiene la proliferación de las células testiculares que se encargan del mantenimiento y síntesis de factores que afectaran este proceso. Esto se ve reflejado en el tamaño del testículo y el epidídimo, lo que da como resultado un conteo espermático bajo a nivel testicular y epididimal (Cosentino y col., 1990; Kalla y col., 1997; Bedford y McDonnell, 1998; Bedford y McDonnell, 1999; Murakami y col., 2000, Brinsko y col., 2002; Olayemi, 2010).

Al respecto, Murakami y col., (2000) reportaron que en ratas adultas macho el uso de PIR por periodos de 2 semanas, utilizando una dosis de 50 mg/kg/día, causa daños que degeneran los espermatocitos que se encuentran en las etapas I y III de los túbulos seminíferos, detectado por técnicas histopatológicas, además de observar una disminución en la actividad de los espermatozoides en el epidídimo.

Con anterioridad, el equipo de Awoniyi (1993), utilizando dosis de 400 mg/kg/día de PIR en ratas adultas macho por 8 semanas, observaron que existen daños a nivel



reproductivo, ya que hay una disminución del tamaño testicular y del epidídimo, con bajo conteo espermático y de la fertilidad.

Consentino y colaboradores (1990), mostraron que la aplicación de PIR en ratones adultos macho por un periodo de 50 días (aplicando dosis de 10, 25, 50, 75, 100 y 200 mg/kg/día), resultó en disminución de la fertilidad cuando se inyectaron pequeñas dosis y que esto se acrecentaba conforme la dosis se aumentaba. Cabe aclarar, que el periodo de administración se realizó de tal manera que coincidiera con el ciclo espermatogénico (34.5 días) y el transporte del espermatozoides por el epidídimo (10 a 15 días).

Más recientemente, Tumkiratiwong y Lerkchundhakriat (2011) reportaron en ratas de 9 semanas de edad, a las que se les administró una dosis de 25 mg/kg/día de PIR por un periodo de 7, 21, 35 y 49 días, que únicamente los tratamientos con duración de 21, 35 y 49 días afectaron la fertilidad, lo cual se vio reflejado en una disminución en el número de espermátides, espermatozoides, motilidad espermática y viabilidad de los espermatozoides del epidídimo, además de observar atrofia en los túbulos seminíferos y las células germinales.

Kalla y colaboradores (1997), observaron que después de 45 días de haber suspendido la aplicación de una dosis de 50 mg/kg/día de PIR, durante 30 días, los ratones macho adultos recuperaron la fertilidad. Los autores sugieren que la disminución en la calidad seminal de las ratas adultas medicadas con PIR puede ser debida de manera indirecta a la inhibición de la DHFR.

Aún no se han reportado los efectos que este medicamento tendría a futuro si se aplicara en una etapa temprana de vida, donde todavía no se establecen las poblaciones testiculares. Por lo tanto, se desconoce si las posibles alteraciones inducidas podrían ser permanentes o temporales, ya que los procesos de proliferación y diferenciación de las células testiculares ocurren durante la etapa neonatal y estos procesos se dan solo en este periodo crítico (ventana de



susceptibilidad edad-específica). Las células que vean afectada su proliferación, seguramente verán alterada su población futura. Con base en lo anterior, en este estudio se propuso investigar los efectos que tiene la PIR sobre las células testiculares en la rata macho medicada durante sus primeros 21 días de vida y analizar las posibles secuelas que esto ocasionaría en la fertilidad de la rata cuando llegue a su madurez.



JUSTIFICACIÓN

Los niños recién nacidos diagnosticados con toxoplasmosis congénita son tratados con PIR. El periodo de medicación puede abarcar de tres meses hasta el primer año de vida; periodo postnatal en el que se lleva a cabo la proliferación de gonocitos y células de Sertoli. En vista de que la aplicación de PIR en el recién nacido, coincide con los procesos de proliferación de estos tipos celulares del testículo y que la acción del fármaco afecta la disponibilidad de folatos requeridos para que se lleven a cabo, su utilización podría provocar alteraciones en el establecimiento de la funcionalidad testicular.

Por lo anterior, el presente trabajo exploró el riesgo potencial de la aplicación de la PIR en individuos juveniles, y se utilizó como modelo de experimentación ratas neonatas medicadas durante sus primeros 21 días de vida. Lo anterior con la finalidad de comprobar si el tratamiento con PIR en ese periodo, induce alteraciones permanentes a nivel testicular que comprometan la fertilidad futura.



HIPÓTESIS

La administración de pirimetamina en la etapa neonatal de la rata afectará los procesos de proliferación de los gonocitos y de las células de Sertoli, por lo que, se verán alteradas las poblaciones celulares del testículo de la rata adulta.



OBJETIVOS

Objetivo general

- Analizar los efectos que la aplicación de pirimetamina en ratas neonatas tendrá sobre las poblaciones de células de Sertoli y germinales del testículo de la rata adulta.

Objetivos específicos

- Efectuar conteos poblacionales de las células testiculares de ratas adultas medicadas durante la etapa neonatal.
- Valorar la histomorfología del testículo de la rata adulta mediante el índice de Jhonsen (maduración epitelial).
- Evaluar el índice de proliferación celular por inmunohistoquímica y por la reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (RT-PCR).
- Comprobar la fertilidad de las ratas tratadas con pirimetamina mediante pruebas de preñez y la fecundidad de las ratas hembra.
- Realizar la valoración espermática de las ratas adultas.



MATERIALES Y MÉTODO

Se emplearon 36 ratas macho de la línea Wistar, de diferentes camadas y de un día de edad, alojadas con las madres en cajas de policarbonato, hasta la edad de destete (día 21), a partir del cual se colocaron en cajas individuales. Durante el experimento se mantuvieron en ciclos de 12 horas luz-12 horas oscuridad (luces encendidas desde las 7:00 h a las 19:00 h), alimento y agua a libre demanda. Las madres fueron sexadas a la semana de edad y proporcionadas por el bioterio en una etapa adulta y en estado de gestación, facilitándonos las fechas de cruce para poder conocer el día de parto y obtener las crías para la formación de los grupos experimentales.

En cada caja se dejó a una madre y a 8 machos. Los manejos y tratamientos se efectuaron por un periodo de 21 días (a partir del día de nacimiento); día de destete.

Se formaron 3 grupos experimentales (PIR, PAF y control) (12 animales en cada grupo), el Grupo PIR, recibió una aplicación oral de 25 mg/kg/día de PIR (Vetranal SIGMA) disuelta en miel de maíz y administrada mediante sonda esofágica, cada tercer día (7 aplicaciones en total). El Grupo PAF recibió el mismo tratamiento de PIR, más ácido fólico (AF) (7.5 mg/kg vía oral una vez por semana) y el grupo control solo recibió el vehículo (miel de maíz) utilizado para la aplicación de PIR y PAF. Todos los grupos tuvieron el mismo manejo durante la aplicación de su respectivo tratamiento.

AUTOPSIA

Las fechas de corte para evaluar los efectos del tratamiento comprendieron 2 etapas de la rata: pubertad y madurez sexual (35 y 90 días postparto), por lo que los animales fueron sometidos a eutanasia en dos diferentes etapas de corte: 35 y 90 días de edad. Después de la eutanasia, se tomaron muestras de tejido testicular para determinar el grado de madurez epitelial (mediante el índice de Johnsen), y se les realizó inmunohistoquímica para la expresión del antígeno nuclear de células en



proliferación (PCNA). Para complementar este último, se efectuó una prueba de reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (RT-PCR) dirigido de igual manera a la expresión de PCNA.

Los animales de la segunda edad de corte (90 días), fueron evaluados previamente mediante con pruebas de fertilidad a los 70 días. Solo a los animales de esta edad se les efectuó un conteo de poblaciones celulares (germinales y Sertoli), y una valoración espermática completa (espermiograma).

En la Figura 10, se muestra el diagrama de flujo de las actividades e intervenciones desarrolladas en la metodología.

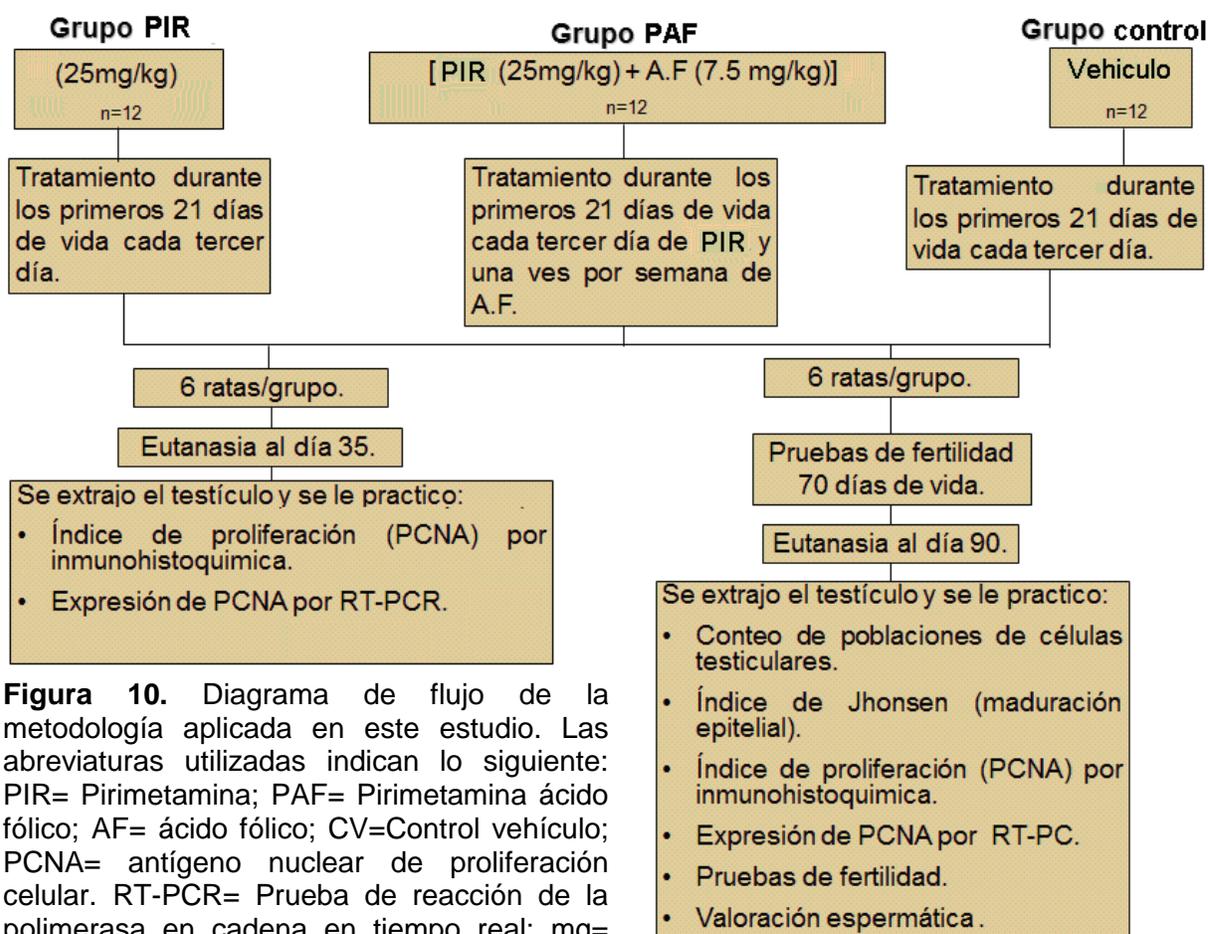


Figura 10. Diagrama de flujo de la metodología aplicada en este estudio. Las abreviaturas utilizadas indican lo siguiente: PIR= Pirimetamina; PAF= Pirimetamina ácido fólico; AF= ácido fólico; CV=Control vehículo; PCNA= antígeno nuclear de proliferación celular. RT-PCR= Prueba de reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real; mg= miligramos; kg= kilogramos; n= número de individuos por grupo.



A continuación se explica cada una de las técnicas y en el Anexo 1 se puede consultar la fórmula de cada uno de los reactivos utilizados en las mismas.

Cálculo de la muestra

Para determinar el tamaño de la muestra se siguieron los criterios establecidos para las 3 R's (refinamiento, reducción y reemplazo) y el cálculo fue realizado por el departamento de metodología de la investigación del INP, los cuales aplicaron la siguiente fórmula:

$$n = (\sigma_0 (Z_\alpha + Z_\beta) / \mu - \mu_0)$$

En todos los casos se consideró como diferencias estadísticamente significativas aquellas cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05, un poder de 80% y los valores $Z_\alpha = 1.96$, $Z_\beta = 0.84$, más un 20% de pérdidas para todos los cálculos.

Las desviaciones estándar se tomaron como referencia para la aplicación de la fórmula reportada anteriormente utilizando los siguientes parámetros:

- Concentración espermática (Awoniyi y col., 1993).
- Fecundidad (Awoniyi y col., 1993).

Cuantificación de células testiculares realizado en cortes semifinos

Las muestras testiculares fueron fijadas con solución de Karnovsky y lavadas en solución amortiguadora de cacodilatos (0.1M), se postfijaron en solución de OsO_4 al 1% (Merck, Darmstadt, Germany), con deshidratación en alcoholes graduales (60-100%) y óxido de propileno.

Se incluyeron en Epon (Electron Microscopy Science, Fort Washington, Philadelphia, USA), para obtener cortes semifinos de $1\mu\text{m}$ de espesor que se tiñeron con azul de toluidina por flotación y se montaron en portaobjetos para determinar las poblaciones testiculares de CS y células de la línea germinal en la rata adulta. Para ello, se realizó el conteo de las células en un mínimo de 20 túbulos seminíferos



por animal, utilizando un objetivo 60x en microscopio óptico. Solo se seleccionaron para el conteo, los túbulos con corte transversal que se encontraban en las etapas VI, VII y VIII de la espermatogénesis; esto debido a que en estas tres etapas se puede observar con mayor claridad la diferencia de cada estadio de las células germinales, abarcando desde espermatogonias hasta espermátides [etapa VI: espermatogonias A, espermatogonias B, espermatocitos, espermátides (espermiogénesis); etapa VII: espermatogonias A, espermatocitos, espermátides (espermiogénesis); etapa VIII: espermatogonias A, espermatocitos, espermátides (espermiogénesis)] (Maeda y col., 2000).

Determinación del índice de maduración del epitelio seminífero (índice de Johnsen)

En los mismos cortes semifinos obtenidos para el conteo poblacional se valoró el índice de Johnsen, que es una evaluación categórica del grado de maduración epitelial con base en la presencia o ausencia de células germinales y CS (Cuadro 1). La evaluación se realizó en un mínimo de 20 secciones transversales de túbulos por animal, utilizando un equipo de digitalización de imágenes (Image pro). El cuadro 1 muestra los criterios de clasificación aplicados.

Cuadro 1. Clasificación categórica del grado de maduración testicular con base al índice de Johnsen, (1970) adaptado a ratas.

Puntaje	
10	Espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides.
9	Espermatogénesis completa con poca cantidad de espermatozoides (5 por tubo).
8	No hay espermatozoides maduros, presencia de espermátides maduras en diferenciación.
7	Gran cantidad de espermátides sin algún tipo de diferenciación.
6	Presencia de pocas espermátides (5 por tubo).
5	Gran cantidad de espermatocitos presentes.
4	Pocos espermatocitos presentes (5 por tubo).
3	Presencia únicamente de espermatogonias.
2	No hay células germinales, solo están presentes las células de Sertoli.
1	No hay células en el tubo seminífero.



Determinación de proliferación celular mediante inmunocitoquímica

La proliferación celular se determinó por inmunocitoquímica y se valoró mediante un microscopio óptico la expresión de PCNA (Sta. Cruz sc-7907 rabbit) (Tarulli y col., 2006). Para ello, las muestras testiculares fueron fijadas en paraformaldehído al 4% por dos horas y procesadas para su inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes de 4 μm de grosor y se montaron en portaobjetos. Las laminillas se rehidrataron pasando por citrato de Na al 0.01M por 15 min. Después de este tiempo, se lavaron en PBS 0.01M y se procedió a permeabilizar con solución PBS/twin20 al 0.1% por 10 min, luego se incubaron con el anticuerpo primario por toda la noche. Se lavó para retirar excedentes con PBS/twin 20 al 0.1%.

El bloqueo inespecífico se efectuó con BSA/PBS/twin 20 al 5% por 2 horas. Posteriormente, se incubó con anticuerpo biotilado durante 2 horas. Se lavó con PBS/twin 20 al 0.1% y se procedió a incubar en el anticuerpo secundario conjugado al cromógeno por una hora (Complejo Avidina-Biotina). Se lavó con PBS/twin 20 al 0.1%.

El revelado de las muestras se llevó acabo con diaminobencidina de 15 a 30 segundos (s) tiempo en que las muestras se tornaron de color café y se contrastaron con hematoxilina durante 5 s. Se pasaron por xilol un tiempo de 10 min e inmediatamente se montaron con entelan (MERCK).

Se evaluaron un mínimo de 20 túbulos por animal para determinar la proliferación celular, con base al conteo de la población celular total en los cortes transversales de los túbulos seminíferos evaluados (Tarulli y col., 2006).

Determinación de proliferación celular mediante RT-PCR

La PCNA existe en dos formas básicas. La primera se expresa de manera específica en el núcleo, que participa en la replicación del DNA y que puede ser detectada por estudios inmunohistoquímicos. La segunda forma soluble es producida por la célula,



y parece tener menos relación con los procesos de síntesis y se degrada por solventes orgánicos. Esto hace que no sean identificables con métodos inmunohistoquímicos y por ello, se propuso la aplicación de un ensayo de la reacción de la polimerasa en cadena de tiempo real (RT-PCR), como método complementario que fortaleció los resultados observados en la detección inmunohistoquímica.

Para la extracción de RNA se usaron muestras de tejido testicular menor o igual a 100 mg. Las muestras se colocaron en tubos tipo eppendorf (viales de plástico estéril de 1.5 mL) y se almacenaron a -20°C inmediatamente para evitar degradación tisular. Cuando las muestras se descongelaron para ser procesadas, se adicionaron 150 μl de trizol (QIAZOL, QIAGEN) y fueron trituradas. A la mezcla triturada se le adicionaron 350 μl más de trizol para su homogenización y se dejó reposar por cinco min a temperatura ambiente.

A continuación se adicionaron 100 μl de CHCl_3 y se agitaron en vórtex por 15 s, dejando reposar por tres min. Se centrifugan por 15 min a 4°C a 14000 rpm. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se agregó un volumen de alcohol etílico al 70% (v:v); se homogenizó con vórtex por 10 s.

La muestra se transfirió a un tubo de colección de 2 mL con columna RNeasy (Qiagen) y se centrifugó por 15 s a 1000 rpm. El filtrado colectado se desechó y a la columna se agregó 700 μl de Buffer RW1 (QIAGEN). La columna se centrifugó por 15 s a 1000 rpm para lavar el RNA atrapado en la columna.

La columna se transfirió a un nuevo tubo y se adicionó 500 μl de solución buffer RPE (QIAGEN), se centrifugó por 15 s a 10000 rpm y se desechó el filtrado recolectado. Nuevamente se lavó con RPE en la misma forma (10000 rpm) por 2 min y se desechó el filtrado recolectado. La columna se centrifugó una vez más por 1 min a 14000 rpm, sin agregar RPE. Se agregan 50 μl de agua bidestilada DEPC y se centrifugó a 10000 rpm por 1 min. La integridad del RNA total obtenido de cada muestra se corroboró por medio de la observación directa de geles de agarosa al



0.8%, corridos en cámara de electroforesis y valorados en un transiluminador. Al mismo tiempo, se realizó la cuantificación del RNA total, colocando 1 μ l de la muestra en el NANO DROP.

Con base a los datos de la cuantificación de la concentración de RNA, se efectuaron los cálculos para obtener 0.2 μ g del RNA total y sintetizar a partir de éste el cDNA de pirimetamina utilizando el producto *script one step* (QIAGEN) *with platinum[®] taq* (InvitrogenTM). La selección de los primers utilizados se basó en estudios previos [Vidal y col., 2004], eligiendo los 2 siguientes:

PCNA1: 5'-CGG CCT GCA TAT GTT CGA GGC GCG C-3'

PCNA2: 5'-ATA CGG ATC CCT AAG ATC CTT CTT C-3'

La síntesis de cDNA se efectuó por 30 min a 42°C, terminando con un tratamiento a 99°C por 5 min. Las reacciones de coamplificación se indujeron en 25 μ l de mezcla para PCR conteniendo 400 μ M de los primers de 15 pares de bases, 2.5 μ l de buffer PCR, 25 μ M de MgCl₂, una mezcla de dNTPs, 2U de polimerasa, 5 μ l de mezclas de RNAs transcritos en reversa y 20 pmol de cada uno de los primers específicos para PCNA.

Las muestras se desnaturalizaron a 94°C por 3 min y se secuenciaron por 35 ciclos a 94 °C por 1 min seguidos en un termociclador. Después del último ciclo, las muestras se incubaron por 10 min adicionales a 72 °C. Los productos del PCR se separaron en gel de agarosa al 0.8% y visualizados mediante un transiluminador de luz Ultravioleta (UV) para su evaluación (Iwanani y col., 2006). La amplificación de las reacciones para cada muestra se corrió por triplicado.

Evaluación de fertilidad

La fertilidad de los machos tratados en la etapa neonatal con PIR se determinó a los 70 días de edad. Las unidades reproductivas se formaron con un macho y dos



hembras colocados en una caja colectiva de poliuretano (50x40x20cm), por un periodo de 15 días, con el fin de que las hembras presentaran por lo menos dos periodos de receptividad sexual favoreciendo las oportunidades de monta para el macho (Jégou y col., 1991). La ciclicidad de las hembras se monitoreo mediante la observación de frotis vaginales teñidos con la técnica H-E (hematoxilina-eosina). La cópula se confirmó por la presencia de espermatozoides en los frotis. El porcentaje de fertilidad del macho se calculó con base al número de hembras preñadas individualmente y se registró el promedio de cada grupo (Awoniyi y col., 1993; Malik y col., 1995). La última variable a reportar en la evaluación de fertilidad fue el número de crías por camada que fue reportado en número de crías nacidas por grupo experimental (Awoniyi y col., 1993).

Valoración de la concentración espermática

Para la valoración de la concentración espermática (número de espermatozoides por mL en la muestra seminal), el epidídimo de los animales sometidos a eutanasia se mantuvo atemperado en solución salina fisiológica a 37°C. La cola del epidídimo (región 6 y 7) se disecó retirando toda la grasa adherida y se separó completamente del resto del epidídimo. Una vez limpio y separado, se seccionó mediante varios cortes y las secciones se colocaron en 1 mL de medio mínimo de cultivo MMC (Rogers y Yanagimachi, 1975) atemperado a 37°C por 10 min; agitándolo de vez en cuando muy ligeramente. La agitación y el medio atemperado favorecen que los espermatozoides se desprendan y se difundan en el medio, en un proceso denominado *swin out*. Pasados los 10 min se lavó el tejido que se hallaba en el medio con 1 mL de MMC para desprender los últimos espermatozoides, se volvió a agitar ligeramente y se retiraron las secciones del epidídimo. De esta manera, los espermatozoides desprendidos quedaron resuspendidos en 2 mL de MMC para posteriormente determinar la concentración espermática (Kempinas y Lamanho, 1988).



El conteo de la concentración espermática se realizó en cámara de new-bauer, utilizando una dilución 1: 21, es decir se colocaron 25 μ l de semen diluido en 500 μ l de solución salina fisiológica adicionada con formaldehído al 40% (10 mL/L) y azul de tripano al 4%. El formaldehído se agrega para fijar los espermatozoides y el azul tripano para contrastarlos y facilitar el conteo, el conteo se realizó aplicando la siguiente fórmula:

n° de células contadas x factor de dilución (21) x profundidad de la cámara (10,000) x 5, que es el número de cuadros contados (cuadrante donde se realizan los conteos de eritrocitos), 4 periféricos y central = concentración por mL.

El conteo se repitió en ambos cuadros de la cámara y se verificó lavando con agua destilada y volviendo a rellenar la cámara dos veces más para efectuar conteos por triplicado. Los valores esperados se basaron en los reportados por Awoniyi y colaboradores (1993), para ratas adultas.

Obtención de los porcentajes de motilidad

Se tomó una gota de la muestra diluida de aproximadamente 10 μ L y se colocó en un portaobjetos atemperado a 38°C. Se observó en el microscopio óptico con el objetivo 20x donde se realizó el conteo de todos los espermatozoides tanto motiles como no motiles, observados en un campo. Se continuó con el conteo en varios campos más, hasta que se hizo un conteo mínimo de 200 células. Se incluyeron todas las células del último campo contabilizado, aun cuando se hubieran contado más de 200 espermatozoides; el conteo total se estableció como el 100%. Se consideraron motiles todos los espermatozoides que presentan oscilación flagelar y que no permanecieran en el mismo lugar por más de 5 a 10 s.

El resultado se expresó en porcentaje tomando como 100% el total de espermatozoides (motiles/no motiles) contados en los diferentes campos:



% de motilidad = espermatozoides motiles contados X 100/ espermatozoides totales.

Evaluación de la morfología espermática

Para el análisis de la morfología espermática se contaron por lo menos 200 células de los frotis teñidos con eosina-nigrosina. El criterio de morfoanomalías incluyó tres categorías: defectos en cabeza, defectos en flagelo y presencia de gota citoplasmática. El resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides normales, tomando como el 100% el total de los espermatozoides contados en los diferentes campos.

Porcentaje de viabilidad

La viabilidad espermática se valoró mediante la técnica de eosina-nigrosina, donde una gota de la muestra diluida (10 µl) se colocó en portaobjetos atemperado a 38°C y se adicionó con una gota de la tinción eosina-nigrosina (eosina amarilla 0.67g, nigrosina 5g, Glucosa 5% 40 mL, agua desionizada cantidad bastante para (c. b. p.) (100 mL) atemperada a 38°C. Se mezclaron y se corrió frotis que se dejó secar al aire. Cuando el frotis se secó, se montó con resina y se colocó el cubreobjetos para el conteo posterior de 200 células con el objetivo de 40x. Los espermatozoides vivos poseen integridad membranal que impide el paso de los colorantes, los muertos se tiñen con los colorantes. El resultado del conteo se expresó en porcentaje tomando como el 100% el total de espermatozoides contados. Se contabilizaron todos los espermatozoides observados en los campos analizados aun después de haber llegado a las 200 células.

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron analizados con el paquete estadístico *Minitab 16.1.0*, donde a los datos generados se les practicó un análisis de varianza (ANDEVA) con una prueba de Fisher, con el fin de detectar alguna diferencia entre los diferentes grupos de estudio.



Los conteos poblacionales (CS y células germinales) presentaron una distribución normal (datos paramétricos) y sus diferencias se evaluaron mediante la prueba “t” de Student. Por otra parte, los grupos a los cuales se les practicaron el índice de proliferación (PCNA) por inmunohistoquímica, índice de Johnsen, fertilidad y valoración espermática, al no ser paramétricos se les realizó una prueba U de Mann-Whitney para identificar diferencias entre grupos. En todos los casos, se consideraron significativas aquellas diferencias en las cuales la probabilidad fue menor o igual al 0.05.

Consideraciones éticas

Todos los animales fueron tratados de acuerdo a los principios éticos y regulaciones especificadas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del INPed y los estándares establecidos por la norma oficial mexicana (Mexicana-NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. D.O.F. 22-VIII-2001), efectuando la eutanasia de forma humanitaria, por medio de sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico diluido en solución salina fisiológica). El responsable de la aplicación de fármacos fue el investigador responsable del proyecto.

RESULTADOS

Determinación del índice de maduración del epitelio seminífero (Johnsen) y área epitelial

Los conteos realizados en las micrografías mostraron que la madurez del epitelio germinal tuvo una disminución significativa en el grupo PIR en comparación con el grupo control ($p= 0.0000$) (Figura 11), disminución que no se observó al comparar el grupo PAF con el grupo control ($p= 0.1914$) (Figura 12).

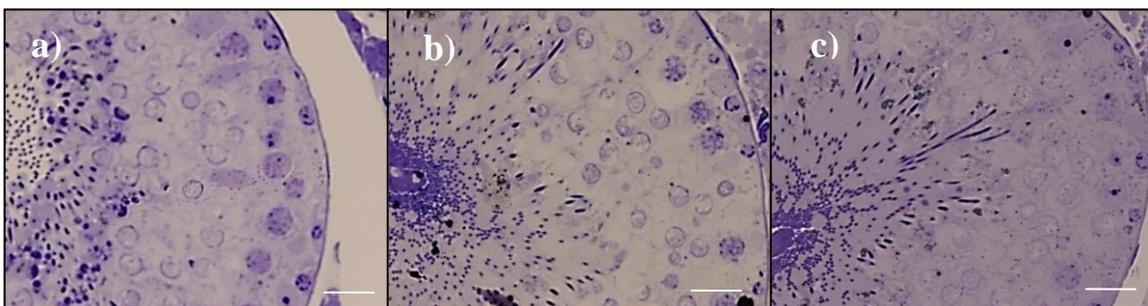


Figura 11. Micrografías a 600x, con muestras representativas de los cortes seminales de testículos de 90 días. A estos cortes se les practicó una evaluación del índice de maduración del epitelio: a) grupo PIR; b) grupo PAF; c) grupo control. Barra 20 μm .

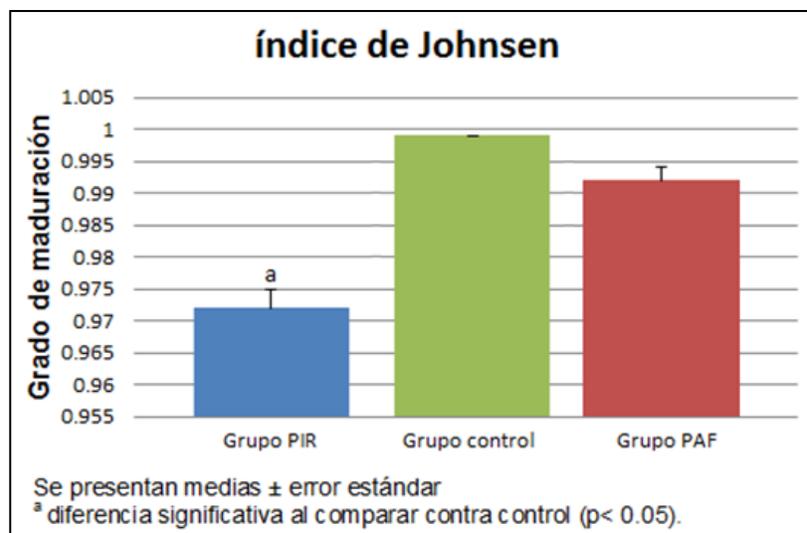


Figura 12. En la figura se ilustra la diferencia del grado de madurez de los túbulos seminíferos determinados con el índice de Johnsen.

Cuantificación de poblaciones celulares de testículos en cortes semifinos

Los conteos realizados en las micrografías de las poblaciones de las CS y células germinales por túbulo mostraron que a los 90 días de edad, el número de CS disminuyó de manera significativa en el grupo PIR, al compararlo contra los grupos PAF ($p= 0.0248$) y control ($p= 0.0003$) (Figura 13). La comparación entre el grupo PAF y control no presentó diferencia ($p= 0.0834$) (Cuadro 2). De la misma forma, a los 90 días de edad los conteos dieron como resultado una disminución significativa de las células germinales en el grupo PYR en comparación con las de los grupos PAF ($p= 0.0002$) y control ($p= 0.0001$). Al comparar entre los grupos PAF y control, los conteos de las células germinales no presentaron diferencia ($p= 0.3577$) (Cuadro 2).

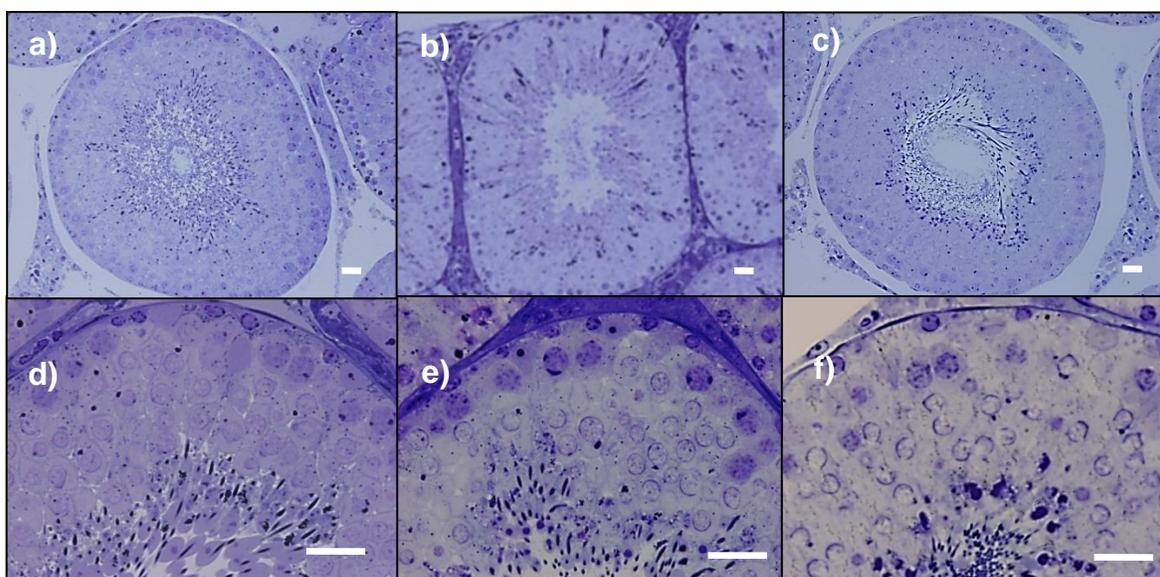


Figura 13. Micrografías a dos diferentes aumentos, con muestras representativas de los cortes semifinos de testículos de 90 días. En estos cortes se realizaron los conteos de las células de Sertoli y las células germinales: a) y d) Grupo PIR; b) y e) Grupo PAF; c) y f) grupo control. Magnificación: a, b y c (200x); d, e y f (600x). Barra 20 μ m.



Cuadro 2. Media \pm error estándar de las poblaciones de los tres grupos experimentales de células testiculares a los 90 días de edad.

	Grupo PIR	Grupo PAF	Grupo control
Cel. de Sertoli	7.0 \pm 0.3 ^a	8.3 \pm 0.4	8.9 \pm 0.3
Cel. Germinales	190.8 \pm 5.9 ^a	238.0 \pm 7.0	244.9 \pm 8.7

^a diferencia significativa al comparar contra control ($p < 0.05$).

Resultados de expresión del PCNA en los diferentes grupos experimentales

En las muestras a las que se les realizó inmunohistoquímica para la expresión de PCNA se observó a los 35 días un mayor número de células positivas a PCNA en el grupo control en comparación con los grupos PIR y PAF (núcleos celulares marcados de color café) (Figura 14). A los 90 días la diferencia en la inmunoreactividad a PCNA entre los tres grupos no es aparente (Figura 14).

En el conteo, las células positivas a proliferación de 35 días, presentaron una disminución significativa en los grupos PIR ($p = 0.0000$) y PAF ($p = 0.0000$) al compararlos con el grupo control. El grupo PIR presentó una disminución del 36% con respecto al grupo control, mientras que la diferencia entre el grupo PAF y el grupo control fue de 32.1%. Al comparar el grupo PIR contra el grupo PAF también mostró disminución significativa ($p = 0.0000$), observándose que el grupo PIR presentó 4% menos de inmunoreactividad a PCNA que el grupo PAF (Cuadro 3).

A los 90 días, el conteo mostró una diferencia significativa ($p = 0.0000$) entre el grupo PIR y el grupo control. La diferencia significativa presentada entre el grupo PAF y el grupo control a los 35 días, ya no se observa en los conteos realizados a los 90 días ($p = 0,6330$). Por otra parte la diferencia porcentual entre los grupos PIR y control fue de tan solo el 4.8%, es decir los animales a los 90 días presentan una recuperación en los porcentajes de proliferación, aunque sigue existiendo una disminución significativa ($p < 0.05$) en los animales tratados con PIR en comparación al control.

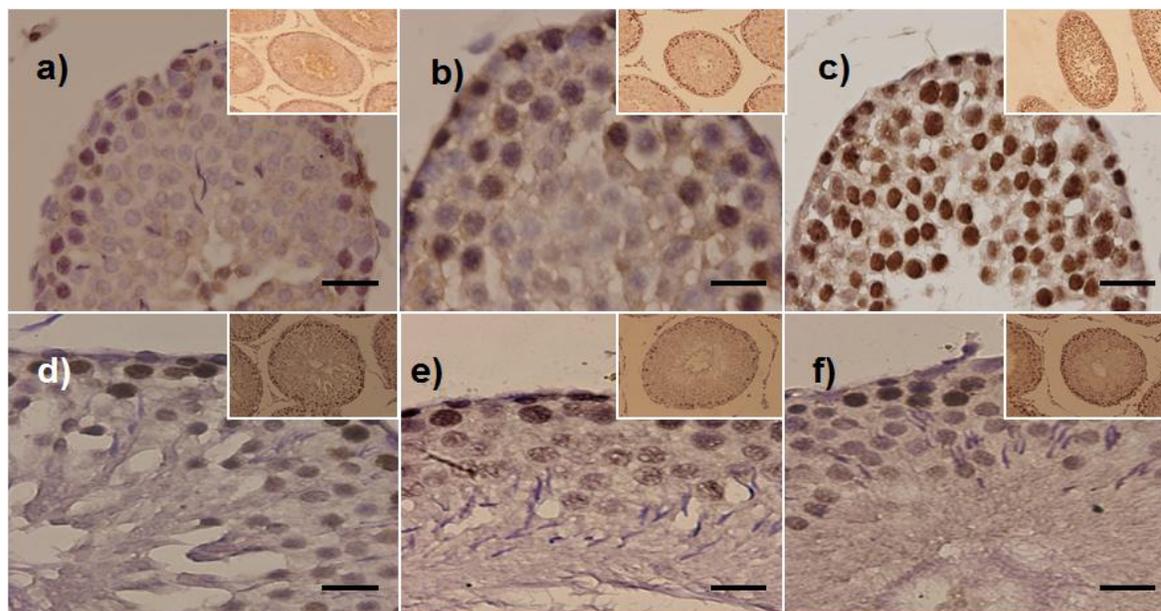


Figura 14. Determinación de proliferación celular por inmunohistoquímica (detección de PCNA) en túbulos seminíferos de los diferentes grupos experimentales: a) Grupo PIR 35 días, b) Grupo PAF 35 días, c) grupo control 35 días, d) Grupo PIR 90 días, Grupo PAF 90 días, grupo control 90 días. Nótese la mayor positividad en grupo control a 35 días (c). A los 90 días la diferencia no es evidente a simple vista, pero los conteos de células positivas revelan diferencia significativa ($p < 0.05$) (tabla 2). Inmunorreacción revelada con DAB. Micrografías principales a 600x. Insertos a 200x. Barra 20 μm .

Cuadro 3. Media \pm error estándar de la proliferación de células testiculares a los 35 y 90 días de edad.

	Grupo PIR	Grupo PAF	Grupo control
Proliferación 35 días	28.5 ± 7.1^a	32.5 ± 1.1^a	64.6 ± 2.2
Proliferación 90 días	20.8 ± 0.7^a	25.4 ± 0.8	25.6 ± 0.9

^a diferencia significativa al comparar contra control ($p < 0.05$).

Determinación de proliferación celular mediante RT-PCR.

Los RT-PCR realizados como método complementario para determinar la expresión de PCNA, mostraron que a los 35 días los animales tratados con PIR, presentaron una menor expresión en comparación a los otros grupos de su misma edad (Figura 15). A los 90 días, la diferencia observada a los 35 días ya no es notoria por lo que todos los grupos presentan una homogeneidad en la expresión de PCNA (Figura 16).

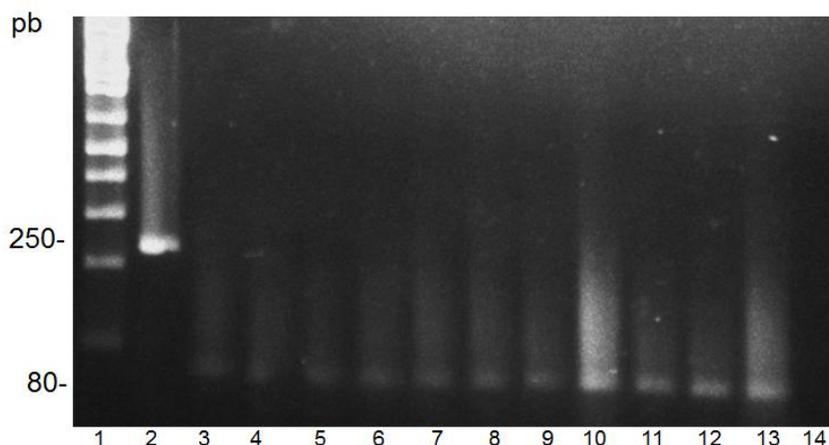


Figura 15. A los 35 días se observa que los animales tratados con pirimetamina, presentan una menor expresión de PCNA en comparación a los otros grupos de su misma edad: Carril 1 marcador de pesos (leader) con 100 pb; Carril 2 gen constitutivo (actina); Carril 3 al 7 grupo PIR; Carril 8 al 9 grupo PAF; Carril 10 al 12 grupo control; Carril 13 cerebro; Carril 14 sin RNA (negativo).

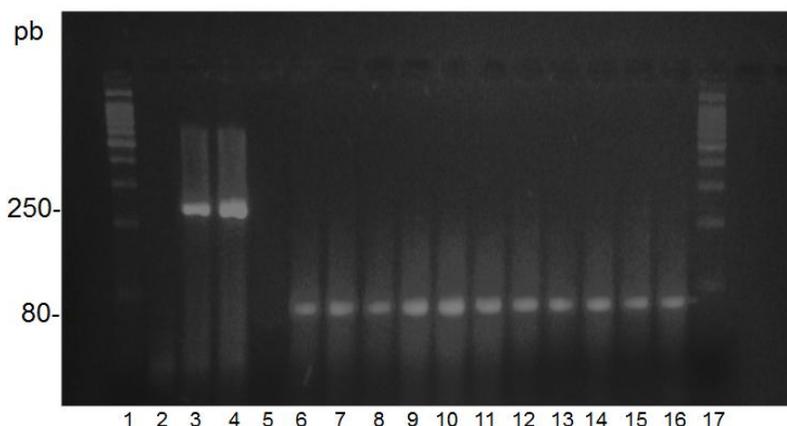


Figura 16. A los 90 días se observa una homogeneidad en la expresión de PCNA en los diferentes grupos: Carril 1 y 17 marcadores de peso (leader); Carril 2 negativo del gen constitutivo; Carril 3 y 4 gen constitutivo (actina); Carril 5 negativo del resto de los PCR; Carril 6 cerebro; carril 7 al 10 grupo PIR; Carril 11 al 14 grupo PAF; Carril 15 y 16 grupo control. (PCNA ~ 80pb, β actina 250 pb).



Evaluación de fertilidad y resultados del espermograma.

Los resultados en el número de crías nacidas, mostraron que se presentó disminución numérica de al menos una cría en el grupo PIR en comparación con el del grupo control; disminución que no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$) (Cuadro 4). El grupo PAF comparado con el grupo control no muestra diferencia numérica, ni estadística ($p > 0.05$) (Cuadro 4).

En el porcentaje de fertilidad, la diferencia entre los grupos PIR y control, mostró una disminución del 12.5%, misma diferencia mostrada entre los grupos PIR y PAF. Esta diferencia porcentual tampoco tuvo significancia ($p > 0.05$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Pruebas de fertilidad realizadas a ratas de los 3 diferentes grupos.

Fecundidad	Grupo PIR	Grupo PAF	Grupo control
N° de crías nacidas	11.7 ± 0.9	12.0 ± 1.1	12.5 ± 1.3
% de hembras preñadas	87.5 ± 6.1	100 ± 0.0	100 ± 0.0

Se presentan medias ± error estándar

^a diferencia significativa al comparar contra control ($p < 0.05$).

El espermograma evidenció que no existió diferencia significativa ($p > 0.05$) en las pruebas de motilidad, morfología y viabilidad (Cuadro 5). En contraste, el grupo PIR presentó disminución significativa ($p = 0.0002$) en la concentración espermática comparada contra la concentración espermática del grupo control (Cuadro 5). Hablando en porcentajes esta disminución fue de 33.25%, en comparación a la concentración espermática presentada por el control.

Cuadro 5. Valoración espermática en ratas adultas

	Grupo PIR	Grupo PAF	Grupo control
Concentración espermática X10⁶	28.3 ± 17.6 ^a	43.7 ± 15.8	42.4 ± 23.4
Motilidad	48.9 ± 2.5	52.1 ± 2.2	54.6 ± 2.3
Morfología espermática	99.5 ± 0.3	99.5 ± 0.2	99.8 ± 0.1
Viabilidad	75.6 ± 5.9	58.2 ± 1.1	72.2 ± 6.9

Se presentan medias ± error estándar

^a diferencia significativa al comparar contra control ($p < 0.05$).



ANÁLISIS DE RESULTADOS

En vista de que la aplicación de PIR en el recién nacido, coincide con los procesos de proliferación de las células que conforman el epitelio seminífero (CS y células germinales), y que la PIR actúa inhibiendo la disponibilidad de folatos requeridos para que la proliferación de estas células se lleve a cabo, en el presente trabajo se analizó el riesgo potencial de la aplicación de la PIR en individuos juveniles.

Para ello es que se determinó el índice de maduración epitelial de los túbulos seminíferos, se cuantificaron las poblaciones intratubulares (células germinales y CS) y se detectó el índice de proliferación de las mismas, utilizando como modelo de experimentación ratas neonatas medicadas durante sus primeros 21 días de vida.

Los conteos de las poblaciones celulares del testículo a los 90 días, efectuadas en las muestras procesadas para cortes semifinos, mostraron que la aplicación de PIR resultó en disminución de las poblaciones de CS y células germinales en comparación con los conteos del grupo control ($p < 0.05$).

La diferencia de un 22% en las poblaciones de células germinales presentada por los animales del grupo PIR, tiene una estrecha relación con la disminución de los conteos de las CS en este mismo grupo, que presentó un 21.3 %.

Por otra parte, el grado de maduración del epitelio seminífero (índice de Johnsen), también se vio afectado por dicha disminución celular. Es decir, la aplicación de PIR provocó el retraso en la maduración del epitelio tubular, al disminuir la proliferación de CS, provocando el menor número de células germinales contabilizadas en nuestro experimento.



Por lo tanto, el menor índice de maduración epitelial, obtenido en nuestras evaluaciones fue el resultado de un menor número de células germinales generadas durante el desarrollo testicular de individuos jóvenes tratados con PIR.

Esta disminución en las poblaciones celulares, es atribuible a la suspensión de la proliferación celular. Dicha interrupción, fue comprobada por medio de la detección del PCNA mediante pruebas inmunohistoquímicas. Este antígeno funciona como cofactor de la DNA polimerasa, durante la formación de la horquilla de replicación, por lo cual es necesario para la síntesis de DNA y su expresión se da en la fase G1 y en la etapa temprana de la Fase S del ciclo celular (D'Andrea y col., 2008). Por lo tanto, su función en el ciclo celular, ha permitido que el PCNA haya sido utilizado anteriormente como un marcador de proliferación celular. Por ejemplo, Tousson y colaboradores (2011), la utilizaron para valorar la disminución del porcentaje de proliferación en espermatogonias en ratas neonatas con hipotiroidismo.

En nuestro caso, la inmunopositividad a PCNA a los 35 días de edad de las ratas medicadas con PIR (25mg/kg/21 días), mostró disminución significativa ($p < 0.05$) en el número de células testiculares en proliferación (Cuadro 3) al compararlas contra el grupo control. Esta disminución fue debida a la inhibición competitiva de la enzima DHFR por la PIR, lo que seguramente redujo la disponibilidad de H_4F esencial en la biosíntesis de timidilatos, nucleósidos, y compuestos de metilo, impidiendo la incorporación de la timina al DNA e interrumpiendo por lo tanto la proliferación celular (Gangjee y col., 2007; Chen y col., 2009).

El porcentaje de disminución en la proliferación celular observado en la ratas a los 90 días, en comparación con el grupo control también tuvo diferencia significativa ($p < 0.05$), es decir que la proliferación celular se ve afectada tanto en animales que recién han terminado su tratamiento, como en animales adultos. Sin embargo, llama la atención de que las diferencias entre el grupo control y el grupo medicado con PIR sean a los 35 días de un 55.8%, mientras que a los 90 días la diferencia (aunque sigue mostrando significancia estadística) disminuye a 18.75%, lo que equivale a una



recuperación de alrededor de 37 puntos porcentuales en el índice de proliferación celular en animales adultos. Por lo tanto, como expondremos más adelante, esta recuperación no es total y se reflejará en alguno de los parámetros espermáticos.

Por otra parte, es conocida la importancia del AF en la replicación celular por lo que se recomienda su adición al tratamiento con PIR, buscando prevenir teratogénias en mujeres gestantes y leucopenias en los pacientes medicados. Bajo este tenor, en el presente trabajo aplicamos 7.5mg/kg de AF lo cual resultó en la disminución de los efectos causados por la PIR en el conteo realizado a las poblaciones de CS y células germinales (Cuadros 2 y 3).

Esto coincide con lo reportado por los equipos de trabajo de Cosentino (1990), Awoniyi (1993), y Kalla (1997), quienes observaron resultados parecidos en sus grupos experimentales adicionados con AF y PIR en ratas adultas. En nuestro estudio, las ratas adicionadas con AF a los 35 días tuvieron un índice de proliferación mayor en 4 puntos porcentuales que el grupo tratado con PIR, aunque manteniendo una diferencia significativa ($p < 0.5$) de 32 puntos porcentuales en comparación al control. Por su parte, la suplementación con AF permitió que a los 90 días las diferencias en proliferación celular y número de células desaparezcan con respecto al control, demostrando la efectividad de esta suplementación contra los efectos citotóxicos de la PIR. Por lo tanto, la acción protectora del AF disminuyó los efectos provocados por la PIR dando como resultado que el epitelio germinal del grupo tratado con PIR mantuviera el mismo grado de madurez que el del grupo control ($p > 0.05$).

A su vez, el RT-PCR practicado a los diferentes grupos experimentales, fue realizado para complementar los resultados observados en la expresión de PCNA por inmunohistoquímica. Este estudio complementario tuvo por objeto corroborar que la expresión total de PCNA coincidía con los resultados obtenidos con la expresión inmunocitoquímica de dicho antígeno.



Esta comprobación fue necesaria debido a que la PCNA se presenta en dos formas básicas, una que participa activamente en la replicación continua del DNA, insoluble y resistente a detergentes, localizada específicamente en el núcleo. Una segunda forma se halla presente de forma libre y sin asociación al DNA, que es una forma soluble y que se degrada en solventes orgánicos (Ventura y col., 2008). Según parece la forma soluble es la más abundante en células en la fase G1, en donde se almacena para estar disponible cuando las DNA polimerasas δ y ϵ la requieren para utilizarla en la reparación del DNA. De ahí que la transformación de PCNA soluble en PCNA insoluble, haya sido utilizada como un indicador de la reparación del DNA mediada por polimerasas (Balajee y Geard, 2001). El procesado de las muestras para su inclusión en parafina provoca la pérdida de la PCNA soluble debido a la acción de los solventes utilizados en el proceso de deshidratación de la muestra, por lo cual la inmunohistoquímica, detecta únicamente la PCNA nuclear. La realización de un RT-PCR como estudio complementario nos permitió corroborar la PCNA total presente en nuestras células de estudio.

La aplicación de un RT-PCR para la detección de PCNA ya ha sido probado con anterioridad en otros tipos celulares, como es el caso de Balajee y Geard (2001), que realizaron un RT-PCR para identificar la presencia de PCNA en células del fibroblasto y su participación en la recuperación de estas por daño oxidativo.

En nuestro caso, los resultados del RT-PCR demostraron que la expresión total de PCNA a los 35 días de edad en los animales medicados con PIR, presento una menor expresión que la del grupo control, corroborando lo detectado por medios inmunohistoquímicos. Por su parte la aplicación de AF conjuntamente con PIR disminuyó los efectos de este medicamento al detectarse una mayor expresión de la PCNA total (pero de igual manera que lo que se vio con la inmunohistoquímica), sin igualar al grupo control.

En su caso, la RT-PCR aplicado a los 90 días mostró que la expresión de PCNA en los grupos tratados con PIR y PAF, incrementó su expresión en comparación



con los grupos análogos de 35 días. Esto es lo mismo que se observó en la inmunohistoquímica, por lo cual se puede deducir que efectivamente existió una recuperación en la proliferación de las células testiculares. Esta recuperación, no es total en el grupo tratado con PIR como se observó en el marcaje inmunohistoquímico con PCNA, aunque utilizando esta técnica de Biología Molecular que detecta el total de la expresión del antígeno (proteína nuclear y proteína citoplasmática), es posible revelar que las diferencias entre los grupos son todavía menores a las que se observan detectando solamente la expresión de la proteína a nivel nuclear.

Es de interés mencionar, que el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de la PIR ha sido estudiado por otros grupos de investigación, que proponen la utilización de este fármaco como agente anticancerígeno, tal es el caso de Chen y colaboradores (2009), que encontraron que la administración de temozolomida (fármaco de quimioterapia anticanceroso) en combinación con PIR mejora sinérgicamente la inhibición del crecimiento y la inducción de apoptosis de las células del melanoma. Esto se atribuye a cierto grado de citotoxicidad de la PIR y a su acción inhibitoria de la DHFR.

Esto coincide con la respuesta de otros tipos celulares deprimidos en su proliferación celular por efecto de la PIR, como en el caso de la toxoplasmosis congénita donde niños que reciben tratamiento pueden presentar leucopenias transitorias (Martin, 2004). La transitoriedad de estas leucopenias se relaciona estrechamente con la aplicación de la PIR, ya que una vez que la leucopenia es confirmada y el fármaco es retirado, las células vuelven a alcanzar sus poblaciones normales (Martin, 2004). Al respecto, nuestros resultados coincidieron en que la supresión del tratamiento con PIR permite la recuperación de las poblaciones celulares afectadas en el testículo. De hecho, la recuperación mostrada por las poblaciones de CS en este estudio se explica probablemente porque el segundo periodo de proliferación de este tipo celular, se presenta en la rata del día 15 al día 30 de edad (Sharpe y col., 2003). Por lo tanto, el tratamiento con PIR hasta el día



veintiuno, coincide únicamente con los primeros 7 días de este segundo periodo proliferativo.

Como hemos visto, la acción de la PIR parece dependiente de que el fármaco esté presente ya que al retirarlo al día veintiuno, se permitió que los procesos de proliferación se restablezcan. Este restablecimiento, sin embargo, no terminó por ser total, lo que se expresó en un menor número de CS en los conteos efectuados en las ratas de 90 días medicadas con PIR.

Por otra parte, mientras que la diferencia en la proliferación entre el grupo control y el grupo medicado con PIR a los 35 días fue del 36%, la diferencia a los 90 días solo representó un 10%. Esto nos refleja una recuperación evidente en los índices de proliferación celular en el testículo, por lo tanto, la reducción en la concentración espermática de los animales medicados como se discutirá más adelante, se relaciona con los conteos disminuidos de células germinales en animales tratados con PIR en comparación a los controles.

La disminución en los conteos de las células germinales se debió no solo a una acción directa de la PIR sobre los procesos de proliferación de dichas células, sino además a un menor número de CS en el testículo. Se acepta desde hace tiempo que el número de CS en el testículo está estrechamente relacionado con el número de células germinales a las que cada CS es capaz de dar soporte (Grinswold, 1998), por lo que a un menor número de CS corresponderá un menor número de células germinales.

Por otra parte, pese a la disminución en la proliferación celular y el retraso de la maduración del epitelio seminífero, los resultados obtenidos en el presente estudio no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la motilidad, morfología y viabilidad espermática entre los diferentes grupos de estudio. Tumkiratiwong y Lerkchundhakriat, (2011), coinciden en el reporte de ausencia de diferencias entre motilidad, morfología y viabilidad espermática en ratas de 9 semanas de edad con



una administración de 25mg/kg/día de PIR por un periodo de 49 días y que fueron sacrificadas 35 días después de la suspensión del tratamiento. Es decir, en ratas adultas se comprueba nuevamente que el efecto de la PIR es dependiente de la presencia de la droga, sin provocar efectos residuales en la mayoría de los parámetros espermáticos, por lo que el retiro del fármaco permite la correcta motilidad, y una morfología y viabilidad espermática normales.

En nuestros resultados, los animales tratados con PIR no presentaron diferencias significativas de fertilidad ($p>0.05$), pero sí una evidente disminución numérica de la misma (del 20%). La subfertilidad en ratas adultas medicadas con PIR ha sido reportada por Awoniyi, y colaboradores (1993), que aplicaron 400mg/kg, observaron disminución en la fertilidad y fecundidad de las mismas, sin embargo estos investigadores utilizaron una concentración 16 veces mayor a la aplicada en nuestro estudio.

Por su parte, Cosentino y colaboradores (1990), reportaron que en ratones adultos la aplicación de diversas concentraciones de PIR (10, 25, 50, 75, 100 y 200 mg/kg/día), resultó en disminución en la fertilidad asociada de manera dosis dependiente. Ambos estudios demuestran que la PIR es capaz de detener la espermatogénesis provocando un descenso en la fertilidad. En ambos estudios, la suspensión del medicamento mejoró los resultados en las pruebas de fertilidad, recuperando parámetros normales.

A diferencia de estos investigadores, en nuestro estudio las ratas medicadas durante sus primeras tres semanas de vida, no recuperaron los índices de fertilidad del grupo control, ni aun después de estar siete semanas sin la presencia del fármaco. Por lo tanto, la recuperación de los parámetros espermáticos de viabilidad, motilidad y morfología, reportada por varios investigadores en animales tratados con PIR en la edad adulta (Cosentino y col., 1990; Awoniyi y col., 1993; Kalla y col., 1997; Murakami y col., 2000; Tumkiratiwong y Lerkchundhakriat, 2011), no se observó en animales tratados en la etapa neonatal y juvenil en el presente estudio, ya que



nuestros resultados, a pesar de no mostrar diferencias significativas en motilidad, viabilidad y morfología si mostraron diferencia en la concentración y por lo tanto, en el número total de espermatozoides por eyaculado.

La disminución en el número de células y la diferencia en el grado de maduración epitelial coinciden con la alteración observada en la concentración espermática. La concentración espermática mostró una disminución significativa ($p < 0.05$) en los animales tratados con PIR en comparación al grupo control, esto fue el reflejo de la disminución de las CS, las cuales dan soporte estructural y metabólico a las células germinales durante la espermatogénesis y por ende se tiene un menor número de células germinales (Buzzard y col., 2002; Walker y Cheng 2005).

De tal manera, que en esta investigación hemos mostrado que las poblaciones de CS se ven disminuidas al ser inhibida su proliferación durante una ventana crítica de susceptibilidad que comprende la primera oleada de proliferación referida en ratas por Sharpe y colaboradores (2003) (día 12 al 15 de la etapa neonatal) y que a su vez, ésta se acompaña con disminución en el conteo de las células germinales intratesticulares y posteriormente, en la rata adulta en disminución de la concentración espermática, lo que confirma que las células afectadas en su proliferación, y que no proliferan en la etapa correspondiente, ya no proliferarán.

Si bien en las ratas de este estudio, la disminución en la concentración no fue determinante para impactar en la fertilidad o fecundidad de la rata adulta de manera dramática (tal vez debido a que la segunda etapa de proliferación de las CS compensa en cierta medida esta disminución), y a pesar de que los datos en esta especie no son 100% extrapolables a la especie humana, no hay que perder de vista que la disminución significativa observada en este trabajo fue del 33.25 % en comparación al control ($28.3 \times 10^5 \pm 17.6$ vs. $42.4 \times 10^5 \pm 23.4$).

En el humano, el número total de espermatozoides en el eyaculado es calculado a partir de la concentración espermática, por lo cual ambos parámetros están



relacionados con los índices de fertilidad (WHO 1996; Zinarman y col., 2000; Slama y col., 2002) y son valores predictivos de la capacidad fértil del eyaculado (Bonde y col., 1998; Larsen y col., 2000). De acuerdo con la OMS, los límites mínimos de referencia en un eyaculado humano son de 15×10^6 espermatozoides por mL en cuanto a concentración y de 39×10^6 espermatozoides totales por eyaculado, por lo tanto, las cuentas espermáticas en nuestra especie, por ser relativamente menores que en otras especies, parecieran más susceptibles de verse afectadas aun por pequeñas variaciones en la concentración, por lo cual no habría que perder de vista el riesgo potencial que implica la administración de PIR en periodos críticos del establecimiento de la fertilidad humana.



CONCLUSIONES

La aplicación de pirimetamina en la rata durante sus tres primeras semanas de vida, disminuye la población de las células de Sertoli y células germinales en la edad adulta.

El menor número de estas células se debió en parte a la disminución de la proliferación celular en la etapa crítica donde, este proceso debe llevarse a cabo.

El menor número de células germinales puede relacionarse con el menor número de células de Sertoli, pero también puede ser resultado de una disminución en el número de gonocitos afectados en su periodo de proliferación.

La administración de pirimetamina no impactó en la morfología, motilidad o viabilidad de los espermatozoides, pero si en su concentración.



BIBLIOGRAFÍA

- Adelsberger J, Baseler M, Imamichi T, Oguariri R. **EVALUATION OF THE EFFECT OF PYRIMETHAMINE, AN ANTI-MALARIAL DRUG, ON HIV-1 REPLICATION.** *Virus Research*, 2010; 153: 269-276.
- Aller J, Pagés G, Madrid P. **ESTUDIO DE LA PAREJA INFÉRTIL.** *En: Pagés G, Aller J, editores, Infertilidad, Fisiología y Tratamiento, Caracas AMOLCA; 2006, 24-29.*
- Ambroise T, Petersen P. **CONGENITAL TOXOPLASMOSIS: PAST, PRESENT AND FUTURE.** *In: CONGENITAL TOXOPLASMOSIS: Scientific background, clinical management and control.* Springer (eds.), 2000. Chapter 1 pp.1-7.
- Arch E, Collado M, Verduzco A. **PRODUCCIÓN Y USO DE MODELOS ANIMALES EN EL CAMPO DE LA AUDIOLOGÍA.** *Cirugía y Cirujanos*, 2004; 72: 427-433.
- Arcot J, Shrestha A, Gusanov U. **ENZYME PROTEIN BINDING ASSAY FOR DETERMINING FOLIC ACID IN FORTIFIED CEREAL FOODS AND STABILITY OF FOLIC ACID UNDER DIFFERENT EXTRACTION CONDITIONS.** *Department of Food Science and Technology*, 2002; 13: 245-25.
- Awoniyi C, Chandrashekar V, Hurst B, Kim W, Schlaff W. **THE EFFECTS OF CHRONIC ADMINISTRATION OF PYRIMETHAMINE ON SPERMATOGENESIS AND FERTILITY IN MALE RATAS.** *Journal of Andrology*, 1993; 14: 174-179.
- Balajee A, Geard C. **NCHROMATIN-BOUND PCNA COMPLEX FORMATION TRIGGERED BY DNA DAMAGE OCCURS INDEPENDENT OF THE ATM GENE PRODUCT IN HUMAN CELLS.** *Nucleic Acids Research*, 2001; 29(6): 1341-1351.
- Baldrick P. **DEVELOPING DRUGS FOR PEDIATRIC USE: ROLE FOR JUVENILE ANIMAL STUDIES?** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2004; 39; 381-389.
- Baracaldo C, Forero Y, Poveda E, Sánchez M, Navarro L. **ESTABILIDAD Y EFECTO DE LA INGESTIÓN SOBRE LOS NIVELES DE FOLATOS EN PLASMA.** *Biomédica*, 2002; 22: 46-50.
- Baynes J, Dominiczak M. (2005), **BIOQUÍMICA MÉDICA.** 2º Edición, Editorial Elsevier, España, pp. 543.
- Bedford S, McDonnell S. **MEASUREMENTS OF REPRODUCTIVE FUNCTION IN STALLIONS TREATED WITH TRIMETHOPRIMSULFAMETHOXAZOLE AND PYRIMETHAMINE.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1999; 215(9): 1317.1319.
- Bedford S, McDonnell S. **SEMEN, TESTICULAR VOLUME, SPERM PRODUCTION EFFICIENCY, AND SEXUAL BEHAVIOR OF STALLIONS TREATED WITH TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE AND PYRIMETHAMINE.** *Reproduction*, 1998; 44: 1-2.



- Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE. **RELATION BETWEEN SEMEN QUALITY AND FERTILITY: A POPULATION-BASED STUDY OF 430 FIRST-PREGNACY PLANNERS.** Lancet ,1998; 352(9135):1172-1177.
- Borrero J, Restrepo J, Rojas W, Vélez H. **HEMATOLOGÍA**, 6° Edición, Fondo Editorial CIB, Medellín (Colombia), 2004, pp.48.
- Boxmeer C, Smit M, Utomo E, Romijn J, Eijkemans J, Lindemans J, Laven J, Macklon N, Steegers E, Steegers R. **LOW FOLATE IN SEMINAL PLASMA IS ASSOCIATED WITH INCREASED SPERM DNA DAMAGE.** Fertility and Sterility, 2009; 92(2): 548-556
- Brinsko S, Blanchard T, Love C, Varner D, Rigby S, Roser J, Davis W, Kennedy T. **EFFECTS OF PONAZURIL ON REPRODUCTIVE FUNCTION OF STALLIONS.** Reproduction, 2002; 48: 72-75.
- Brugo S, Chillik C, Kopelman S. **DEFINICIÓN Y CAUSAS DE LA INFERTILIDAD.** Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología, 2003; 54(4): 227-248.
- Buzzard J, Wreford N, Morrison J. **MARKED EXTENSION OF PROLIFERATION OF RAT SERTOLI CELLS IN CULTURE USING RECOMBINANT HUMAN FSH,** Reproduction, 2002;124: 633-641.
- Carbonari M, Giammarioli A, Giovannetti A, Gambardella L, Iacobini M, Felice M, Malorni W, Pierdominici M, Quinti I. **PYRIMETHAMINE (2,4-DIAMINO-5-P-CHLOROPHENYL-6-ETHYLPYRIMIDINE) INDUCES APOPTOSIS OF FRESHLY ISOLATED HUMAN T LYMPHOCYTES, BYPASSING CD95/FAS MOLECULE BUT INVOLVING ITS INTRINSIC PATHWAY.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2005; 315(3): 1046-1057.
- Chen H, Ge R, Zirkin B. **LEYDIG CELLS: FROM STEM CELLS TO AGING.** Molecular and Cellular Endocrinology, 2009; 306: 9-16.
- Chen M, Osman I, Orlov S. **ANTIFOLATE ACTIVITY OF PYRIMETHAMINE ENHANCES TEMOZOLOMIDE-INDUCED CYTOTOXICITY IN MELANOMA CELLS.** Molecular Cancer Research, 2009; 7(5): 703-712.
- Cosentino M, Pakyz R, Fried J. **PYRIMETHAMINE: AN APPROACH TO THE DEVELOPMENT OF A MALE CONTRACEPTIVE.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990; 87: 1431-1435.
- D'Andrea M, Lawrence D, Nagele R, Wang C, Damiano B. **PCNA INDEXING AS A PRECLINICAL IMMUNOHISTOCHEMICAL BIOMARKER FOR TESTICULAR TOXICITY.** Biotechnic and Histochemistry, 2008; 83(5): 211-20.
- Dasgupta T, Chitnumsub P, Kamchonwongpaisan S, Maneeruttanarungroj C, Nichols S, Lyons T, Tirado J, Jorgensen W, Yuthavong Y, Anderson K. **EXPLOITING STRUCTURAL ANALYSIS, IN SILICO SCREENING, AND SERENDIPITY TO IDENTIFY NOVEL INHIBITORS OF DRUG-RESISTANT FALCIPARUM MALARIA.** ACS Chemical Biology, 2009; 4 (1): 29-40.



- Durán M. **TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA**. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica, 2010; 592: 127-130.
- Durlach R, Kaufer F, Carral L, Freuler C, Ceriotto M, Rodriguez M, Freilij H, Altcheh J, Vazquez L, Corazza R, Fontana M, Arienti H, Sturba E, Gonzalez S, Cecchini E, Salomon C, Nadal M, Gutierrez N, Guarnera E. **CONSENSO ARGENTINO DE TOXOPLASMOSIS CONGENITA**. Medicina, 2008; 68: 75-78.
- Flórez J. **FARMACOLOGÍA HUMANA**, 3ª Edición, Editorial MASSON, Barcelona (España), 2004, pp.1235.
- Franca L, Avelar G, Almeida F. **SPERMATOGENESIS AND SPERM TRANSIT THROUGH THE EPIDIDYMIS IN MAMMALS WITH EMPHASIS ON PIGS**. Theriogenology, 2005; 63: 300-318.
- Gangjee A, Kurup S, Namjoshi O. **DIHYDROFOLATE REDUCTASE AS A TARGET FOR CHEMOTHERAPY IN PARASITES**. Current Pharmaceutical Design, 2007; 13(6): 609-639.
- Ganong W. **FISIOLOGÍA MÉDICA**, 18º Edición, Editorial Manual Moderno, D.F. (México), 2007, pp.463-467.
- Gennaro A. **REMINGTON FARMACIA**, 20º Edición, Editorial Médica PANAMERICANA, Argentina, 2003, pp. 2166-2167.
- Góngora A, Sánchez S, Cubillos S, Cuneo S. **FRAGMENTACIÓN DEL ADN DEL ESPERMATOZOIDE Y SU INFLUENCIA EN LA FERTILIDAD DE LA PAREJA**. Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción, 2011; 3(3): 105-111.
- Gregson A, Plowe C. **MECHANISMS OF RESISTANCE OF MALARIA PARASITES TO ANTIFOLATES**. Pharmacol Rev, 2005; 57:117-145.
- Griswold, M. **THE CENTRAL ROLE OF SERTOLI CELLS SEMINIFEROUS EPITHELIUM**. Seminars in Cell & Developmental Biology, 1988; 9: 411-416.
- Guyton C. **TRATADO DE FISIOLOGÍA MÉDICA**, 6º Edición, Editorial Mc Graw-Hill, México, 2001, pp.1101-1103.
- Hafez E, Hafez B. **REPRODUCCIÓN E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN ANIMALES**. 7º Edición, Editorial Mc Graw-Hill, México, 2000, pp. 33-55.
- Hastings M, Sibley C. **PYRIMETHAMINE AND WR99210 EXERT OPPOSING SELECTION ON DIHYDROFOLATE REDUCTASE FROM PLASMODIUM VIVAX**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002; 99(20): 13137-13141.
- Herráez V, Herranz R, López M. **¿QUÉ ES UN MODELO ANIMAL?** Gaceta Óptica, 2004; 382: 20-24.
- Hess R. **SPERMATOGENESIS, OVERVIEW**. Encyclopedia of Reproduction, 1999; 4: 539-545.



- Illera M, Illera J.C, Illera J. **VITAMINAS Y MINERALES**, Editorial Complutense, España, 2000, pp. 75-79.
- Iwanami Y, Kobayashi T, Kato M, Hirabayashi M, Hochi S. **CHARACTERISTIC OF RAT ROUND SPERMATIDS DIFFERENTIATED FROM SPERMATOGONIAL CELLS DURING CO-CULTURE WITH SERTOLI CELLS, ASSESSED BY FLOW CYTOMETRY, MICROINSEMINATION AND RT-PCR**. Theriogenology, 2006; 65: 288-298.
- Jaber L, Karim I, Jawdat A, Fausi M, Merlob P. **AWARENESS OF FOLIC ACID FOR PREVENTION OF NEURAL TUBE DEFECTS IN A COMMUNITY WITH HIGH PREVALENCE OF CONSANGUINEOUS MARRIAGES**. Annales de Génétique, 2003; 47: 69-75.
- Jégou B, Velez de la Calle JP, Bauche F. **PROTECTIVE EFFECT OF MDPROXYPROGESTERONE ACETATE PLUS TESTOSTERONE AGAINST RADIATION-INDUCED DAMAGE TO THE REPRODUCTIVE FUNCTION OF MALE RATS AND THEIR OFFSPRING**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991; 88: 8710-8714.
- Johnsen S. **TESTICULAR BIOPSY SCORE COUNT- A METHOD FOR REGISTRATION OF SPERMATOGENESIS IN HUMAN TESTES: NORMAL VALUES AND RESULTS IN 335 HYPOGONADAL MALES**. Hormones 1970; 1: 2-25.
- Johnson L, Varner D, Roberts V, Smith T, Keillor G, Scrutchfield W. **EFFICIENCY OF SPERMATOGENESIS: A COMPARATIVE APPROACH**. Animal Reproduction Science, 2000; 60(61): 471-480.
- Kalla N, Saggar S, Puri R, Mehta U. **REGULATION OF MALE FERTILITY BY PYRIMETHAMINE IN ADULT MICE**. Research in Experimental Medicine, 1997; 197: 45-52.
- Kempinas W, Lamanho T. **A METHOD FOR ESTIMATING THE CONCENTRATION OF SPERMATOZOA IN THE RAT CAUDA EPIDIDYIMIDIS**. Laboratory Animals, 1988; 22: 154-156.
- Kerr J, Knell C. **THE FATE OF FETAL LEYDIG CELLS DURING THE DEVELOPMENT OF THE FETAL AND POSTNATAL RAT TESTIS**. Department of Anatomy, 1998; 103: 535-544.
- Lambrota R, Liveraa G, Coffignya H, Pairaulta C, Frydmand R, Haberta Rouiller V. **A NEW METHOD FOR TOXICITY ASSAYS ON HUMAN AND MOUSE FETAL TESTIS**. Biochimie, 2006; 88: 1831-1835.
- Larsen L, Scheike T, Jensen T, Bonde J, Ernst E, Hjollund N, Zhou Y, Skakkebaek N, Giwercman A. **COMPUTER ASSISTED SEMEN ANALYSIS PARAMETERS AS PREDICTORS FOR FERTILITY OF MEN FROM THE GENERAL POPULATION: THE DANISH FIRST PREGNANCY PLANNER STUDY TEAM**. Human Reproduction, 2000. 15: 1562-1567.



- Lee P, Coughlin M. **THE SINGLE TESTIS: PATERNITY AFTER PRESENTATION AS UNILATERAL CRYPTORCHIDISM.** The Journal of Urology, 2002; 168: 1680-1683.
- López E. **INFECTOLOGIA PEDIATRICA: MANUAL PRACTICO.** 2ª. Edición, Editorial Buenos Aires, Universidad de Palermo, Argentina, 2002, pp. 509.
- Maeda K, Satoshi O, Hiroko T. **PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION; IN THE HANDBOOK OF LABOARATOR ANIMALS: THE LABORATORY RAT.** by Krinke GJ editor. American Press, USA. 2000, pp. 150-151.
- Málaga Y, Ortiz D, Hernández I, Tovar J, Ayala A. **DETENCIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS.** Ginecología y Obstetricia de México, 2005; 73: 500-508.
- Malik N, Matlin S, Fried J, Pakyz R, Consentino J. **THE CONTRACEPTIVE EFFECTS OF ETROPINE ON MALE MICE AND RATS.** Journal of Andrology, 1995; 16(2):169-174.
- Martín I. **TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA: UNA MIRADA AL PROBLEMA.** Revista Biomédica 2004; 15: 181-190.
- Melo V. Cuamatzi O. **BIOQUÍMICA DE LOS PROCESOS METABÓLICOS,** 2º Edición, Editorial REVERTÉ, México, 2007, pp. 338.
- Mendis S, Siril H. **DIFFERENTIATION OF THE ADULT LEYDIG CELL POPULATION IN THE POSTNATAL TESTIS.** Biology of Reproduction, 2001; 65: 660-671.
- Mulenga M, Sukwa T, Canfield C, Hutchinson D. **ATOVAQUONE AND PROGUANIL VERSUS PYRIMETHAMINEBULFADOXINE FOR THE TREATMENT OF ACUTE FALCIPARUM MALARIA IN ZAMBIA.** Clinical Therapeutics, 1999; 21(5): 841-852.
- Müller W. **BIOQUÍMICA. FUNDAMENTOS PARA MEDICINA Y CIENCIAS DE LA VIDA,** Editorial REVERÉ, México, 2008, pp. 612.
- Murakami Y, Takeda M, Susuki Y, Fujii H, Ogasawara H, Masuda T. **COLLABORATIVE WORK TO EVALUATE TOXICITY ON MALE REPRODUCTIVE ORGANS BY REPEATED DOSE STUDIES IN RATS. COMPARISON OF THE EFFECTS OF 2-AND 4- WEEK'S PYRIMETHAMINE TREATMENT IN RATS.** The Journal of toxicological Sciences, 2000; 25(Special Issue): 203-210.
- Noiriel A, Naponell A, Bozzo1 G, Gregory J,Hanson A. **FOLATE SALVAGE IN PLANTS: PTERIN ALDEHYDE REDUCTION IS MEDIATED BY MULTIPLE NON-SPECIFIC ALDEHYDE REDUCTASES.** The Plant Journal, 2007; 51: 378-389.
- **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO.**



- Nzila A. **THE PAST, PRESENT AND FUTURE OF ANTIFOLATES IN THE TREATMENT OF PLASMODIUM FALCIPARUM INFECTION.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006; 57: 1043-1054.
- Nzila A, Ward S, Marsh K, Sims P, Hyde J. **COMPARATIVE FOLATE METABOLISM IN HUMANS AND MALARIA PARASITES (PART I): POINTERS FOR MALARIA TREATMENT FROM CANCER CHEMOTHERAPY.** TRENDS in Parasitology , 2005; 21(6): 292-298.
- O'Shaughnessy P, Morrisb I, Huhtaniemi I, Bakera P, Abel H. **ROLE OF ANDROGEN AND GONADOTROPHINS IN THE DEVELOPMENT AND FUNCTION OF THE SERTOLI CELLS AND LEYDIG CELLS: DATA FROM MUTANT AND GENETICALLY MODIFIED MICE.** Molecular and Cellular Endocrinology, 2009; 306: 2-8.
- Obonyoa C, Jumaa E, Ogotub B, Vululea J, Lauc J. **AMODIAQUINE COMBINED WITH SULFADOXINE/PYRIMETHAMINE VERSUS ARTEMISININ-BASED COMBINATIONS FOR THE TREATMENT OF UNCOMPLICATED FALCIPARUM MALARIA IN AFRICA: A META-ANALYSIS.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2007; 101: 117-126.
- Olayemi O. **A REVIEW ON SOME CAUSES OF MALE INFERTILITY.** African Journal of Biotechnology, 2010; 9(20): 2834-2842.
- Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. **EL ESPERMATOZOIDE, DESDE LA EYACULACIÓN HASTA LA FERTILIZACIÓN.** Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 2006; 19: 426-436.
- Palacios A. **FERTILIDAD Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA,** compilación de: Lerner J, Urbina M, Editorial Medica Panamericana, 2008, pp. 101-108.
- Parthasarathy C, Balasubramanian K. **ASSESSMENT OF *IN VITRO* EFFECTS OF METYRAPONE ON LEYDIG CELL STEROIDOGENESIS.** Molecular and Cellular Endocrinology, 2008a; 7 3: 328-338.
- Parthasarathy C, Balasubramanian K. **DIFFERENTIAL EFFECT OF CORTICOSTERONE DEFICIENCY ON THE EXPRESSION OF LH, PROLACTIN AND INSULIN RECEPTORS ON RAT LEYDIG CELLS.** Molecular and Cellular Endocrinology, 2008b;285: 34-42.
- Rafaela M. **INFERTILIDAD FEMENINA.** Ámbito Farmacéutico, 2008; 27: 90-98.
- Ramírez N. Arboleda G, Arboleda H. **REPARACIÓN DEL ADN: UNA POSIBLE RELACIÓN ENTRE LA DEFICIENCIA DE FOLATO Y LA MUERTE NEURONAL.** Acta biológica Colombiana, 2007; 12(2): 135-142.
- Rodríguez G. **ÁCIDO FÓLICO Y VITAMINA B₁₂ EN LA NUTRICIÓN HUMANA.** Revista Cubana Alimentación y Nutrición, 1998; 12(2): 107-119.
- Rodríguez M, Navarro J, Grimalt L, Remohi J, Salom M. **DIAGNÓSTICO Y CONDUCTA A SEGUIR EN EL VARÓN.** En: Remohi J, Romero J, Pellicer A, Simón



C, Vavarro J, editores. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana, 2000, 51-64.

- Rodríguez S, Giustiniano V, Abache E, Hurtado F. **TRATAMIENTO CON ÁCIDO FÓLICO Y ZINC EN HOMBRES SUBFÉRTILES**. Revista de obstetricia y ginecología de Venezuela, 2008; 68(3): 175-180.
- Rogers B, Yanagimachi R. **RETARDATION OF GUINEA PIG SPERM ACROSOME REACTION BY GLUCOSE: THE POSSIBLE IMPORTANCE OF PYRUVATE AND LACTATE METABOLISM IN CAPACITATION AND THE ACROSOME REACTION**. Biology of Reproduction, 1975; 13(5): 568-575.
- Rosowsky A, Mota C, Queener S, Waltham M, Ercikan-Abali E, Bertino J. **2, 4-DIAMINO-5-SUBSTITUTED-QUINAZOLINES AS INHIBITORS OF A HUMAN DIHYDROFOLATE REDUCTASE WITH A SITE-DIRECTED MUTATION AT POSITION 22 AND OF THE DIHYDROFOLATE REDUCTASES FROM PNEUMOCYSTIS CARINII AND TOXOPLASMA GONDI.**, Journal of Medicinal Chemistry, 1995; 38: 745-52.
- Ross M, Pawlina W. **HISTOLOGÍA: TEXTO Y ATLAS COLOR CON BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**, 3° Edición, Editorial Panamericana, Buenos Aires (Argentina), 2007, pp. 789-816.
- Rosso F, Agudelo A, Isaza A, Montoya J. **TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA: ASPECTOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN DURANTE EL EMBARAZO**. Colombia Médica, 2007; 38(3): 316-337.
- Royere D, Guérif F, Laurent V, Hochereau de Reviers M. **APOPTOSIS IN TESTICULAR GERM CELLS**. International Congress Series, 2004; 1266: 170-176.
- Russell L, Renato de Franca L. **BUILDING A TESTIS**. Tissue & Cell, 1995; 27(2): 129-147.
- Sharpe M, McKinnell C, Kivlin C, Fisher S. **PROLIFERATION AND FUNCTIONAL MATURATION OF SERTOLI CELLS, AND THEIR RELEVANCE TO DISORDERS OF TESTIS FUNCTION IN ADULTHOOD**. Society for Reproduction and Fertility, 2003; 125: 769–784.
- Siril H, Mendis-Handagama, Buchanan D, Mason I. **STUDIES ON THE ONSET OF LEYDIG PRECURSOR CELL DIFFERENTIATION IN THE PREPUBERTAL RAT TESTIS**. Biology of Reproduction, 2000; 63: 165–171.
- Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen T, Jørgensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Andersen A, Auger J, Vierula M, Toppari J, Andersen A, Keiding N, Skakkebaek N, Spira A, Jouannet P. **TIME TO PREGNANCY AND SEMEN PARAMETERS: A CROSS-SECTIONAL STUDY AMONG FERTILE COUPLES FROM FOUR EUROPEAN CITIES**. Human Reproduction, 2002; 117: 503-515.
- Sriraman V, Rao V, Sairam M, Jagannadha A. **EFFECT OF DEPRIVAL OF LH ON LEYDIG CELL PROLIFERATION: INVOLVEMENT OF PCNA, CYCLIN D3 AND IGF-1**. Molecular and Cellular Endocrinology, 2000; 162: 113–120.



- Tarulli G, Stanton P, Lerchl A, Meachem S. **ADULT SERTOLLI CELLS ARE NOT TERMINALLY DIFFERENTIATED IN THE DJUNGARIAN HAMSTER: EFFECT OF FSH ON PROLIFERATION AND JUNCTION PROTEIN ORGANIZATION.** *Biology of Reproduction*, 2006; 74: 798-806.
- Teppa G, Palacios T. **EVALUACIÓN ACTUAL DE LA INFERTILIDAD MASCULINA.** *Investigación Clínica*, 2004; 45: 355-370.
- Tousson E, Ali E, Ibrahim W, Mansour M. **PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN AS A MOLECULAR BIOMARKER FOR SPERMATOGENESIS IN PTU-INDUCED HYPOTHYROIDISM.** *Reproductive Sciences*, 2011; 18(7): 679-686.
- Tumkiratiwong P, Lerkchundhakriat K. **EFFECT OF A PYRIMETHAMINE-SULFANILAMIDE COMBINATION ON INDUCED TEMPORAL INFERTILITY IN MALE WISTAR RATS.** *Natural Science*, 2011; 45: 59-69.
- Valdés M, Díaz A, Svarch N. **ACTUALIDADES EN EL TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE LA TOXOPLASMOSIS.** *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 1996; 12(4): 360-369.
- Venturi A, Dal Piaz F, Giovannini C, Gramantieri L, Chieco P, Bolondi L. **HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA EXPRESSES SPECIFIC PCNA ISOFORMS: AN IN VIVO AND IN VITRO EVALUATION.** *Laboratory Investigation*, 2008; 88: 995-1007.
- Vergouwen R, Jacobs S, Huiskamp R, Davids J, Rooij D. **PROLIFERATIVE ACTIVITY OF GONOCYTES, SERTOLI CELLS AND INTERSTITIAL CELLS DURING TESTICULAR DEVELOPMENT IN MICE.** *Journals of Reproduction y Fertility*, 1991; 93: 233-243.
- Vidal E, Kannouche P, Podust V, Yang W, Lehmann A, Woodgate R. **PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN-DEPENDENT COORDINATION OF THE BIOLOGICAL FUNCTIONS OF HUMAN DNA POLYMERASE.** *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(46): 48360-48368.
- Viguera R, Moreno N, Reyes G, Molina D, Cardenas M, Rojas J. **THE EFFECT OF ESTROGEN ON TESTICULAR GONOCYTE MATURATION.** *Reproductive Toxicology*, 2006; 22(3): 513-520.
- Vite J, Ortiz D, Hernández I, Tovar J, Ayala A. **ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE LA INFERTILIDAD EN UNA POBLACIÓN MEXICANA.** *Ginecología Obstetricia de México*, 2005; 73: 360-364.
- Walker H, Cheng J. **FSH AND TESTOSTERONE SIGNALING IN SERTOLI CELLS.** *Reproduction*, 2005; 130: 15-28.
- Wallock L, Tamura T, Mayr C, Johnston K, Ames B, Jacob R. **LOW SEMINAL PLASMA FOLATE CONCENTRATIONS ARE ASSOCIATED WITH LOW SPERM DENSITY AND COUNT IN MALE SMOKERS AND NONSMOKERS.** *Fertility and Sterility*, 2001; 75(2): 252-259.



- Weisser J, Landreh L, Söder O, Svechnikov K. **STEROIDOGENESIS AND STEROIDOGENIC GENE EXPRESSION IN POST NATAL FETAL RAT LEYDIG CELLS.** Molecular and Cellular Endocrinology (in press), DOI. 10.1016/j.mce.2011.03.008.
- World Health Organization (WHO), **TASK FORCE FOR THE REGULATION OF MALE FERTILIT: CONTRACEPTIVE EFFICACY OF TESTOSTERONE-INDUCED AZOOSPERMIA AND OLIGOZOOZPERMIA IN NORMAL MEN.** Fertility and Sterility, 1996; 65: 821-829.
- Xia W, Mruk D, Lee W, Cheng C. **CYTOKINES AND JUNCTION RESTRUCTURING DURING SPERMATOGENESIS-A LESSON TO LEARN FROM THE TESTIS.** Cytokine & Growth Factor Reviews, 2005; 16: 469-493.
- Yen S, Jaffe R, Barbieri R. **ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN,** 4ª Edición, Editorial Médica Panamericana, España, 2001, pp. 664-670.
- Zhang X, Zhou X, Kisliuk R, Piraino J, Cody V, Gangjee A. **DESIGN, SYNTHESIS, BIOLOGICAL EVALUATION AND X-RAY CRYSTAL STRUCTURE OF NOVEL CLASSICAL 6,5,6-TRICYCLIC BENZO[4,5]THIENO[2,3-D]PYRIMIDINES AS DUAL THYMidylate SYNTHASE AND DIHYDROFOLATE REDUCTASE INHIBITORS.** Bioorganic & Medicinal Chemistry 2011; 19: 3585-3594.
- Zinaman M, Brown C, Selevan S, Clegg E. **SEMEN QUALITY AND HUMAN FERTILITY: A PROSPECTIVE STUDY WITH HEALTHY COUPLES.** Journal of Andrology, 2000; 21:145-153.
- www.auladeanatomia.com/genitais/testiculos.htm, (Consulta 25/10/11, 11:22h).



Anexo I Soluciones

Fórmula de la solución de medio mínimo de cultivo

		Para 100 mL
NaCl	102.03 mM	0.696g
NaHCO ₃	25.07 mM	0.311g
CaCl ₂	1.71 mM	0.025g
Glucosa	5.56 mM	0.110g
Rojo fenol	20 µg/mL	0.002mg

Solución formulada para conteo espermático

- NaCl (9 g/1L)
- Formaldehído al 40% (10mL/1L)
- Azul de tripano al 0.4% (0.25g/1L)
- Agua destilada c.b.p (1L)

Fórmulas para reactivos de la inclusión en parafina

Preparación de paraformaldehído al 4% 1000 mL.

- Calentar 500 mL de agua destilada de 50 a 60 °C.
- Agregar 40 g de paraformaldehído + algunas gotas de NaOH hasta que se ponga transparente.
- Enfriar a unos 20 °C y agregar 500 mL de PBS a 0.2M.
- Ajustar el PH a 7.4.

Fórmulas para reactivos de la inclusión en Epon

Fijador de Karnovsky (100mL).

- paraformaldehído al 1% (1g de paraformaldehído en 100 mL de agua), (25 mL).
- Agregar 50 mL de cacodilatos de sodio a 0.2N.



- Agregar 10 mL de glutaraldehído al 25% (presentación original).
- Agregar 15 mL de H₂O bidestilada.

Ajustar PH a 7.3 con HCl o NaOH.

Buffer de cacodilatos al 0.2M (100 mL).

- Agregar 4.2804 g de ácido cacodílico (SIGMA) en 100 mL de agua destilada.

Preparación de EPON (10 mL).

Preparación de A:

- Eponate 12 resin 25 mL (TED PELLA).
DDSA 40.5 mL (TED PELLA).

Preparación de B:

- Eponate 12 resin. 25 mL (TED PELLA).
NMA 22 mL (TED PELLA).

7mL de A y 3 mL de B + catalizador DMP30 0.15 mL (TED PELLA).

Fórmulas para reactivos de inmunohistoquímica

Preparación del citrato de Na 0.01M (300 mL).

- Agregar 0.882 g de citrato de Na en 300 mL de agua destilada y disolver.

Preparación de PBS 0.02M (1000 mL).

A) 5.5 g de fosfato monobásico en 200 mL de agua destilada.

B) 25.4 g de fosfato dibásico en 900 mL de agua destilada.

- 190 mL de A + 810 mL de B = 1000 mL.
- Ajustar PH a 7.4.
- Esta solución puede ser almacenada a temperatura ambiente.

Para preparar PBS a 0.01M (100 mL).

- Agregar 50 mL de PBS 0.2M + 50 mL de agua destilada.



- Agregar 0.85 g de NaCl.
- Ajustar PH a 7.4.

Preparación de PBS + Twin 20 0.1% (100 mL).

- Diluir 100 μ l de Twin 20 en de PBS.

Preparación de BSA al 5%.

- En 10 mL de PBS-Twin 20 0.1% agregar 0.5 g de BSA.