

Universidad de Salamanca  
Facultad de Medicina  
Departamento de Biología Celular y Patología  
Laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Neurociencias de  
Castilla y León  
Laboratorio de Neuroendocrinología y Obesidad del IBSal



Variaciones Morfológicas en el Testículo de Ratones  
Adultos Knock Out para la Proteína de Sustrato de  
Receptor Insulínico IRS2.

José Ignacio Paz Rodríguez

Salamanca 2016



José CARRETERO GONZÁLEZ, Catedrático de Embriología y Anatomía Humana, y Elisa MUÑOZ TORRES, Profesora Titular de Anatomía Patológica, como directores del presente trabajo de Tesis Doctoral,

HACEN CONSTAR:

Que D. José Ignacio PAZ RODRÍGUEZ ha realizado el trabajo " VARIACIONES MORFOLÓGICAS EN EL TESTÍCULO DE RATONES ADULTOS KNOCK OUT PARA LA PROTEÍNA DE SUSTRATO DE RECEPTOR INSULÍNICO IRS2" en el laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, con financiación pública competitiva.

Que a nuestro juicio, el trabajo reúne los requisitos de originalidad, dedicación y labor investigadora; así como de formación investigadora de su autor, que pueden ser exigibles a un trabajo de Tesis Doctoral.

Igualmente reúne todos los requisitos legales en la manipulación de animales.

Por todo ello, dan el visto bueno para la presentación del trabajo para su defensa y lectura.

En Salamanca a 30 de noviembre de 2015.

José Carretero González

Elisa Muñoz Torres



## Índice

Agradecimientos.....	7
Introducción .....	11
La Insulina y su Receptor.....	13
La insulina.....	13
La somatomedina C o insulin growth factor 1 (IGF1).....	15
El receptor de insulina.....	15
Sustratos de receptor insulínico. Las proteínas IRS.....	17
Vías de señalización de la insulina.....	18
Vía de señalización de las MAP quinasas.....	18
Vía de señalización de la PI3K.....	18
Mecanismos de regulación de la señal de insulina .....	19
Regulación en el receptor de insulina (IR).....	19
Regulación en el sustrato del receptor (IRS).....	21
Mecanismos de regulación “aguas abajo” de IRS.....	21
Resistencia a la insulina.....	22
El Testículo.....	24
Organización anatómica e histológica.....	24
Espermatogénesis.....	25
Células de Sertoli .....	25
Esteroidogénesis en el testículo .....	26
El eje somatotrófico y el crecimiento.....	26
Regulación del desarrollo testicular.....	27
Anomalías metabólicas y endocrinas que influyen en la función reproductora.....	29
Efectos de la obesidad en espermatogénesis .....	29
Diabetes y el papel de IRS2 en la reproducción.....	30
Hipótesis y Objetivos del Estudio .....	33
Las IRS y los esteroides gonadales.....	35
Objetivos del Estudio.....	36
Materiales y Métodos empleados.....	37
Animales empleados para el estudio.....	39
Genotipaje .....	39
Extracción, aislamiento y purificación del DNA.....	39
Amplificación del DNA purificado, PCR.....	40
Histoquímica.....	41
Hematoxilina-Eosina.....	41
Inmunocitoquímica.....	41
Detección inmunocitoquímica de PCNA.....	41
Detección inmunocitoquímica de Caspasa 3 activa.....	42
Controles de las reacciones inmunocitoquímicas.....	42
Morfometría y Cuantificación celular.....	43
Análisis morfométrico de los cortes histológicos.....	43
Determinación del índice de marcaje para PCNA.....	45
Análisis Estadístico de los resultados.....	46

Tratamiento de los Textos y figuras. Edición final.....	46
Resultados .....	47
Testículo.....	48
Animales wild type de 6 semanas de edad. ....	48
Animales knock out de 6 semanas de edad. ....	54
Animales wild type de 12 semanas de edad. ....	60
Animales knock out de 12 semanas de edad. ....	68
Epitelio ductal (grosor o altura).....	94
Rete Testis. ....	100
Animales de 6 semanas de edad. ....	100
Animales de 12 semanas de edad. ....	102
Proliferación Celular .....	104
Apoptosis. ....	116
Discusión.....	127
Comentarios sobre la Metodología empleada.....	129
Inmunocitoquímica.....	129
Empleo de PCNA como marcador de proliferación.....	130
Empleo de la Caspasa 3 activa como marcador de apoptosis. ....	132
Morfometría y Planimetría.....	134
Los ratones knock out para la IRS2.....	136
Comentarios en relación con los resultados obtenidos .....	136
IRS2 y testículo. ....	136
Cambios morfológicos y morfométricos. ....	136
Insulina, receptor de insulina, IRS, proliferación y apoptosis. ....	139
Señalización a través de PI3K / Akt. ....	140
Señalización a través de MAPK.....	141
Proliferación, Degeneración y Apoptosis en las células germinales del testículo. .....	141
Conclusiones.....	145
Referencias Bibliográficas.....	149

## Agradecimientos





Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Profesor Carretero y a la Profesora Muñoz directores de esta investigación, por la orientación, seguimiento y supervisión de la misma. Su motivación constante y el apoyo recibido a lo largo de estos años han sido fundamentales para que esta obra haya llegado felizmente a término. Siempre serán para mí un ejemplo de constancia y vocación docente e investigadora.

Al Laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, por abrirme sus puertas y poner a mi disposición todas las instalaciones y recursos necesarios para realizar este trabajo. En especial a Dña. Marisa Fontanillo y Dña. Concepción Sánchez, por su inestimable colaboración en el laboratorio y cuidado y manipulación de los animales empleados en el estudio.

A mis padres, por todos los valores que me han inculcado, y porque siempre me han hecho sentir que su amor era incondicional.

A Miryam, mi mujer, por su cariño, su infinita paciencia y su comprensión. Con su ejemplo he aprendido la lección de que con optimismo y grandeza de corazón es posible alcanzar cualquier meta.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo y han hecho posible que hoy vea la luz.

A todos, gracias de corazón.

El trabajo de Tesis Doctoral que se presenta ha sido realizado en el Dpto. de Anatomía e Histología Humanas de la Facultad de Medicina, en el laboratorio de Neuroendocrinología del INCyL y en el de Neuroendocrinología y Obesidad del IBSal, financiado con cargo a los siguientes proyectos de investigación: SAF2002-00808, Ministerio de Ciencia y Tecnología. FIS PI030818, Instituto de Salud Pública Carlos III.

Los ratones heterocigotos necesarios para formar la colonia de ratones knock out, fueron gentilmente cedidos por la Dra. Burks desde el Instituto de Investigación Príncipe Felipe de Valencia (procedencia inicial, Dr. White, Joslin Diabetes Center de Boston, USA). Muchas gracias por su cooperación inestimable.



# Introducción



## ***La Insulina y su Receptor.***

### **La insulina.**

El páncreas es un órgano situado a la altura de la segunda o tercera vértebra lumbar. Se encuentra rodeado por una fina capsula, que permite observar una estructura lobulillar de aspecto de empedrado. Es una glándula mixta endocrina y exocrina.

La porción exocrina del páncreas está constituida por acinos serosos, fijados a un tejido conjuntivo que se continúa con el de la cápsula. En este tejido conjuntivo se encuentran los conductos excretores pancreáticos intralobulillares, interlobulillares y colectores. Representan éstos, la mayor parte de la masa de la glándula.

La porción endocrina está constituida por una estructura en forma de islotes de células claras poligonales muy vascularizados e inervados denominados islotes de Langerhans. Dentro de cada islote de encuentran cuatro tipos de células: células A o alfa (10-40%), células B o beta (60-90%), células D o delta (10.20) y células F (2-3%). (Carrascal, 2001)

La insulina es la hormona anabólica más potente conocida y es esencial para el apropiado desarrollo tisular, el crecimiento y el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo (Pessin y Saltiel, 2000) y propicia el correcto metabolismo, balance energético y mantenimiento del peso normal del cuerpo (Kanzaki y Pessin, 2001).

En las células beta, la insulina se sintetiza a partir de la proinsulina, una molécula precursora, por acción de enzimas proteolíticas conocidas como prohormonas convertasas, específicamente la proproteína convertasa 1 y la proproteína convertasa 2, así como la exoproteasa carboxipeptidasa E (Steiner y Oyer, 1967). Ciertas modificaciones ejercidas sobre la proinsulina le eliminan una región del centro de la molécula llamada péptido C quedando libres los extremos C-terminal y N-terminal. Estos extremos libres tienen 51 aminoácidos en total y se denominan cadenas A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos), los cuales terminan unidas entre sí por medio de enlaces di-sulfuro (Eyzaguirre y Codner, 2006). De modo que la proinsulina consta de las cadenas B-C-A y los gránulos de secreción liberan las tres cadenas simultáneamente.

La producción endógena de insulina es regulada en varios pasos a lo largo de una ruta sintética. Primero sobre la transcripción del DNA, específicamente a nivel del gen de la insulina. Luego a nivel de la estabilidad del RNAm y a nivel de la traducción del RNAm. Finalmente, también se regula a nivel de las modificaciones postransducción.

Las células beta de los islotes de Langerhans liberan la insulina en dos fases. La primera fase de la liberación de insulina se desencadena rápidamente en respuesta al aumento de los niveles de glucosa en la sangre. La segunda fase produce una liberación sostenida y lenta de las recién formadas vesículas que se activan independientemente de la cantidad de azúcar en la sangre.

En la primera fase la liberación de la insulina ocurre de manera inmediata. La glucosa entra en la célula beta a través del transportador de glucosa GLUT2. Luego la glucosa pasa a la glucólisis y el ciclo respiratorio, donde se producen, por oxidación, varias moléculas de ATP. A continuación los canales de potasio ( $K^+$ ) dependientes de los niveles de ATP y, por tanto, de los niveles de glucosa en sangre, se cierran y la membrana celu-

lar se despolariza. Con esta despolarización de la membrana, los canales de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) voltaje-dependientes se abren y el calcio entra la célula. El aumento en el nivel de calcio intracelular produce la activación de fosfolipasa C, que desdobla los fosfolípidos de membrana fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato en inositol 1,4,5-trifosfato y en diacilglicerol. El inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) se une a los receptores proteicos sobre la membrana del retículo endoplásmico, lo que permite la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico a través de los canales IP3 aumentando más aún la concentración intracelular de calcio. Estas cantidades significativamente mayores de calcio dentro de las células provocan la activación de la sinaptotagmina, que ayuda a la liberación de la insulina previamente sintetizada y almacenada en las vesículas secretoras. (Kumar y col. 2005).

Cierta liberación de insulina ocurre además con la ingesta de alimentos, no sólo de glucosa o hidratos de carbono, y las células beta también se encuentran moduladas por el sistema nervioso autónomo (Kumar y col. 2005).

Otras sustancias que pueden estimular la liberación de insulina incluyen los aminoácidos de las proteínas ingeridas, la acetilcolina (liberada de las terminaciones nervio vago (sistema nervioso parasimpático), la colecistoquinina (secretada por células enteroendocrinas de la mucosa intestinal) y el péptido insulinoatrófico dependiente de glucosa (IGP). Tres aminoácidos (alanina, glicina y arginina) actúan de manera similar a la glucosa alterando el potencial de membrana de la célula beta. La acetilcolina desencadena la liberación de insulina a través de la fosfolipasa C, mientras que la colecistoquinina actúa a través del mecanismo de adenilato-ciclasa. (Kumar y col. 2005)

El sistema nervioso simpático, a través de la estimulación de receptores adrenérgicos alfa 2, como lo demuestran los agonistas de la clonidina o la alfa-metildopa, inhiben la liberación de insulina (Berg, Tymoczko y Strayer. 2008). Sin embargo, cabe señalar que la adrenalina circulante activará los receptores Beta 2 en las células beta de los islotes pancreáticos para promover la liberación de insulina (Berg, Tymoczko y Strayer. 2008). Esto es importante ya que los músculos no pueden beneficiarse de los incrementos de glucosa en la sangre como consecuencia de la estimulación adrenérgica (aumento de la gluconeogénesis y glucogenolisis con los niveles bajos de la insulina en sangre: por el glucagón) a menos que la insulina esté presente para permitir la translocación GLUT-4 a nivel de los tejidos (Berg, Tymoczko y Strayer. 2008).

Por lo tanto, la noradrenalina inhibe la liberación de insulina a través de los receptores alfa2 y, subsecuentemente, la adrenalina circulante proveniente de la médula suprarrenal estimulará los receptores beta2 promoviendo de este modo la liberación de insulina (Berg, Tymoczko y Strayer. 2008).

Cuando el nivel de glucosa se reduce al valor fisiológico normal, la liberación de insulina de las células beta frena o se detiene. Si los niveles de glucosa en sangre se vuelven inferiores a ese nivel, especialmente a niveles peligrosamente bajos, la liberación de hormonas hiperglicémicas, la más prominente de las cuales es el glucagón, obligan a la liberación de glucosa en la sangre a partir de los almacenes celulares, principalmente el almacenamiento de glucógeno en las células del hígado. Mediante el aumento de glucosa en la sangre, las hormonas hiperglicémicas previenen o corrigen la hipoglucemia que pone en peligro la vida del individuo. La liberación de insulina está fuertemente inhibida por la noradrenalina, lo que conduce a un aumento de los niveles de

glucosa en sangre durante momentos de estrés (Eyzaguirre y Codner, 2006; Baynes y Marek, 2005).

La dopamina actúa regulando el mantenimiento de su población (García-Barrado y col., 2015).

### **La somatomedina C o insulin growth factor 1 (IGF1).**

El factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) es un pequeño polipéptido que consiste en 70 aminoácidos con un peso molecular de 7.649 Daltons (Rinderknecht y Humbel, 1978) y se produce principalmente en el hígado pero también por otros muchos tipos de células. Similar a la insulina, IGF1 tiene una cadena A y B conectados por puentes disulfuro y la región del péptido C se compone de 12 aminoácidos. La similitud estructural con la insulina explica la capacidad de IGF1 para unirse al receptor de la insulina aunque con una menor afinidad. En el plasma, el 99% de IGF1 se une a una familia de proteínas de unión (IGFBP1-6) que modulan la disponibilidad de IGF1 libre en los tejidos (Hwa y Rosenfeld, 1999). En los seres humanos, aproximadamente el 80% de la IGF1 circulante se une a IGFBP3, que está regulada principalmente por la hormona de crecimiento (GH) y ligeramente por IGF1 (Laron, 2001). IGF1 juega un importante papel en el crecimiento y está estrechamente relacionado con las acciones de GH y el eje somatotrófico y es el mediador de la actividad mitogénica y anabólica de la GH (Laron, 1999).

### **El receptor de insulina.**

La insulina inicia sus acciones biológicas por su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular. El receptor de insulina (IR) es una glucoproteína que pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de tirosinquinasa, que cuando son estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de Tyr.

La acción de la insulina se inicia través de la unión y activación de su receptor de superficie celular, que consta de dos subunidades alfa (extracelulares) y dos subunidades beta (intracelulares) que se unen por puentes disulfuro en un complejo heterotetramérico en un alfa2beta2 (Pessin y Saltiel, 2000).

Las subunidades localizadas en el exterior de la membrana plasmática contienen sitios de unión a la insulina, mientras que las subunidades intracelulares tienen una porción transmembrana y una porción citosólica en donde se localiza el dominio con actividad de tirosinquinasa. En la región citoplásmica se han identificado tres regiones estructurales (Myers y White, 2002) que incluyen:

La región yuxtamembrana, que parece ser importante en la transmisión de la señal y en donde se localizan las tirosinas Tyr965 y Tyr972.

La región reguladora en la que se encuentran las tirosinas Tyr1158, Tyr1162 y Tyr1163. La autofosforilación de estos tres residuos aumenta de 10 a 20 veces la actividad quinasa del receptor.

La región con sitios de fosforilación en el extremo carboxilo terminal (Tyr1328, Tyr1334) que al parecer puede jugar un importante papel regulador pero no en la señalización del receptor.

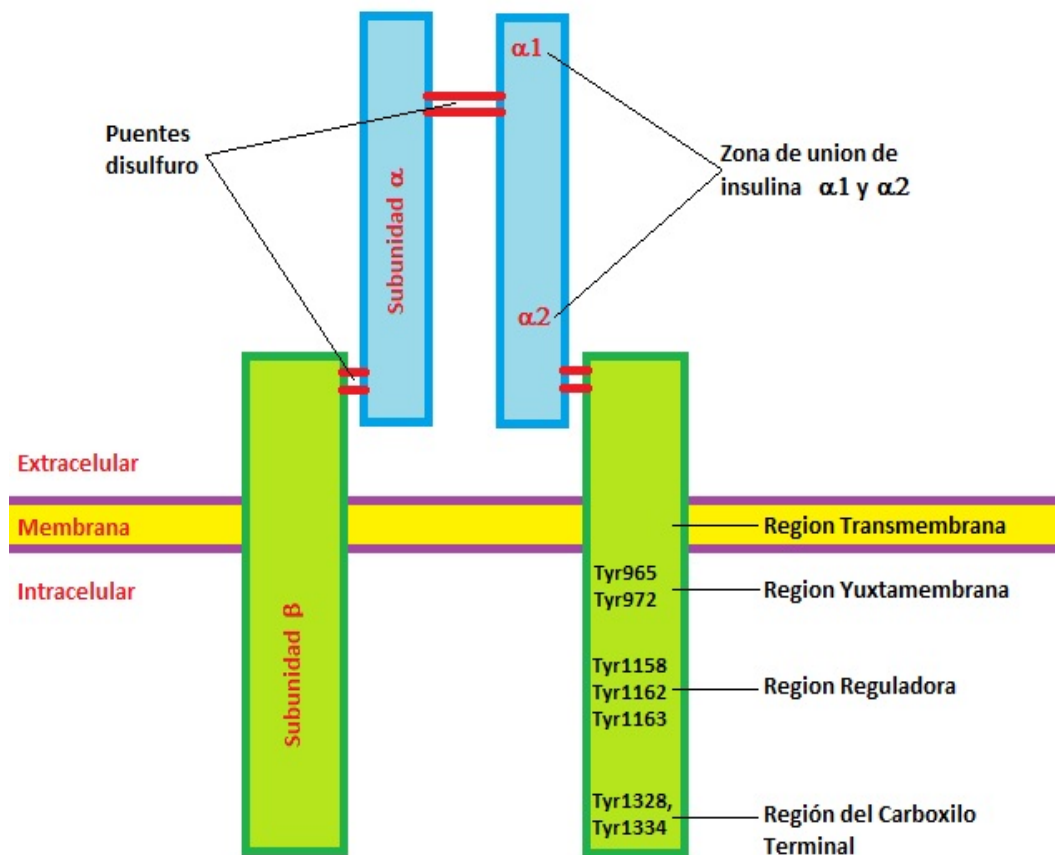


Figura 1. Los receptores para la insulina. Cada receptor de insulina (IR) se compone de un complejo heterotetramérico  $\alpha_2\beta_2$ , no obstante los dímeros alfa-beta se derivan de genes separados y el IR tiene dos variantes de unión, IRb e IRa. Por lo tanto, existen combinaciones de los dímeros individuales alfa-beta e insulina. IGF1, IGF2 y se pueden unir a varios receptores híbridos, aunque con diferentes afinidades.

La subunidad alfa (azul) es la porción extracelular del receptor mientras que la subunidad beta (verde) se extiende por la membrana su porción citoplasmática interactúa con las proteínas IRS y se unen entre si con puentes disulfuro (rojo) en un complejo heterotetramérico



Las señales de IGF1 se activan través del receptor de tipo I IGF1 (IGF1R), un heterotetrámero ampliamente expresado en la superficie celular y muy similar al del receptor de insulina (IR), que posee actividad quinasa intrínseca en sus dominios citoplásmicos (Favelyukis y col., 2001).

La insulina se une a la subunidad alfa extracelular del IR/IGF1R y modifica el dímero de la subunidad alfa que media la trans-autofosforilación entre las subunidades beta que abarcan la membrana (White, 1997). Esto activa la actividad tirosinquinasa intrínseca de la subunidad beta intracelular del receptor que entonces conduce a la fosforilación de tirosina de una variedad de proteínas de conexión. Curiosamente, a diferencia de otros receptores tirosinquinasa que se unen directamente a las colas citoplásmicas de los efectores, el IR y el IGF1R utilizan proteínas de sustrato del receptor de insulina (IRS) para mediar la unión de efectores intracelulares (Ullrich y Schlessinger, 1990).

La actividad del IR / IGF1R están estrictamente reguladas, debido a que la activación sin control o inactividad daría lugar a profundas consecuencias metabólicas. La internalización y la degradación del IR, estimulada por ligando, es una característica común de la mayor parte de las resistencias a la insulina y los estados de hiperinsulinemia, incluyendo la obesidad y la diabetes tipo 2 (Friedman y col., 1997). Un tercer miembro de la familia de los receptores de la insulina es el receptor relacionado con el receptor de la insulina (IRR). A pesar de homologías similares, IRR es todavía un receptor huérfano con función poco clara y se expresa en algunos tejidos (Klamt y col., 2005). La principal diferencia en comparación con el IR y IGF1R es la región C-terminal que carece de al menos 50 aminoácidos (Hanke y Mann, 2009).

### **Sustratos de receptor insulínico. Las proteínas IRS.**

Las proteínas IRS median los efectos de la IR/IGF1R en la fisiología celular y de todo el cuerpo, incluyendo la reproducción (Withers, 2001). Al menos 11 sustratos intracelulares de la IR/IGF1R han sido identificados y cuatro de ellos pertenecen a la familia de las proteínas IRS y han sido nombrados IRS1-4 (Taniguchi y col., 2006). Las proteínas IRS tienen dominios con homología plectrina (PH) y dominios de unión a fosfotirosina (PTB) cerca de la N-terminal que produce la alta afinidad de estos sustratos para la IR/IGF1R.

El dominio PH atrae proteínas IRS a la membrana en la zona próxima al IR/IGF1R y el dominio PTB se une a fosfotirosina 960 situado en una NPXY (asparragina-prolina-Unspecified-Tirosina) en la región yuxtamembrana del IR/IGF1R (Bidinger y Kahn, 2006), pero la obstaculización de estas interacciones por la fosforilación serina/treonina afecta negativamente a la señalización de la insulina (Voliovitch y col., 1995). El centro y C-terminal contienen hasta 20 sitios potenciales de fosforilación de la tirosina que después de la fosforilación por el IR / IGF1R, se unen a moléculas adaptadoras intracelulares que contienen dominios de homología SRC-2 (SR2), tales como la subunidad reguladora p85 de fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), o la proteína de unión del factor de crecimiento 2 (GRB2), que lleva a la activación de cascada de la proteína quinasa RAS-mitógeno-activada (Taniguchi y col., 2006). La fosforilación Serina/treonina adyacente a los sitios de fosforilación de tirosina impide la unión de los dominios SH2 de las proteínas IRS, inhibiendo así la señalización de la insulina (Boura-Halfon y Zick, 2009).

## **Vías de señalización de la insulina.**

Una vez que la insulina interacciona con su receptor y éste es activado, se inicia el encendido de cascadas de señalización a través de un orquestado número de interacciones proteicas.

La insulina a través de su receptor activa dos vías principales de transducción: la vía de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) y la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas), que se encargan de llevar a cabo la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de los efectos mitogénicos (Virkamaky y col., 1999).

### **Vía de señalización de las MAP quinasas.**

Los efectos de la insulina en la regulación de la síntesis de proteínas son mediados principalmente a través de la activación de la vía de señalización de las MAP quinasas.

La fosforilación de los residuos de Tyr del dominio citoplasmático del IR, promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS.

SOS es un factor recambiador de nucleótidos de guanina (GEF), capaz de activar a Ras. La activación de Ras (GTP-Ras) inicia el encendido de la cascada de las MAP quinasas. GTP-Ras se une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de la vía, que involucra el reclutamiento y activación de MEK (también llamada quinasa de MAP quinasa) y de las quinasas reguladas extracelularmente: ERK1 y ERK2.

Alternativamente a esta vía de señalización que lleva a la activación de las ERK1 y ERK2 (conocidas genéricamente como MAP quinasas), la insulina es capaz de activar a estas proteínas por una vía independiente de Shc, pero que depende de la activación del sustrato del receptor de insulina (IRS). Cuando se activa el IRS se produce la unión al complejo Grb2/SOS y a partir de este punto la secuencia de activación de proteínas es la misma que en el caso de Shc.

Las MAP quinasas tienen una amplia gama de sustratos potenciales, incluyendo factores de transcripción y otras quinasas, que participan principalmente en la regulación de la expresión genética en tejidos sensibles a la insulina pero no en la regulación del transporte de glucosa (Virkami y col., 1999).

### **Vía de señalización de la PI3K**

La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos.

La transducción de señales a través de la vía de PI3K se inicia cuando el receptor activo y autofosforilado, interacciona con las proteínas de sustrato de receptor insulínico IRS y lo fosforila. Las proteínas de IRS contienen un dominio amino-terminal de homología a pleckstrina (dominio PH) altamente conservado, seguido por un dominio de unión a fosfotirosinas (PTB), que en conjunto permiten el acoplamiento del IRS al IR activo.

Además, las IRS contienen entre 8 y 18 sitios potenciales de fosforilación (en función del tipo de IRS, de las que se conocen 4 isoformas, IRS-1 a IRS- 4, que al ser fosforiladas por el IR, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2, muchas de las cuales funcionan como proteínas adaptadoras, como es el

caso de PI3K, Grb2 (proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento), Crk II, SHP-2 (proteína tirosina fosfatasa con homología a Src), entre muchas otras (Virkami y col., 1999).

### **Mecanismos de regulación de la señal de insulina**

La duración y extensión de las señales inducidas por acción de la insulina son altamente reguladas para promover el adecuado funcionamiento metabólico, el balance energético y el mantenimiento del peso corporal.

El control de las acciones de la insulina se lleva a cabo gracias a mecanismos muy finos de autorregulación (desensibilización homóloga), en donde enzimas de la misma vía que fueron activadas por acción de la insulina inhiben la actividad de proteínas claves de la señalización, como lo son el IR o sus sustratos IRS.

Alternativamente, señales de vías no relacionadas a la de la insulina pueden inhibir su señalización a través de mecanismos de desensibilización heteróloga. De esta forma, tanto el IR como su principal sustrato, el IRS, se encuentran sujetos a una combinación de mecanismos de desensibilización homóloga y heteróloga.

### **Regulación en el receptor de insulina (IR).**

Una vez que la insulina se une con el IR, el complejo insulina-receptor es internalizado hacia los endosomas primarios, principalmente mediante su inclusión en vesículas recubiertas de clatrina, en donde el IR permanece activo y completamente fosforilado. El pH ácido de los endosomas induce la disociación de la insulina del IR; una vez que la insulina se disocia, ésta es degradada por acción del enzima insulinasa ácida endosomal y el IR es reciclado a la membrana celular. Sin embargo, en condiciones de estimulación prolongada con niveles saturantes de insulina, el IR es transportado a los lisosomas para su degradación. (Carpentier y col., 2002).

De esta forma la internalización, el reciclamiento y la degradación del IR determinan el número de receptores presentes en la superficie celular disponibles para la unión de la insulina. Aunque la internalización del IR juega un papel crucial en la atenuación de los efectos de la insulina, también se ha sugerido que es importante en la activación de Shc y la vía de las MAP quinasas.

Este fino mecanismo de regulación del número y de la activación del IR en la membrana plasmática es crucial para determinar la sensibilidad celular a la insulina, no únicamente en condiciones fisiológicas sino también en condiciones patológicas incluida la resistencia a la insulina (Carpentier y col., 2002).

Se ha postulado que el grado de activación del IR está determinado por acciones opuestas a su fosforilación en residuos de Tyr. Un mecanismo de regulación de la señal de insulina que actualmente es sujeto de un gran número de estudios, involucra la desfosforilación de residuos claves de Tyr en el asa de activación del receptor por la activación de proteínas fosfatasas de Tyr PTPs.

Las PTPs se clasifican en dos categorías: PTPs citosólicas y PTPs de membrana y ambos grupos han sido identificados como reguladores de la actividad del IR. Con respecto a las PTPs localizadas en la membrana PTP al parecer juegan un papel importante en la regulación de la fosforilación del IR. En particular se ha observado que LAR (fosfatasa

relacionada al antígeno común de leucocito) interactúa con el IR y lo desfosforila. (Cheng y col., 2002).

Sin embargo, las evidencias experimentales más importantes de la participación de las PTPs en la regulación de las acciones de la insulina provienen de estudios realizados con PTPs citosólicas, principalmente con la PTP-1B y SHP-2. PTP-1B no únicamente disminuye la señal de la insulina cuando ésta es sobre expresada, sino también se asocia al IR en células intactas, lo que sugiere que puede funcionar como un regulador de las acciones de la insulina *in vivo* (Cheng y col., 2002).

De manera interesante la eliminación del gen PTP-1B en ratones "knock out" muestra un aumento en la sensibilidad a la insulina relacionado a un incremento en el estado de fosforilación en residuos de Tyr del receptor. (Cheng y col., 2002).

Adicionalmente, se ha observado que la desfosforilación del IR por esta fosfatasa induce una disminución en la incorporación de glucosa en tejido muscular y adiposo y alteraciones a nivel metabólico. De esta forma, la inhibición de la PTP-1B resulta ser un atractivo blanco para el diseño de drogas que incrementen la sensibilidad a la insulina. (Cheng y col., 2002).

Otra PTP citoplásmica de interés es SHP-2, la cual contiene dos dominios SH2 que le permiten asociarse a diferentes proteínas durante la señalización de la insulina.

Sin embargo, el papel de SHP-2 en la regulación de las acciones de la insulina parece ser diferente en comparación con PTP-1B, ya que diferentes estudios parecen demostrar que SHP-2 puede tener efectos reguladores positivos y negativos en las acciones de la insulina. En el caso de los efectos negativos, se ha encontrado que SHP-2 se une al IR y a la proteína IRS-1 y que esta unión lleva a la inactivación por desfosforilación de ambas proteínas. (Cheng y col., 2002).

Sin embargo, también existen evidencias que involucran a SHP-2 como un regulador positivo en la vía de Ras/MAPK. Estos resultados evidencian la necesidad de más estudios sobre el papel de las PTPs como reguladores de las acciones de la insulina (Cheng y col., 2002).

La fosforilación en residuos de Ser/Thr ocurre en respuesta a la insulina como un mecanismo que modula su señalización intracelular. Existe evidencia de que un aumento en la fosforilación del IR en residuos de Ser/Thr altera su autofosforilación en respuesta a la insulina.

Diversos estudios han demostrado la participación de la PKC como quinasa clave en la regulación de la actividad del IR, ya que media su fosforilación en las regiones yuxtamembranal, catalítica y carboxilo terminal. (Ebina y col. 1985)

Aunque no es claro el papel de la fosforilación de cada uno de estos residuos en el estado de autofosforilación del IR o en su actividad de quinasa, varios de estos sitios se encuentran en cercana proximidad a los sitios de autofosforilación del IR o se encuentran dentro del sitio catalítico y podrían, por tanto, alterar la conformación del IR o el acceso a residuos de Tyr clave en su activación. (Youngren. 2007; Paz y Zick. 2002).

### **Regulación en el sustrato del receptor (IRS).**

Después del estímulo con insulina, la IRS-1 se fosforila de manera notable, no únicamente en residuos de Tyr sino también en residuos de Ser/Thr. De un total de 232 residuos de Ser/Thr presentes en IRS-1, a la fecha se han identificado alrededor de 70 residuos como sitios potenciales de fosforilación para diferentes quinasas (conocidas como quinasas de IRS).

Actualmente se sabe que, en la mayoría de los casos, la fosforilación de estos residuos está implicada en mecanismos de atenuación de la señal de insulina que desacopla la unión del IRS de proteínas efectoras de la vía de insulina como la PI3K.

La fosforilación en residuos de Ser/ Thr de IRS puede llevarlo a desacoplarse del IR lo que altera su capacidad de experimentar fosforilación en residuos de Tyr, su disociación de complejos intracelulares que lo mantienen en cercanía con el IR, su degradación, o bien, convertirlas en proteínas inhibitoras de la actividad de quinasa del IR (Gual y col., 2005).

Se han identificado varios residuos de Ser/Thr como blancos potenciales de fosforilación de quinasas de IRS que afectan su activación. Entre ellos se encuentran la Ser307, fosforilada por la quinasa del N-terminal de c-Jun (JNK) y por mTOR; la Ser794, fosforilada por la quinasa inducible por sal-2 (SIK-2); la Ser616, fosforilada por ERK y mTOR; la Ser636, fosforilada por ERK y mTOR/S6K1; la Ser323 fosforilada por PKC, y la Ser1101, fosforilada por PKC. En todos los casos, la insulina lleva a la activación de las quinasas mencionadas, resultando en la disminución de la señalización (Engelman y col., 2006).

Youngren (2007) ha demostrado que la familia de proteínas supresoras de proteínas de señalización de citoquinas (SOCS) juega un papel importante en regular negativamente la activación de IRS, ya sea por interacciones directas o indirectas. Se ha demostrado que su expresión es inducida por el tratamiento con la insulina en varios tejidos y líneas celulares. Cuando se induce la síntesis de las proteínas SOCS, éstas son capaces de asociarse con las proteínas IRS, alterando su estructura y su unión al IR y a las proteínas efectoras como la PI3K. Además, se ha observado que la asociación de SOCS con IRS promueve su degradación y disminución en el número de células positivas (Youngren, 2007).

### **Mecanismos de regulación "aguas abajo" de IRS.**

Las fosfatasa de lípidos que desfosforilan los productos de la activación de PI3K están involucradas en la regulación de la vía de insulina aguas abajo de IRS. Entre éstas se encuentran SHIP-2 (inositol fosfatasa con dominio SH2), y PTEN (fosfatasa y homólogo de tensina removido en el cromosoma 10), proteínas fosfatasa que inducen la desfosforilación del PIP3 en las posiciones 5' y 3', respectivamente, generando fosfatidilinositol 3,4 bisfosfato, y fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato. (Le Roith y col., 2003).

Al parecer, estas desfosforilaciones en los lípidos de la membrana tienen efectos biológicos diferentes. Por ejemplo, PTEN parece funcionar como supresor de tumores ya que se ha observado que mutaciones en esta enzima llevan a síndromes neoplásicos sin tener efectos metabólicos. Sin embargo, en el ratón "knock out" de SHIP-2 hay un incremento en la sensibilidad a la insulina debido a un aumento en la producción de PIP3 y por lo tanto a un aumento en la actividad de proteínas que actúan más allá de

PI3K y que están involucradas en procesos relacionados con el transporte de glucosa (Le Roith y col., 2003).

### **Resistencia a la insulina.**

La resistencia a la insulina es un estado patológico en el que las células que ordinariamente responden a la insulina dejan de hacerlo. Los individuos con resistencia a la insulina están predispuestos al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), además de asociarse frecuentemente con un número importante de desordenes de salud entre los que se encuentran obesidad, hipertensión, infecciones crónicas y enfermedades cardiovasculares. Por lo anterior, entender los mecanismos que favorecen el desarrollo de la resistencia a la insulina con el fin de generar tratamientos que ataquen esta condición, ha sido y seguirá siendo tarea de muchos grupos de investigación.

Metabólicamente, de manera general, la resistencia a la insulina se manifiesta por una disminución en el transporte de glucosa inducido por la insulina en adipocitos y músculo esquelético, un aumento de la producción de glucosa hepática y alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo y hepático (Le Roith y col., 2003; Bhattacharya y col., 2007).

Molecularmente, los mecanismos por los que se genera la resistencia a la insulina pueden ser diversos y variar de un individuo a otro. Sin embargo, la resistencia a la insulina es la consecuencia de una deficiente señalización de la insulina causada por mutaciones o modificaciones post-traduccionales del IR o de las moléculas efectoras de su activación.

En algunos casos, la resistencia a la insulina se debe a un defecto en la unión de la insulina a su receptor, pero más a menudo se atribuye a alteraciones posteriores a la unión de la insulina, que alteran desde la funcionalidad de su receptor hasta la actividad de las proteínas efectoras y que desempeñan funciones importantes en la señalización intracelular desencadenada por la insulina (Le Roith y col., 2003).

Entre las alteraciones más comunes se encuentran la disminución en el número de receptores y de su actividad quinasa; un aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr de proteínas clave del receptor y su sustrato; la disminución de la actividad de las quinasas PI3K y Akt, y defectos en la expresión y función del transportador GLUT4 (Sesti, 2006).

De estas alteraciones el aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr a nivel del IR y de las IRS, ha sido considerado como uno de los mecanismos clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Un aumento en el estado de fosforilación de ambas proteínas puede alterar su asociación a otras proteínas, bloquear sitios de fosforilación en Tyr, disminuir su activación e inducir su degradación (Le Roith y col., 2003; Bhattacharya y col., 2007).

La importancia de un aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr de las proteínas IRS también ha sido documentado en estudios clínicos, en donde se ha demostrado que en hígado, músculo y tejido adiposo de pacientes obesos (tejidos que desempeñan un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina), la expresión de las proteínas IRS-1 disminuye alrededor del 54%, y este aumento en la degradación de IRS puede estar dado por un aumento en la fosforilación de IRS en residuos de Ser/Thr. (Bhattacharya y col., 2007)

Varios agentes y condiciones metabólicas han sido implicados como inductores de la resistencia a la insulina. Los más comunes son los ácidos grasos libres y sus metabolitos; el factor de necrosis tumoral (TNF) y otras citoquinas; hormonas catabólicas como la epinefrina, el glucagón y la angiotensina II y hormonas secretadas por el tejido adiposo como la resistina.

De esta forma parece que la resistencia a la insulina es consecuencia de la acción de una multitud de diferentes inductores. Por ejemplo, el incremento la concentración plasmática de ácidos grasos libres se encuentra asociado con muchos estados de resistencia a la insulina, incluyendo obesidad y DM2. En humanos, el contenido y composición de triglicéridos y fosfolípidos en músculo correlaciona directamente con la presencia de resistencia a la insulina. (Bhattacharya y col., 2007)

Inicialmente, el incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres, induce resistencia a la insulina por la inhibición del transporte de glucosa estimulado por la insulina, que es seguido por una reducción en la síntesis de glucógeno en músculo y la oxidación de la glucosa. Estudios a nivel molecular han determinado que el incremento en la concentración de ácidos grasos libres puede llevar a cambios en la expresión del IR y alterar, tanto la unión de la insulina con el receptor como el estado de fosforilación de su dominio de quinasa. Así mismo, pueden inhibir la activación de la enzima PI3K dependiente de IRS-1. (Bhattacharya y col., 2007)

La inhibición de la PI3K por los ácidos grasos libres ha sido asociada a un aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr del IRS-1. Recientemente se ha descrito que los ácidos grasos libres también pueden alterar la activación de Akt debido a un aumento en la cantidad de ceramida y diacilglicerol en células musculares en cultivo (Bhattacharya y col., 2007).

## ***El Testículo.***

### **Organización anatómica e histológica.**

El testículo es la gónada masculina. Está cubierto por una dura cápsula fibrosa de tejido conjuntivo llamada la túnica albugínea y tiene dos grandes compartimentos, el espacio intersticial y el espacio de los túbulos seminíferos. El compartimento intersticial contiene macrófagos, fibroblastos, las fibras nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos. El tipo de célula más abundante en el intersticio es la de células de Leydig, la principal fuente de testosterona (Mori y Cristensen, 1980).

Los túbulos seminíferos son bucles contorneados que tienen dos extremos conectados en el principio del sistema del conducto (rete testis) por los tubulos rectos (tubuli recti). Aunque numerosas circunvoluciones están presentes en cada bucle, los túbulos se enderezan entre circunvoluciones y viajan en gran medida en la dirección del eje largo del testículo. Esto conduce a una agrupación organizada de túbulos dentro de todo el órgano. Como resultado, una sección histológica transversal al eje longitudinal del testículo permite visualizar secciones transversales de los túbulos, mientras que un corte histológico que siga la dirección de dicho eje da lugar a secciones longitudinales de los tubulos (Russell y col., 1990).

El compartimento de los túbulos seminíferos: está limitado por el endotelio linfático, células mioides peritubulares y elementos acelulares. que forman conjuntamente la lámina propia, el tejido que envuelve los túbulos. Las membranas basales se encuentran entre las células endoteliales linfáticas y entre las células mioides peritubulares y las células dentro de los túbulos.

Las células mioides peritubulares son contráctiles y se cree que proporcionan la fuerza motriz importante para el movimiento del fluido y la propulsión de los espermatozoides a través de los túbulos seminíferos (Russell y col., 1989; Holstein y col., 1996).

Junto con la lámina basal, las células mioides proporcionan el apuntalamiento estructural en el cual descansan las células de Sertoli y las células del compartimento basal del resto epitelio seminífero. Por su dirección y su relación con las células germinales, podría decirse que las células de Sertoli proporcionan gran parte de la organización estructural del epitelio seminífero.

Dentro de la membrana basal, los túbulos seminíferos están revestidos por un epitelio columnar que engloba las células germinales y las células somáticas de Sertoli.

Las células de Sertoli adyacentes se unen entre ellas por uniones especializadas para formar una barrera de difusión, la barrera sangre-testículo, que divide el túbulo seminífero en dos compartimentos concéntricos funcionales, basal (periférico o marginal) y adluminal (profundo).

El compartimento basal se compone de células de Sertoli, espermatogonias, y espermatozoides preleptoteno-leptoteno (Wagner y col., 2008).

En el compartimento adluminal, los espermatozoides primarios se dividen y se diferencian en células germinales en etapas más avanzadas de la espermatogénesis. La función de la barrera sangre-testículo es crear un micro-ambiente controlado, proporcio-



nar los nutrientes, mitógenos apropiados, y los factores de diferenciación, así como un ambiente protegido inmunológicamente, necesario para el completo desarrollo de las células germinales (Yan y col., 2008).

### **Espermatogénesis**

La espermatogénesis es un proceso de desarrollo cíclico y altamente coordinado y uno de los sistemas de auto-renovación de más alta productividad en el cuerpo.

Se completa después de aproximadamente 4,5 ciclos y dura unos 30-75 días en los mamíferos (Russell y col., 1990); en ratones un ciclo dura aproximadamente 38 días.

La espermatogénesis es por tanto un ciclo continuo de diferenciación celular que consta de tres fases principales: la renovación y la proliferación de espermatogonias, la meiosis, y espermiogénesis. Se inicia con la división de las células madre de espermatogonias para formar espermatocitos primarios en preleptoteno, que se someten a una replicación final del DNA nuclear antes de entrar en la profase meiótica.

La meiosis sucede cuando los espermatocitos primarios se desarrollan desde la etapa preleptoteno a leptoteno, zigoteno, paquiteno, y finalmente diploteno. Los espermatocitos primarios en diploteno pasan por dos divisiones meióticas y dar lugar a espermátidas redondas. Posteriormente, las espermátidas redondas entran en la espermiogénesis y sufren cambios morfológicos drásticos sin división celular para formar espermátidas alargadas y, por último, los espermatozoides maduros (Clermont, 1972).

Este proceso complejo está dirigido por la expresión de miles de genes codificadores de proteínas que desempeñan papeles esenciales durante fases específicas del desarrollo de las células germinales. A su vez, la expresión de esos genes está regulada durante el desarrollo de la espermatogénesis. Ambos mecanismos de control transcripcional y traduccional son los responsables de los patrones de expresión temporales y de etapa específica (Hech, 1998; Eddy y O'Brien, 1998). Las espermátidas alargadas liberadas en el lumen de los túbulos seminíferos no tienen la capacidad para fertilizar un óvulo. Adquieren esta capacidad de forma gradual mientras transitan por el epidídimo, cuando se exponen al fluido eyaculatorio, y sobre todo durante su viaje en el aparato genital femenino. La capacitación, que puede ser inducida *in vitro*, consiste en una serie de modificaciones bioquímicas y fisiológicas que hacen que el esperma sea capaz de fertilizar un ovocito (Plante y col., 2012) y es un paso clave en la maduración del esperma.

### **Células de Sertoli**

Las células de Sertoli desempeñan un papel principal en el desarrollo funcional del testículo y son las primeras células en diferenciarse de forma reconocible en la gónada fetal indiferenciada, una situación que permite la formación de los cordones seminíferos, la prevención de la entrada de las células germinales en la meiosis y la diferenciación y función de las células de Leydig (Mackat, 2000).

Sin el apoyo físico y metabólico de las células de Sertoli, las células germinales, la diferenciación, la meiosis, y la transformación en espermatozoides no ocurrirían (Sharpe y col., 2003). Además, el número de células de Sertoli determina el tamaño de los testículos y el número de células germinales que pueden ser mantenidas durante la espermatogénesis, determinando así el número de espermatozoides que se puede producir

(Orth y col., 1988). Las diferencias en el tamaño de los testículos entre las especies y dentro de las cepas son explicables por las diferencias en el número de células de Sertoli. Además, el tamaño de los testículos y el número de espermatozoides en el eyaculado muestran una clara relación lineal en los seres humanos (Sharpe y col., 2003).

El establecimiento de un número adecuado de células de Sertoli en la pubertad es crucial para la futura fertilidad masculina y el número de células de Sertoli presente en el testículo adulto depende de la duración de la fase de proliferativa y la tasa de división durante esa fase (Sharpe y col., 2003).

En ratas, la proliferación de células de Sertoli comienza durante la vida fetal y se completa en aproximadamente 16 días después del parto (Wang y col., 1989). La actuación de la hormona folículo estimulante (FSH) es un factor crítico para determinar la tasa de división de las células de Sertoli (Griswold, 1998), modulada por la actuación de otros factores (Wagner y col., 2008). Las hormonas tiroideas están involucradas en la determinación de la duración de la división de las células de Sertoli y pueden estar implicadas en los cambios de maduración que disminuyen y eliminan respuestas mitogénicas a la FSH (Holsberger y col., 2005).

### **Esteroidogénesis en el testículo**

La testosterona es producida por las células de Leydig y se une al receptor de andrógenos (AR) para modular la transcripción de genes en las células diana, tales como células de Sertoli (Quigley y col., 1995).

El desarrollo y el mantenimiento del fenotipo masculino y la fertilidad en adultos son altamente dependientes de los andrógenos. La testosterona controla el desarrollo del sistema reproductor masculino y las características sexuales secundarias, activa el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, masculiniza el cerebro, regula el comportamiento sexual, provoca la diferenciación de los testículos e inicia y mantiene los procesos de la espermatogénesis (Payne y Russell, 1996; McLachlan y col., 2002).

Postnatalmente, la producción de testosterona es impulsada por la hormona luteinizante (LH), que se une a los receptores de LH regulando su actividad y regulando su expresión en las células de Leydig; la LH actuando sobre las células de Leydig mantiene la concentración local y periférica de los andrógenos requerida para el desarrollo hormonal y reproductivo (Huhtaniemi y Toppari, 1995; Dufau, 1988).

La LH unida a su receptor también estimula la activación de la vía MAPK que es un componente crítico de la proliferación de las células de Leydig y su supervivencia (Shiraishi y Ascoli, 2007). La importancia de la señalización MAPK en las células de Leydig ha demostrado que mediante la supresión selectiva de ERK1 y ERK2 causa infertilidad (Shiraishi y Ascoli, 2007).

### **El eje somatotrófico y el crecimiento.**

El crecimiento en los mamíferos implica diversas vías de señalización y está controlado por factores de crecimiento y hormonas; principalmente consiste en un predominio de la proliferación celular sobre la apoptosis, lo que conduce a un aumento del número total de células.

Durante el desarrollo del ratón, este proceso comienza en la embriogénesis temprana en la etapa de blastocisto y dura hasta unos 4-5 meses de edad. La GH y la IGF1 ejercen efectos directos e indirectos en prácticamente todos los órganos del cuerpo y se cree que la GH juega un papel importante en el crecimiento y el desarrollo testicular ya que su deficiencia en el humano se asocia con testículos anormalmente pequeños (Spiteri-Grech y Nieschlag, 1992).

También se ha demostrado que la GH afecta directamente a la esteroidogénesis, la espermatogénesis, y la diferenciación de los testículos así como la secreción de gonadotropina y su capacidad de respuesta (Spiteri-Grech y Nieschlag, 1992; Zachmann, 1992).

La GH es un importante regulador del crecimiento postnatal, a pesar de que juega un papel mínimo en el crecimiento embrionario al contrario que la expresión del receptor de la hormona de crecimiento (GHR) en embriones (Pantaleon y col., 1997), por lo tanto, la falta de acción de la GH no perjudica el crecimiento prenatal (Fowden, 1995).

IGF1 e IGF2 son parte de un sistema de señalización promotor del crecimiento (Efstratiadis, 1998), donde IGF2 es esencial para el crecimiento embrionario normal (De Chiara y col., 1990; 1991) e IGF1 tiene función continua durante todo el desarrollo (De Chiara y col., 1991; Liu y col., 1993).

Existen evidencias considerables de que la GH y la IGF1 producida sistémica y localmente, ejercen efectos estimulantes, sinérgicos, o permisivos en cada nivel del eje Hipotálamo-hipofiso-gonadal. En consonancia con la multitud de acciones causadas por GH y IGF1, GHR y IGF1R que se expresan en el cerebro y los testículos (Nyberg y Burman, 1996; Lobie y col., 1990; Schneider y col., 2003).

Sin embargo, las acciones de IGF1 en muchos de estos sitios representan no sólo las acciones endocrinas en respuesta a GH, sino también los efectos paracrinós del IGF1 producido localmente, que puede ser regulada de forma independiente de GH. Está bien documentado que la producción local de IGF1 juega un papel importante en el control de la función paracrina de diferentes tipos de células en el testículo (Chandrasekar y col., 2004).

Además, la producción tanto de GH e IGF1 está activada por la ingesta de energía y la maduración sexual parece estar vinculada más estrechamente con el crecimiento que con la edad cronológica.

### **Regulación del desarrollo testicular.**

En ratones, las gónadas se forman en el día embrionario (E) 10.0-10.5 y consisten en células somáticas y células germinales primordiales migratorias (Maatouk y col., 2008).

El fenotipo masculino es especificado por la presencia de la región determinante del sexo del cromosoma Y (SRY), que desencadena la diferenciación de las células de Sertoli y, posteriormente, las células de Sertoli funcionan como los centros de organización para dirigir la diferenciación de los testículos. Las alteraciones en la expresión de SRY están asociados con la diferenciación sexual anormal y en ausencia de SRY las gónadas XX o XY no desarrollan testículos (Maatouk y col., 2008; Tevosian y col., 2002; Albrecht y col., 2003).

Los ratones XY mutantes para IR, o para IGF1R y IR, desarrollan ovarios y exhiben un fenotipo completamente femenino y muestran expresión reducida de Sry y Sox9 (SRY box que contiene el gen 9), demostrando que se requiere la vía de señalización de la insulina para la determinación del sexo masculino (Nef y col., 2003).

En las células somáticas genitales XY, la expresión de SRY comienza en E10.5, tiene su pico en E11.5 y mengua en E12.5. Unas horas más tarde la expresión de SOX9 es pre-regulada para inducir la diferenciación de las células de Sertoli. La expresión de SOX9 tiene su pico en E11.5-12.5 y continúa siendo expresado en las células de Sertoli después del nacimiento y a lo largo de la edad adulta (Kashimada y Koopman, 2010).

Los miembros de la familia del factor de transcripción globina (GATA) se conservan a través de la evolución en diferentes especies y GATA1 se expresa en células de Sertoli de ratón desde el día postnatal 7 coincidiendo con la primera ola de la espermatogénesis en ratones prepúberes (Yomogida y col., 1994).

Las células de Sertoli son células irregulares, altas que forman epitelios columnares y un examen de las cadherinas en el testículo ha demostrado que están presente en las células de Sertoli (Wu y col., 1993). La nestina es una proteína de filamentos intermedios y se expresa en las células de Leydig (Lobo y col., 2004). La Box Proteína (DDX4) 4ATP-dependiente de RNA helicasa DEAD (Asp Glu Ala Asp) se expresa en los espermatoцитos de todos los animales y se conserva evolutivamente desde *Drosophila melanogaster* hasta los mamíferos (Hickford y col., 2011).

El control apropiado del ciclo celular es vital para la proliferación y el crecimiento de células, órganos, y organismos. El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es un miembro de la familia de deslizamiento abrazadera de DNA que funciona para proporcionar polimerasas con la alta capacidad de procesamiento requeridas para duplicar un genoma completo. El PCNA interactúa con múltiples proteínas que están implicadas en las vías metabólicas, la reparación del DNA, y la regulación del ciclo celular (Maga y Huhscher, 2003). Las espermatogonias son el único tipo de células dentro de los túbulos seminíferos de ratones adultos que proliferan por mitosis y por lo tanto se acepta que el PCNA intranuclear es un marcador de espermatogonias en el adulto.

El factor de células madre es producido por las células de Sertoli y se une a su receptor c-kit en las espermatogonias y sus interacciones juegan un papel importante en la regulación de la espermatogénesis y se cree que también para regular la proliferación de células germinales, la meiosis, y la apoptosis (Feng y col., 2000).

Durante el desarrollo, las células se vuelven espermatogénicas varias veces. La progresión del ciclo celular depende de la actividad de una serie de complejos ciclina/ciclinaquinasa dependiente (CDK) y la función de los complejos ciclina D / CDK4 como principales integradores de las cascadas de señalización mitogénica y la del ciclo celular por fosforilación y la inactivación de proteínas de retinoblastoma, lo que lleva a la disociación de la transcripción de factores E2F y regulación de la transcripción de genes importantes para la transición G1 / S y de la progresión del ciclo celular a través del punto de restricción G1 / S (Lange y Yee, 2011). El p27kip1 inhibidor de CDK regula la transición G1 / S y su expresión se asocia con la inhibición de la proliferación. La inmunoexpresión de p27kip1 en el testículo en desarrollo coincide con maduración de las células de Sertoli (Sharpe y col., 2003).

## ***Anomalías metabólicas y endocrinas que influyen en la función reproductora.***

En los mamíferos la reproducción es controlada por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal pero también se ve afectada por los cambios en la homeostasis de la energía y el metabolismo. La restricción dietética severa, estados catabólicos, y cortos periodos de privación de calorías perjudican la fertilidad. (Sharpe, 2010).

Del mismo modo, en ambos géneros, la obesidad está asociada a condiciones estériles tales como síndrome de ovario poliquístico (SOP) (Walters y col., 2012) y el número de espermatozoides bajos (Sharpe, 2010).

El SOP es el trastorno endocrino más frecuente en mujeres, afecta a un 5-10% de las mujeres causando infertilidad debido a la disfunción en la maduración folicular y la ovulación, lo que conduce a ovarios multi-quísticos, hiperplasia endometrial e hiperandrogenemia, junto a anomalías metabólicas que incluyen obesidad, hiperinsulinemia, dislipidemia, resistencia a la insulina, aumento del riesgo de diabetes tipo 2, y la enfermedad cardiovascular (Walters y col., 2012; Sabatini y col., 2011).

La obesidad ha aumentado dramáticamente en todo el mundo durante los últimos 30 años y el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como diabetes mellitus, hipertensión, enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular se ha incrementado de forma proporcional al nivel de obesidad en hombres y mujeres (Mah y Wittert, 2010). Hombres y mujeres obesos con un índice de masa corporal de más de 35 kg/m<sup>2</sup> tienen 20 veces más probabilidades de desarrollar diabetes mellitus (Field y col., 2001), que se ha relacionado con alteraciones en la fertilidad en hombres y mujeres (Sabatini y col., 2011; La Vignera y col., 2011; Burks y col., 2000).

### **Efectos de la obesidad en espermatogénesis**

Un factor importante, dependiente del estilo de vida que afecta negativamente a la espermatogénesis es la obesidad.

En los países desarrollados, entre el 10-30% de los hombres son obesos (Hammound y col., 2008), y varios estudios muestran que los hombres obesos tienen tres veces más probabilidades de ser infértiles que los hombres no obesos (Hammound y col., 2008; Magnusdottir y col., 2005).

Además, un índice de masa corporal de más de 25 kg/m<sup>2</sup> se asocia con una reducción del 25% en la cuenta de espermatozoides y la motilidad de los espermatozoides (Jensen y col., 2004; Kort y col., 2006).

Estos cambios pueden deberse a varios factores y las alteraciones en la producción de espermatozoides pueden ser secundarias a cambios en hormonas alteradas. La obesidad en los hombres se asocia con niveles reducidos de testosterona en sangre (Nielsen y col., 2007) y con aumentos de las concentraciones de estradiol, que conducen a una alteración de la relación testosterona-estradiol (Hammound y col., 2008).

La supresión de los niveles de estradiol en los hombres obesos por los inhibidores de la aromatasa normaliza la relación testosterona-estradiol y mejora la calidad del semen (Raman y Schlegel, 2002).

Sin embargo, puede haber efectos intratesticulares que no están relacionados con los niveles de gonadotropina alterados debido a que la reducción en los niveles de inhibina B en los hombres obesos es desproporcionadamente mayor que el cambio en los niveles de FSH, lo que sugiere que puede haber efectos directos del aumento de la obesidad en la función de células de Sertoli (Hammound y col., 2008; Jensen y col., 2004; Winters y col., 2006).

Alternativamente, otra razón podría ser la existencia de un número reducido de células de Sertoli en hombres jóvenes obesos (Winters y col., 2006), lo que implicaría un recuento menor de espermatozoides de forma permanente, aunque no se sabe cómo ni cuándo la obesidad podría conducir a una reducción en el número de las células de Sertoli (Sharpe, 2010).

Otra explicación para la reducción de la espermatogénesis en los hombres obesos podría ser la deposición de grasa en los vasos sanguíneos del escroto, lo que lleva a problemas de refrigeración de sangre y elevación de la temperatura testicular (Shafik y Olfat, 1981) que junto al estilo de vida sedentario de los hombres obesos podría exacerbar el aumento de temperatura.

Teniendo en cuenta la alta prevalencia de la obesidad entre los jóvenes de hoy e igualmente prevalencia alta de bajo conteo de espermatozoides, es posible que la epidemia de la obesidad puede tener un impacto en la espermatogénesis en los hombres jóvenes y también puede hacer que tales individuos sean más susceptibles a los efectos dañinos de otros estilos de vida o exposiciones ambientales.

### **Diabetes y el papel de IRS2 en la reproducción.**

La señalización de insulina también es importante en el testículo y puede desempeñar un papel crítico en el desarrollo del testículo. Los estudios en roedores indican que la diabetes reduce el número de espermatozoides, y afecta en diversos aspectos a la reproducción masculina (Mah y Witter, 2010; Thakur y col., 2012).

Curiosamente, un estudio en hombres con diabetes ha revelado que además de un volumen de semen ligeramente reducido, los parámetros del semen como la concentración de espermatozoides, la producción total de espermatozoides, la motilidad, y la morfología no fueron diferentes entre los hombres diabéticos y no diabéticos, sin embargo había significativamente más fragmentación del DNA nuclear y supresiones del DNA mitocondrial en el espermatozoides de los pacientes diabéticos, lo que perjudicaría su capacidad reproductiva (Agbaje y col., 2007).

A pesar de la homología estructural entre las proteínas IRS, los estudios en ratones knock out y líneas celulares knock out indican que las diversas proteínas IRS tienen papeles complementarios, más que redundantes, en la señalización de insulina/IGF1 porque una delección de cada isoforma tiene una diferente consecuencia biológica (Sesti y col., 2001).

Los ratones que carecen de IRS-1 presentan un profundo retraso en el crecimiento sin un significativo efecto sobre la reproducción, pero la diabetes no sobreviene debido al aumento de la secreción de insulina para compensar la resistencia leve a la insulina (Burks y col., 2000; Whitters y col., 1998; Tamemoto y col., 1994; Araki y col., 1994). Hay fenotipos metabólicos, endocrinos y de crecimiento mínimas sobre la eliminación de IRS3 o IRS4 (Liu y col., 1999; Fantin y col., 2000).

Sin embargo, la supresión de IRS2 conduce a la desregulación del sistema de la señalización de la insulina, la inducción de resistencia a la insulina y disfunción de las células beta del páncreas que se manifiesta en el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Winters y col., 2006).

Las mujeres-IRS2 deficientes son infértiles debido a la reducción del tamaño de la hipófisis y disminución de la gonadotropina, una disminución en las concentraciones de LH en el plasma, una reducción en el tamaño del ovario, reducción del número de folículos, y la consiguiente anovulación (Burks y col., 2000).

La señalización IRS2 en el sistema nervioso central desempeña papeles complejos en la homeostasis de energía (Choudhury y col., 2005), sin embargo, los eventos de señalización "*aguas abajo*" de IRS2 en el ovario juega papeles críticos en el desarrollo folicular y la ovulación mediante la regulación de los componentes clave del aparato de ciclo de célula implicada en la coordinación de la proliferación y la diferenciación (Neganova y col., 2007).

El papel de IRS2 en la reproducción masculina es en gran parte desconocido. Cuando ratones machos *Irs2*  $-/-$  se aparearon con hembras *Irs2*  $-/-$  no se lograron embarazos (Burks y col., 2000), lo que indica que el IRS2 juega un papel esencial en la función reproductora. Los apareamientos entre machos *Irs2*  $+/+$  y hembras *Irs*  $-/-$  resultaron en tasas de embarazo del 9% (Burks y col., 2000), indicando que la función reproductora está gravemente deteriorada en las hembras IRS2-deficientes. Los machos *Irs2*-deficientes son procreadores adecuados antes de la aparición de la diabetes, en esos estadios el apareamientos entre machos *Irs2*  $-/-$  y hembras *Irs2*  $+/+$  resultaron en tasas de embarazo de 88,8% (Burks y col., 2000), lo que sugiere que la función reproductora está ligeramente reducida en los machos IRS2-deficientes.

Sin embargo, los defectos en el metabolismo de carbohidratos debido a IRS2-deficiencia son más graves en los machos que en las hembras, por lo que la diabetes se produce más rápidamente en los machos y en ese momento no muestran interés en el apareamiento (Burks y col., 2000).

Aunque las tasas de embarazo de apareamientos entre diferentes genotipos del IRS indican que la IRS2-deficiencia perjudica ligeramente la función reproductiva en los machos, el fenotipo y los mecanismos son desconocidos.





## Hipótesis y Objetivos del Estudio



Como hemos comentado anteriormente, las proteínas de sustrato de receptor insulínico (IRS) integran señales, desde los receptores de insulina y de factor insulínico de crecimiento IGF-1, con otros procesos, para controlar el crecimiento, la función y la supervivencia celular, ya que la insulina y el IGF-1 ejercen sus efectos fisiológicos a través de la fosforilación y activación de las IRS. El amplio papel regulador de IRS-1 e IRS-2 sobre el crecimiento y la supervivencia celular pone de manifiesto una vía reguladora común para el desarrollo, el crecimiento corporal, la fertilidad, la proliferación neuronal y el envejecimiento (White, 2002).

En este sentido, se ha demostrado que la actuación de las IRS, IRS-1 e IRS-2, es de gran importancia dentro del funcionamiento de diferentes órganos y tejidos.

### **Las IRS y los esteroides gonadales.**

Existen numerosos estudios que sugieren la existencia de una relación entre los estrógenos y la sensibilidad a la insulina. En diferentes tejidos y modelos experimentales, tumorales o no, se han descrito interacciones e interrelaciones entre las IRS y los esteroides gonadales:

En tejidos periféricos se ha demostrado una interrelación entre la cascada de señales intracelulares desencadenadas por la activación de los receptores de IGF-1 y los receptores estrogénicos (Lee y col., 1999) y, en cáncer de mama, se ha demostrado que el crecimiento tumoral y la supervivencia celular están asociados a la expresión de aromatasa, receptor estrogénico y las proteínas IRS-1 e IRS-2 y su fosforilación (Chan y col., 2001; Thordarson y col., 2001).

La progesterona estimulan la expresión del mRNA y aumentan los niveles de IRS-2 (Cui y col., 2003; Valen y col., 2005) y el estradiol fosforiliza a IRS-1 e IRS-2 en el útero (Richards y col., 1998) y regula la degradación de IRS-1 e IRS-2 en el cáncer de mama, aumentando la estabilidad de las IRS a través del receptor estrogénico-alfa (Morelli y col., 2003).

En células HepG2 se ha demostrado que el estradiol aumenta la expresión de IRS-2 (Xie y col., 2003) y, en osteoblastos humanos, se ha demostrado que estradiol y progesterona estimulan la expresión del mRNA de IRS-2 y aumenta los niveles y la fosforilación de IRS-2 (Huang y col., 2005).

Por otro lado, las alteraciones génicas de IRS que aparecen en el síndrome de ovario poliquístico podrían ser responsables de la disfunción de la aromatasa, génicamente conservada, que se observa en dicha enfermedad (Soderlund y col., 2005).

Además, la inducción de ovario poliquístico con antagonistas de la aromatasa (Kafali y col., 2004) podría deberse al defecto de estímulo local de IRS por el déficit de estradiol ya que la resistencia periférica a la insulina observada en este síndrome se asocia a un defecto en la fosforilación de IRS-2 (Qiu y col., 2005) y un descenso en la expresión de IRS-2 en la granulosa ovárica (Wu y Risto, 2004).

Las IRS median las acciones biológicas de la insulina, factores de crecimiento y citoquinas. Esta acción se desarrolla a través de receptores específicos mediados por la fosforilación dependiente de tirosina de las IRS.

La sospecha de la acción testicular de las IRS se pone de manifiesto al demostrarse, mediante inmunocitoquímica, la presencia de IRS-1 y, mediante western blotting la de IRS-1 e IRS-2 en el testículo (Kokk y col., 2005), lo que sugiere que las vías de señales de transducción para insulina, IGF-1 y algunas citoquinas podría llevarse a cabo a través de las IRS en diferentes tipos celulares del testículo.

Mediante el empleo de ratones knock out para IRS-2 se ha comprobado, además, que las IRS son importantes en la reproducción, ya que estos animales eran estériles (Burks y col., 2000; Brüning y col., 2000).

### **Objetivos del Estudio.**

El estudio realizado en esta tesis doctoral, pretende analizar las repercusiones provocadas por la ausencia de IRS-2 en las células y la estructura del testículo; mediante el empleo de ratones knock out para ambas proteínas.

Con la finalidad de comprobar si la ausencia de dichas proteínas altera la funcionalidad y la estructura testicular. Lo que permitiría valorar los fallos, alteraciones y posibles tumores desarrollados por mutación o delección de los genes implicados en la síntesis de la IRS; así como determinar la importancia en estos procesos, previos a la diabetes tipo 2 que dichos ratones desarrollarían poco después como consecuencia de la resistencia periférica a la insulina y a la apoptosis de las células  $\beta$  del páncreas.

## Materiales y Métodos empleados



## **Animales empleados para el estudio.**

Para alcanzar los objetivos propuestos y llevar a cabo el diseño experimental, hemos estudiado 20 ratones machos de los que 10 eran ratones wilde type y 10 eran ratones knock out para IRS2, de 6 y 12 semanas de edad (5 por sexo y edad). Dado que los progenitores knock out son estériles, los animales se obtuvieron a partir de progenitores heterocigotos.

## **Genotipaje**

La determinación de la delección-sustitución de IRS2 se realizó mediante PCR. Para ello, cuando los ratones tenían 20 días de edad, se tomó el fragmento distal de la cola para aislar el DNA.

## **Extracción, aislamiento y purificación del DNA.**

La extracción, aislamiento y purificación del DNA se realizó empleando el kit de Roche(R) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En un tubo de microcentrífuga de 1.5mL y libre de nucleasas se añadieron: 2 a 5 mm de la cola del ratón, 200µl del tampón de lisis de tejidos y 40 µl de proteinasa K reconstituida. Se mezcló e incubó durante 3 horas a 55°C. Transcurrido ese tiempo, con un jeringa de 1 mL, se aspiró la muestra dentro de la jeringa y luego se expulsó, en repetidos ocasiones hasta obtener el lisado. Se añadieron 200µl de tampón de unión y 100 µl de isopropanolol; para después centrifugar 5 minutos a 13000 xg.

Tras insertar un tubo de alto filtrado en un tubo de recogida, se pipeteó el líquido de la muestra en el reservorio superior del tubo de filtrado. Todo el tubo ensamblado se centrifugó 1 minuto a 8000 xg. Después de centrifugar, se retiró el tubo de filtrado del tubo de recogida y se desecharon el líquido filtrado y el tubo de recogida.

Se colocó de nuevo el tubo de filtrado en un nuevo tubo de recogida y se añadieron 500µl del tampón inhibidor de removiada al reservorio superior del tubo de filtrado, para centrifugar 1 minuto a 8000xg. Después de centrifugar y retirar el tubo de filtrado del tubo de recogida y desechar el tubo de recogida y el líquido filtrado, se colocó de nuevo el tubo de filtrado en un nuevo tubo de recogida y se añadieron 500 µl de tampón de lavado al reservorio superior del tubo de filtrado. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 8000x g. Esta operación se realizó dos veces. Se centrifugó durante 10 segundos a velocidad máxima y se desechó el tubo de recogida.

Tras insertar el tubo de filtrado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL limpio y estéril, se añadieron 200 µl del tampón de elución precalentado en el reservorio superior del tubo de filtrado y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 xg. Centrífuga empleada: centrífuga para eppendorf Hermle Z233 M-2.

Después de esta sucesión de pasos, el tubo de microcentrífuga contenía ya el DNA eluido que se utilizó inmediatamente o bien, fue almacenado entre 2-8°C o bien entre -15° y -25° para análisis posteriores (dependiendo del tiempo a transcurrir hasta la realización del análisis).

### **Amplificación del DNA purificado, PCR.**

Una vez aislado el DNA se procedió a realizar la amplificación del fragmento de DNA para detectar la delección-sustitución del gen de IRS2 por el recombinante, Empleando el kit PCR Master mix de Promega<sup>®</sup>, con un volumen de 5 µl de DNA aislado y empleando como primers:

Superior-Recombinante: ctt ggc tac cat gtt gtt att gtc

Inferior-Silvestre: agc tct gga ggt tta ctt tcc tag

La reacción de amplificación se realizó mediante 30 ciclos (94°C-65°C-72°C) en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler<sup>®</sup>.

Una vez amplificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 150mV, utilizando una muestra de 20µl de cada producto amplificado en tampón de carga, con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas se fotografiaron bajo luz ultravioleta. La figura MM1 muestra los resultados obtenidos tras la electroforesis.

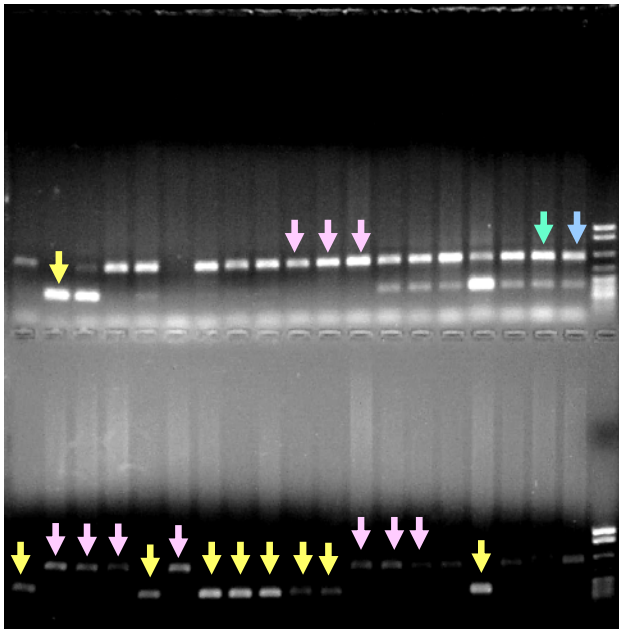


Figura 2. Electroforesis del DNA amplificado por PCR para el gen de IRS2.

En la imagen se aprecian las bandas de electroforesis obtenidas tras el producto de amplificación con PCR del gen silvestre y el recombinante para IRS2, de los animales empleados en el estudio. La flecha verde corresponde con la amplificación del DNA de la hembra progenitora y la flecha azul del macho progenitor. Las flechas amarillas marcan el DNA amplificado por PCR para los ratones wilde type empleados en el es-

### **Sacrificio de los animales y Extracción de las muestras.**

Antes el sacrificio, se procedió a realizar tomas de sangre en condiciones de ayuno y postprandiales para la determinación de las glucemias. Todos los animales empleados en el estudio presentaron glucemias normales entre 85 y 105 mg/ml.

Bajo anestesia con isoflurane, los animales fueron decapitados y, entre otras muestras, se procedió a extraer mediante disección cuidadosa los testículos que se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (0,1M, pH: 7.4) durante 24 horas a 4°C.

Una vez fijadas, se lavaron en el mismo tampón durante 4 horas y se procedió a su deshidratación en etanoles crecientes en concentración (70, 80, 96 y 100%). Ya deshidratadas se procedió a su aclaramiento en xilol para su posterior inclusión en parafi-



nas. La deshidratación, el aclaramiento y la inclusión se realizó en un procesador histológico Leica®.

De los bloques obtenidos se obtuvieron secciones de 5 µm de grosor empleando un micrótopo Microm HM35.

## **Histoquímica.**

### **Hematoxilina-Eosina.**

Los cortes desparafinizados en xilol y rehidratados en concentraciones descendentes de etanol se sumergieron en agua destilada y posteriormente se sumergieron durante 10 minutos en hematoxilina de Mayer (1g de hematoxilina se disuelve en 1000ml de agua y se le añaden 0.2g de IO<sub>3</sub>Na, 50 g de alumbre potásico, 50g de hidrato de cloral y 1g de ácido cítrico) seguido de un lavado en agua destilada y un lavado de 15 minutos en agua corriente. Tras pasar los cortes de nuevo por agua destilada se sumergieron durante 1 minuto en eosina (solución acuosa de eosina al 0.5% con una gota de ácido acético). Posteriormente se diferenció la reacción de la eosina en agua.

Tras la tinción, las muestras se deshidrataron rápidamente en 3 baños de etanol 100% (diferenciando la tinción), las muestras se aclararon en xilol y se montaron con DePeX.

### **Inmunocitoquímica**

La inmunocitoquímica se ha empleado para detectar el antígeno nuclear de proliferación celular PCNA y el marcador de apoptosis caspasa 3 activa..

#### **Detección inmunocitoquímica de PCNA.**

Las muestras se incubaron en estufa a 58°C durante 1 hora, tras lo que se procedió a la desparafinización y rehidratación, con lavado en agua destilada y desionizada durante 5 minutos.

Se bloqueó la peroxidasa endógena sumergiendo las muestras en un baño de Metanol-Agua oxigenada al 3% (200ml/30ml), durante 10 minutos.

Posteriormente se sumergieron en TBS (Trizma base 0.01M, pH 7.4, con 0.09% de NaCl), durante 10 minutos.

Para inhibir reacciones inespecíficas, se incubaron con suero no inmune obtenido en cabra (diluido 1:30 en TBS), durante 20 minutos.

A continuación, se procedió con la reacción inmunocitoquímica, para lo que las muestras se incubaron con suero monoclonal anti-PCNA (Dako®, diluido 1:2000 en TBS), a 4°C C toda la noche. Seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

El suero monoclonal se detectó incubando con suero biotinado de cabra anti Ig G de ratón (Caltag®, diluido 1:150 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

Por último se procedió a incubar con estrepto-avidina-peroxidasa (Caltag®, diluido 1:150 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

El revelado de la reacción se hizo con 3-3'diaminobencidina (Sigma al 25% en TB: Trizma base 0.01M, pH 7.4) a la que se añadió un 0.03% de agua oxigenada inmediatamente antes de su empleo.

Tras lavado en agua destilada, las preparaciones fueron contrastadas con Hematoxilina de Mayer y tras su lavado en agua, se deshidrataron y aclararon en etanol-xilol y se montaron con DePeX.

### **Detección inmunocitoquímica de Caspasa 3 activa.**

Las muestras se incubaron en estufa a 58°C durante 1 hora, tras lo que se procedió a la desparafinización y rehidratación, con lavado en agua destilada y desionizada durante 5 minutos.

Se bloqueó la peroxidasa endógena sumergiendo las muestras en un baño de Metanol-Agua oxigenada al 3% (200ml/30ml), durante 10 minutos.

Posteriormente se sumergieron en TBS (Trizma base 0.01M, pH 7.4, con 0.09% de NaCl), durante 10 minutos.

Para inhibir reacciones inespecíficas, se incubaron con suero no inmune obtenido en cerdo (diluido 1:30 en TBS), durante 20 minutos.

A continuación, se procedió con la reacción inmunocitoquímica, para lo que las muestras se incubaron con suero policlonal anti-Caspasa 3 activa, obtenido en conejo, (Sigma®, diluido 1:1000 en TBS), a 4°C toda la noche. Seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

El suero policlonal se detectó incubando con suero de cerdo anti-IgG de conejo (Dako®, diluido 1:100 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

Por último se procedió a incubar con el complejo soluble PAPA (Dako®, diluido 1:100 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

El revelado de la reacción se hizo con 3-3'diaminobencidina (Sigma al 25% en TB: Trizma base 0.01M, pH 7.4) a la que se añadió un 0.03% de agua oxigenada inmediatamente antes de su empleo.

Tras lavado en agua destilada, las preparaciones fueron contrastadas con Hematoxilina de Mayer y tras su lavado en agua, se deshidrataron y aclararon en etanol-xilol y se montaron con DePeX.

### **Controles de las reacciones inmunocitoquímicas.**

Se procedió a realizar un test de dilución de los anticuerpos primarios, comprobando como diluciones óptimas la de 1:2000 en el caso de PCNA y la de 1:1000 para Caspasa 3 activa.

Se sustituyó el suero primario específico por suero no inmune de ratón, diluido en TBS a la misma concentración que se diluyó el suero inmune.

En todos los casos, no se obtuvo positividad al finalizar el proceso.

### **Morfometría y Cuantificación celular.**

Todos los estudios morfométricos realizados en este estudio se hicieron empleando el software libre de NIH Image J.

Para ello se trabajó sobre imágenes digitales a máxima resolución (4080x). Las micrografías obtenidas por microscopía óptica se obtuvieron con un microscopio Zeiss-Axiophot (R) con iluminación estándar halógena unificada por un estabilizador de corriente en habitación oscura, mediante captación con una cámara digital Olympus DP70® y el software de captura de imagen Olympus DP Controller 1.1.1.65®. Todo el estudio se realizó con un ordenador dotado de un procesador PentiumV doble core® y 16Mb de RAM, tarjeta gráfica Nvidia de 5Mb y monitor Sony Bravia de alta resolución.

Las mediciones fueron realizadas a doble ciego, por el doctorando y los directores de la Tesis Doctoral, con un error intraensayo de 0.176%.

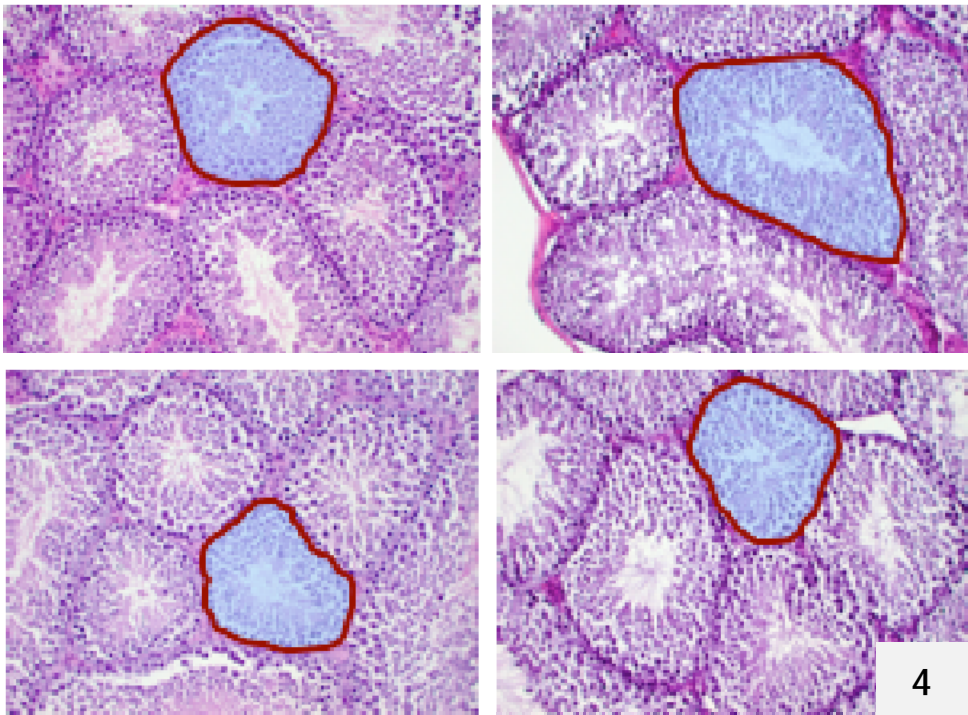
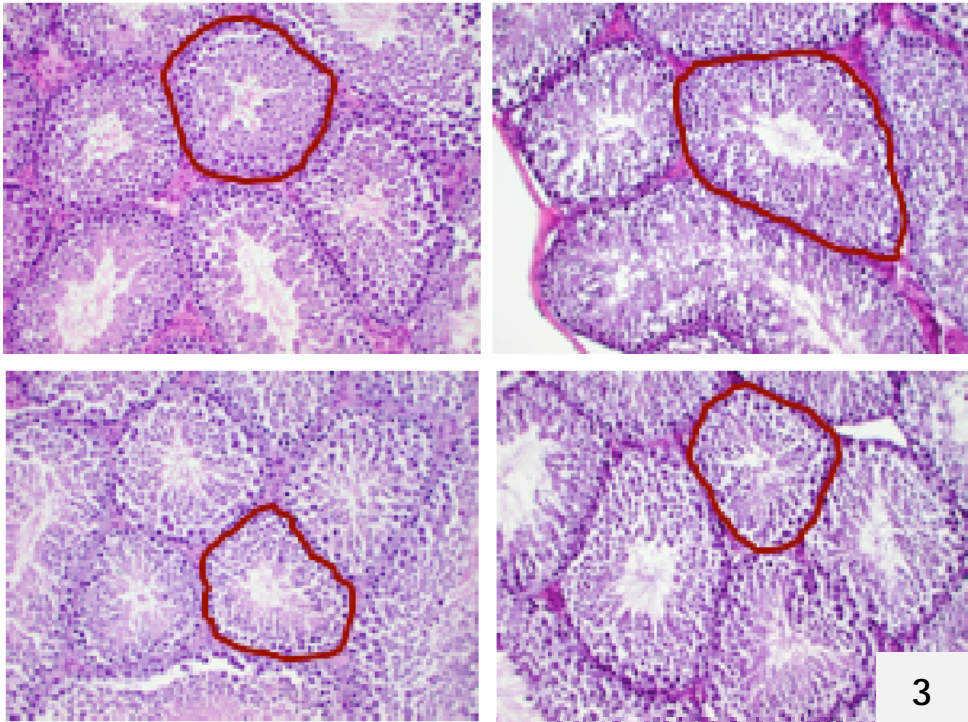
Los valores obtenidos se expresan en píxeles.

### **Análisis morfométrico de los cortes histológicos.**

Para el análisis morfométrico de los cortes histológicos se eligieron 4 secciones transversales de cada animal, bien conservadas en su estructura, de todas las zonas del testículo y separadas al menos por 75 µm.

En cada sección se trazaron perfiles contorneando al túbulo seminífero. Los túbulos perfilados se eligieron al azar a partir del primer túbulo perfilado se desplazaba lateralmente la imagen para elegir el siguiente túbulo con otros dos túbulos interpuestos que no fueron elegidos. Eran criterios de selección que el margen periférico del túbulo estuviera intacto, que la sección fuera transversal al eje longitudinal del túbulo y que la imagen se encontrara enfocada en el plano de corte.

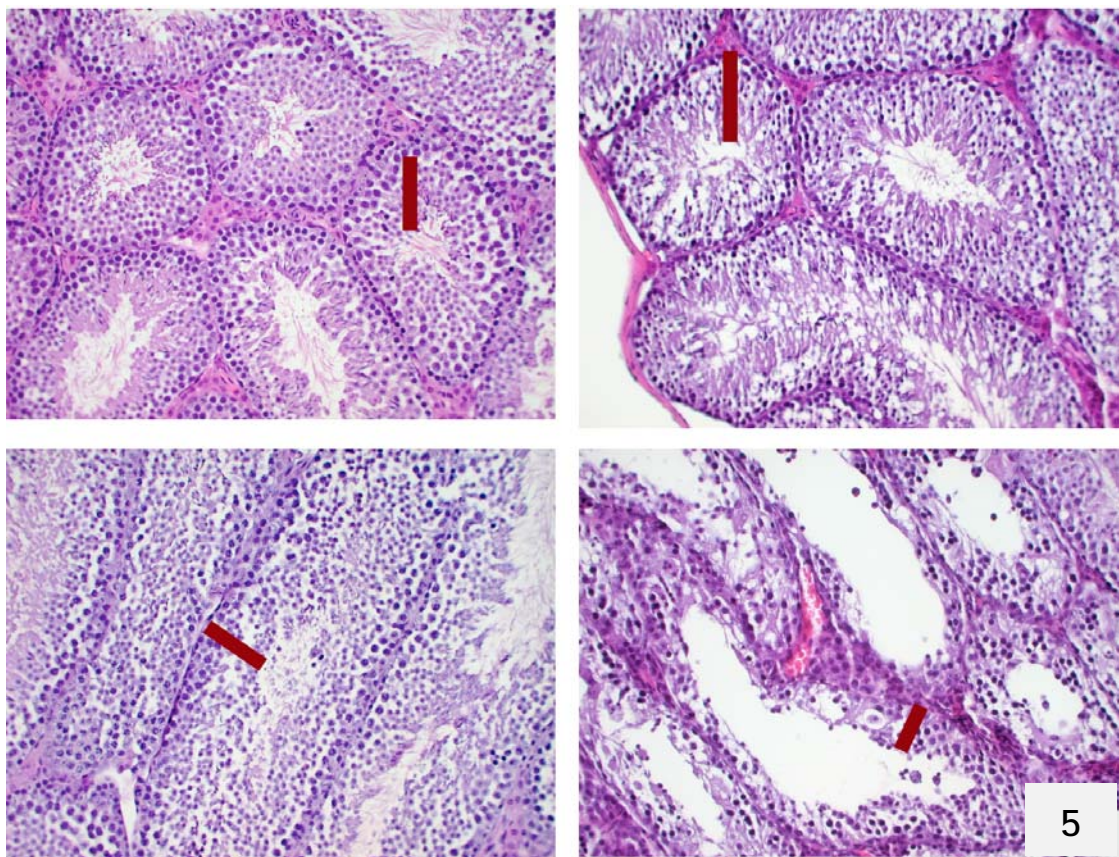
De esta manera se analizaron 50 túbulos por sección elegida, lo que supuso el estudio aleatorio de 200 túbulos por animal (1000 por grupo de estudio). Con estos criterios se analizaron la superficie del túbulo en el plano de corte (figura 3) y su perímetro (figura 4). Los valores obtenidos se expresan en píxeles.



A partir de 4 secciones transversales de cada animal, bien conservadas en su estructura, de todas las zonas del testículo y separadas al menos por 75  $\mu\text{m}$  se seleccionaron aleatoriamente, de forma similar a la descrita anteriormente, 50 túbulo seminíferos por corte y en cada túbulo se perfiló la altura del epitelio en cuatro puntos diferentes (superior, inferior, izquierdo y derecho) de forma semejante a como se muestra en la figura 5.

Calculando de esa manera la altura o grosor del epitelio en 200 puntos diferentes por corte (800 por animal, 4000 por grupo de estudio). Los valores obtenidos se expresan en pixeles.

Eran criterios de selección que el margen periférico del túbulo estuviera intacto y que la imagen se encontrara enfocada en el plano de corte.



#### **Determinación del índice de marcaje para PCNA.**

Sobre fotografías digitales semejantes a las empleadas para el estudio morfométrico, pero obtenidas de secciones en las que se había realizado el inmunomarcaje a PCNA se procedió a cuantificar el porcentaje de células positivas a PCNA del total de células presentes en las tres primeras hileras celulares del epitelio ductal. Para ello se cuantificaron 4000 células por animal obtenidas aleatoriamente de todo el testículo. Los túbulo se eligieron de forma semejante a como se describe en el análisis morfométrico. Tras determinar el valor absoluto de células positivas al marcador se calculó el porcentaje con respecto al total celular, los valores obtenidos se expresan como la media aritmética de los valores individuales de los 5 animales que constituían cada grupo.

### **Análisis Estadístico de los resultados.**

Empleando la aplicación SPSS, de los valores obtenidos se obtuvieron medidas de centralización y dispersión. Las diferencias observadas entre los ratones wilde type y los ratones knock out se contrastaron aplicando el análisis de la t de Student, aceptando como significativos valores menores de  $p < 0.05$ .

### **Tratamiento de los Textos y figuras. Edición final.**

Las micrografías fueron digitalizadas empleando una cámara digital Olympus DP70® y el software de captura de imagen Olympus DP Controller 1.1.1.65®, exportadas a un ordenador Apple IMac® y procesadas mediante el programa Adobe PhotoShop CS 5.0® (resolución final 4000 ppp).

El procesado de los textos, los gráficos y la edición final se realizó con el programa Microsoft Word: Mac v 14.5.8.

La impresión se realizó con una impresora OKI C5600 a color.

## Resultados

## **Testículo.**

### **Animales wild type de 6 semanas de edad.**

Como se ha comentado en el capítulo de introducción, la estructura microscópica del testículo está formada por un conjunto de conductos seminíferos donde se lleva a cabo la espermiogénesis y las etapas iniciales de la espermatogénesis.

Las figuras 6 y 7 muestran a pequeños y medianos aumentos el aspecto típico de dichos conductos en los animales wild type postpúberes de 6 semanas de edad.

Están rodeados por una fina membrana de tejido muscular por dentro de la que cabría diferencias dos zonas concéntricas, una periférica y otra central.

La zona periférica diferencia a su vez tres partes:

La más marginal que generalmente está formada por una hilera de células, presumiblemente espermatogonias (a en figura 7). Asienta sobre el tejido muscular y presenta células cúbicas con un citoplasma claro o ligeramente hematoxínófilo y núcleos grandes y centrales y muy teñidos con hematoxilina. A veces se observa alguna célula de Sertoli.

Una parte intermedia, formada presumiblemente por espermatocitos de primer orden, en la que destaca la presencia de división celular, formada por dos o tres hileras celulares concéntricas con células discretamente mayores y más irregulares en su forma, de citoplasma claro y núcleos de mayor tamaño, bien teñidos con hematoxilina de disposición variable dentro de la célula (b en figura 7).

Formando un número variable de hileras celulares concéntricas, de seis a ocho, presumiblemente espermatocitos de segundo orden y espermatídes, se sitúa la parte más profunda, formada por células más pequeñas con escaso citoplasma y un núcleo muy pequeño (c en figura 7).

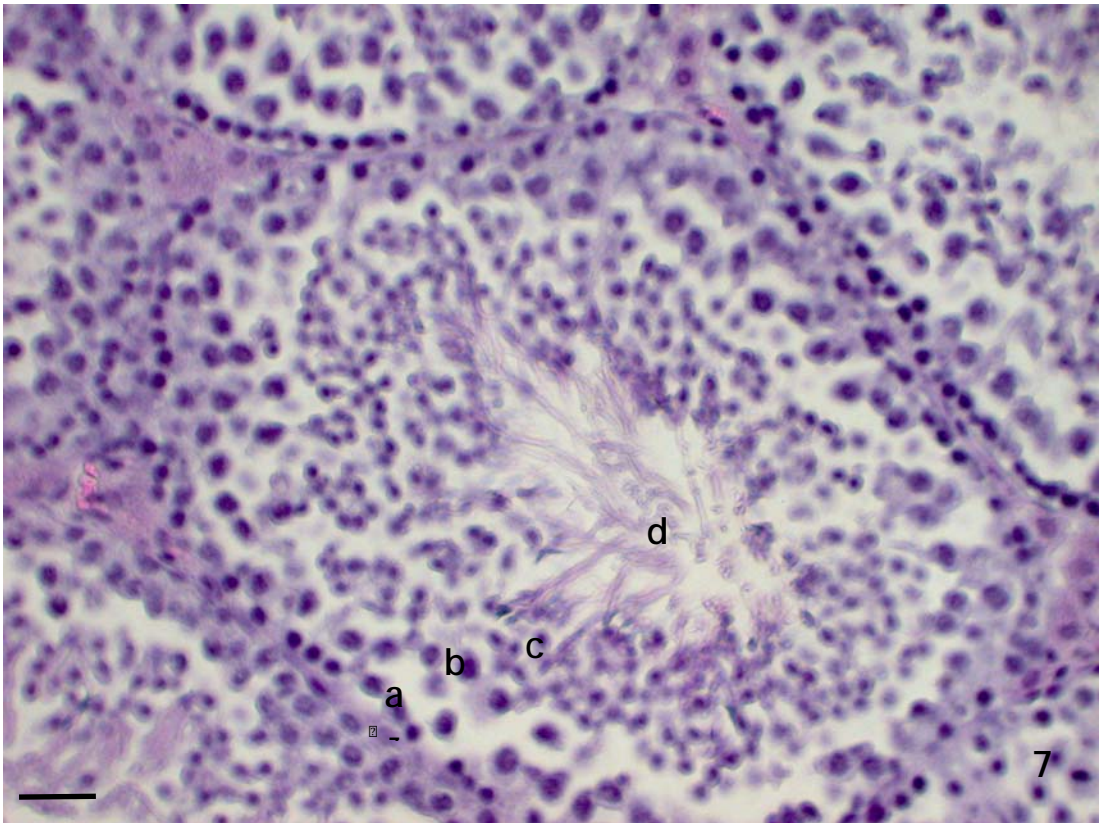
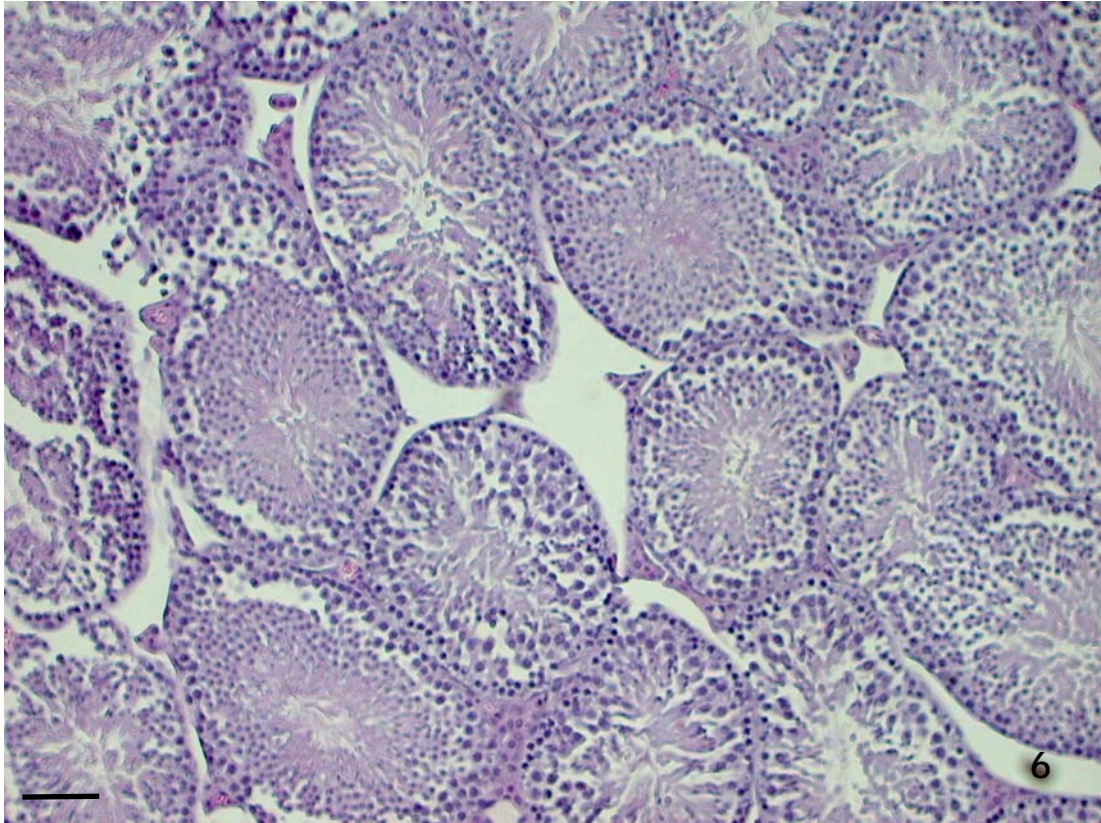
La zona central del conducto (d en figura 7), la que constituiría la zona más profunda de las dos, contiene fundamentalmente los flagelos que constituyen las colas de las espermatídes y los espermatozoides en diferenciación.

Entre los tabiques fibrosos que delimitan los conductos se observan vasos y células eosinófilas que constituyen las células de Leydig.

**Figuras 6 y 7. Micrografías mostrando el aspecto de los túbulos seminíferos de ratones wild type de 6 semanas de edad.**

Barra: 60  $\mu\text{m}$  en figura 6 y 15  $\mu\text{m}$  en figura 7.





El epitelio ductal es de claro aspecto columnar como puede observarse a mayores aumentos en las figuras 8 y 9.

La zona más basal presenta las espermatogonias (Eg), como células pequeñas y redondeadas de escaso citoplasma y un núcleo hipercromático grande y redondeado. Junto a ellas se aprecian células de Sertoli, con un núcleo claro y en ocasiones con nucleolo, son células irregulares cuyo aspecto en el ratón es el de estar tumbadas sobre la membrana basal con un núcleo ovalado que suele presentar nucleolo y cuyo eje longitudinal es perpendicular al eje columnar del epitelio (S).

Dirigiéndose hacia la luz ductal se superponen de forma desordenada, dependiendo de la columna celular, los espermatocitos de primer orden (E1), los espermatocitos de segundo orden (E2) y las espermátides (Ed), cuyas colas se dirigen hacia la luz.

Los espermatocitos de primer orden son células más poligonales que las espermatogonias y de mayor tamaño. Su núcleo centrado y redondeado también es más grande. Morfológicamente no hay una gran diferencia entre los espermatocitos de primer y segundo orden.

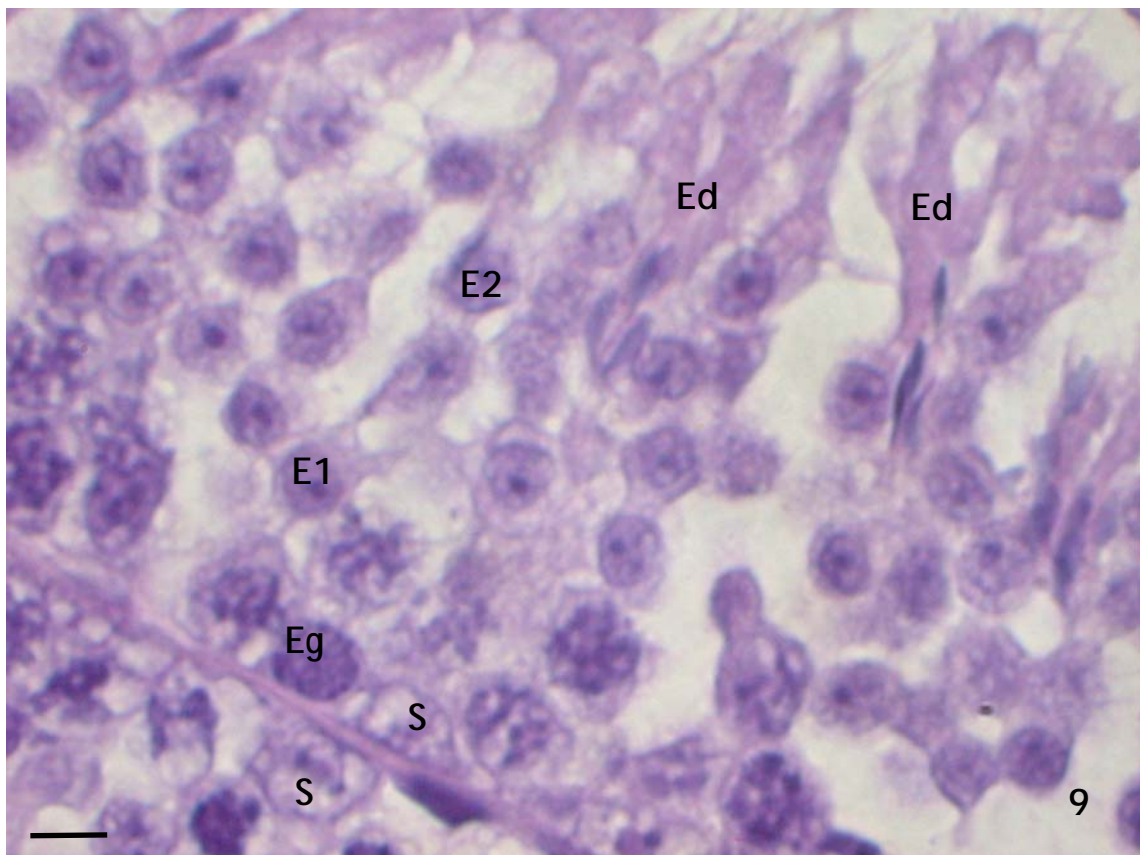
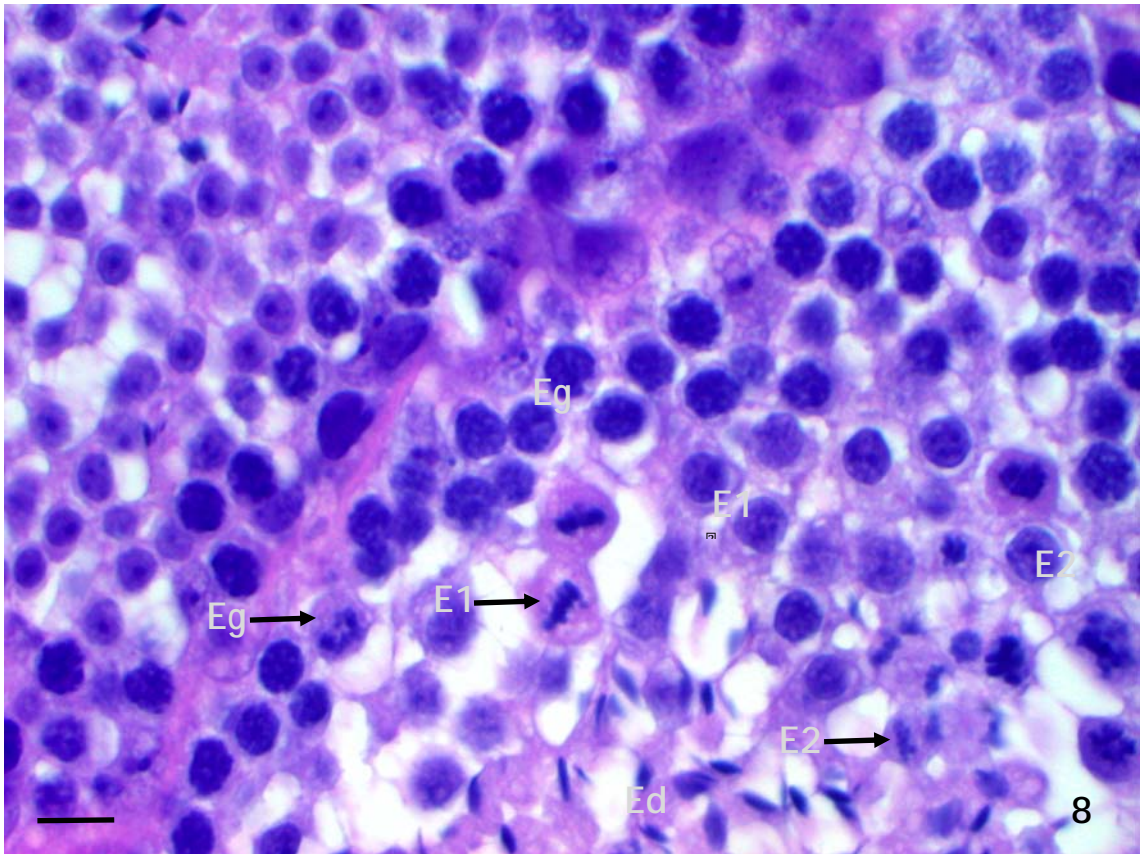
Las espermátides presentan un núcleo hipercromático pequeño y elongado cuyo eje longitudinal sigue la dirección del eje de la columna, en el proceso de maduración es frecuente observar espermátides con un flagelo más o menos largo, la futura cola del espermatozoide.

Las espermatogonias, los espermatocitos de primer y segundo orden, pueden presentar husos mitóticos (flechas en figura 8).

**Figuras 8 y 9. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratos wild type de 6 semanas de edad.**

Barra: 10 µm en figura 8 y 6 µm en figura 9.

Eg: Espermatogonia; S: Células de Sertoli; E1: espermatozito de primer orden; E2: espermatozito



Las dos estirpes celulares no germinales de mayor relevancia funcional a nivel orgánico por su participación en la esteroidogénesis, síntesis de hormonas gonadales, son las células de Sertoli y las células de Leydig.

Las figuras 10 y 11 muestran el aspecto más frecuente que presentan estos tipos de células en el ratón wild type de seis semanas.

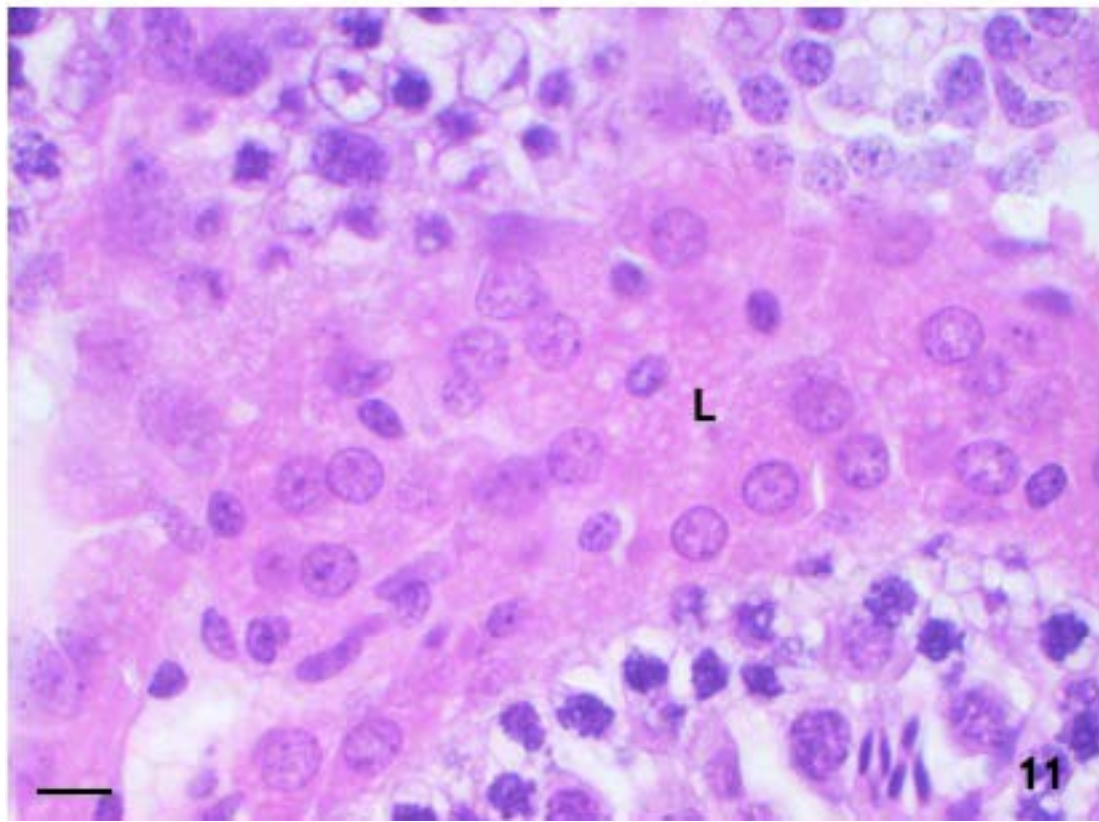
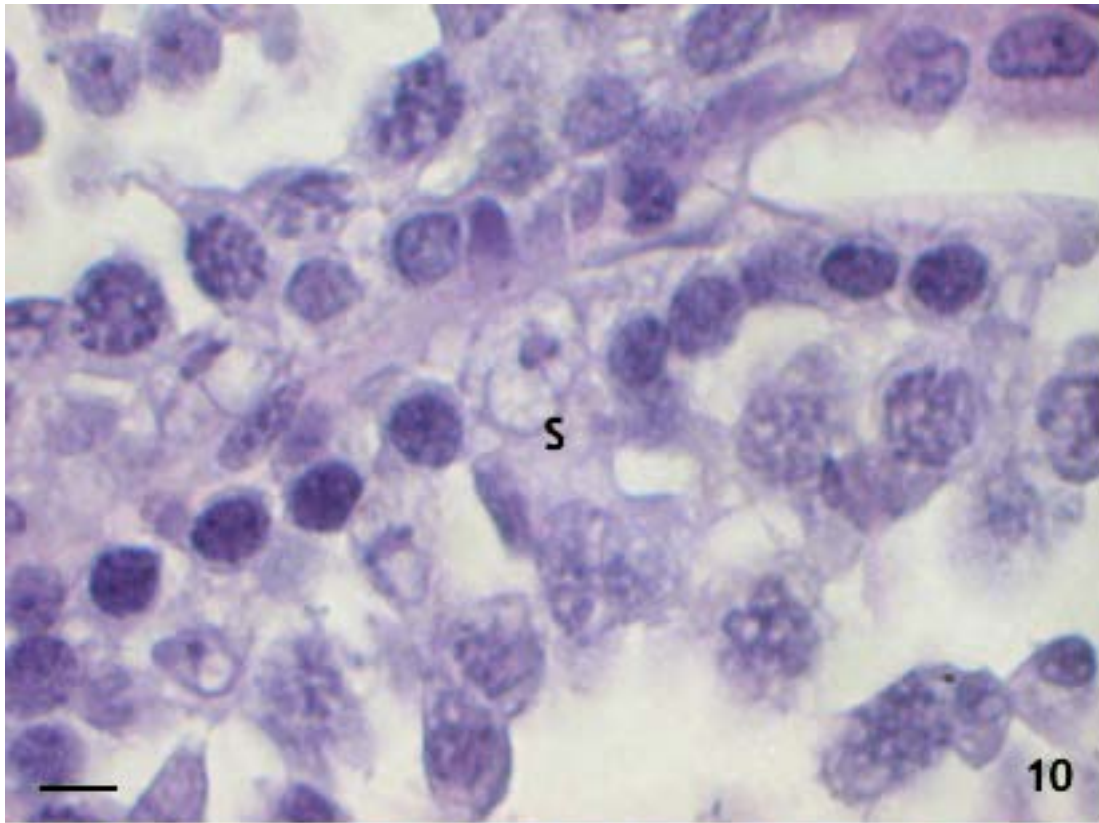
Las células de Sertoli (S en figura 10) son células irregulares y citoplasma claro. Su núcleo es ovalado y se sitúa basalmente con su eje mayor paralelo a la membrana basal, normalmente presenta un nucleolo evidente.

Las células de Leydig (L en figura 11) se sitúan fuera de los túbulos seminíferos, ocupando junto con vasos sanguíneos el espacio interductal, donde suelen formar islotes compactos.

Son células de citoplasma claramente eosinófilo que se caracteriza por presentar vesículas pequeñas, generalmente ovaladas en su citoplasma. Sus núcleos son redondeados con heterocromatina, pudiendo presentar un nucleolo.

**Figuras 10 y 11. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratones wild type de 6 semanas de edad.**

S: célula de Sertoli, L: islote de células de Leydig  
Reproducción de las figuras 10 y 11 de la tesis de grado.



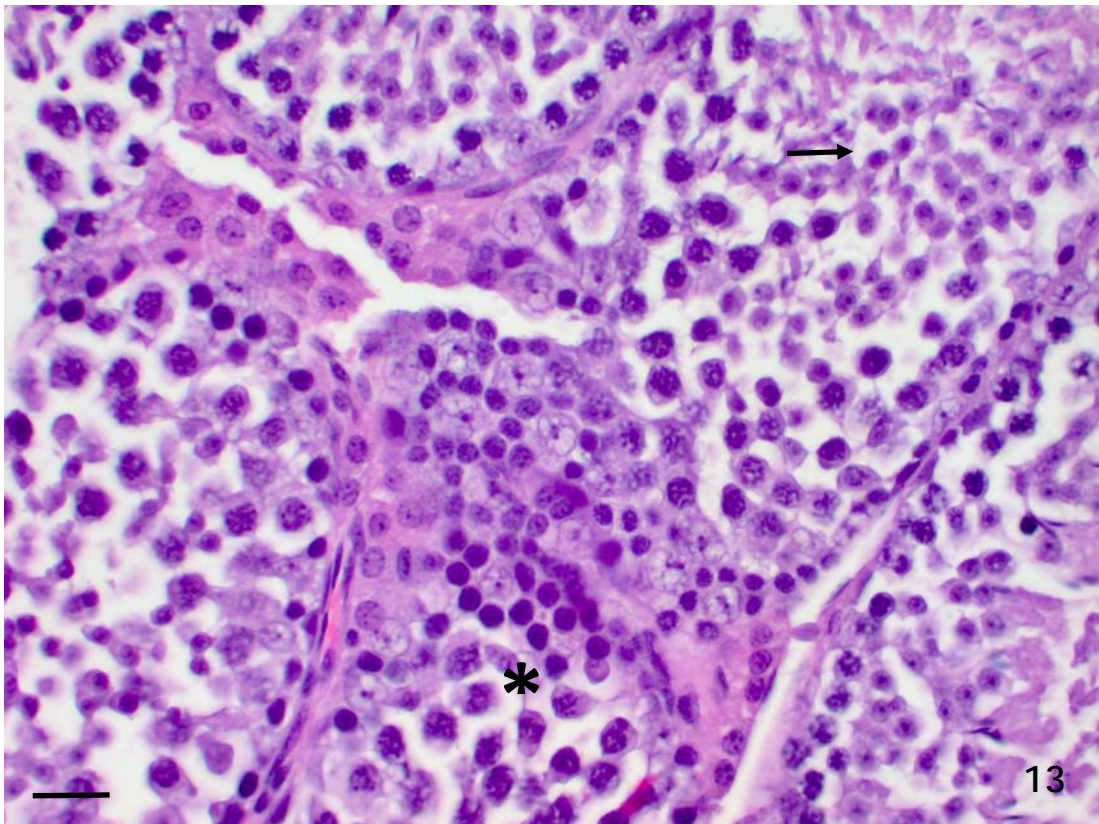
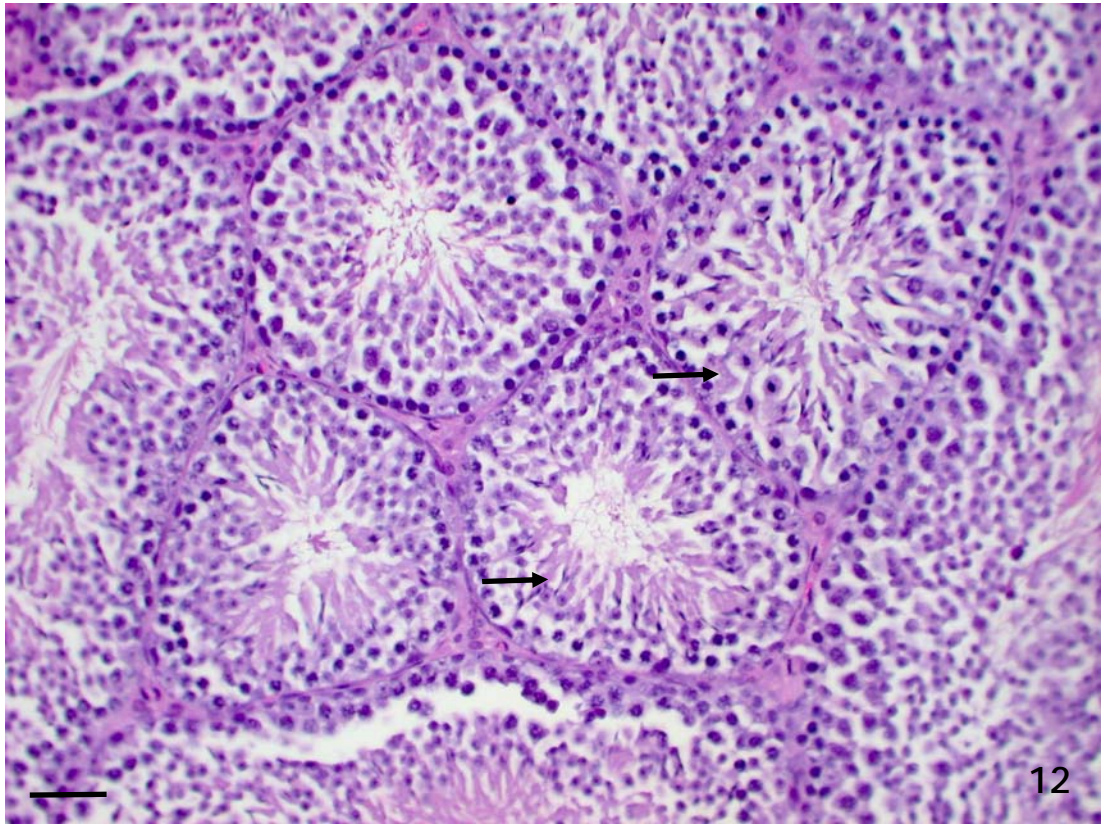
## **Animales knock out de 6 semanas de edad.**

Cuando se analizaron a bajos aumentos las secciones de los testículos de los ratones knock out de 6 semanas, lo más común fue no observar grandes diferencias con los de los animales wild type de su misma edad (figura 12), si bien la sensación es la de un epitelio ductal con menos células (flechas en figura 12).

Sin embargo, a mayores aumentos, se apreció que junto a folículos de apariencia más o menos normal (flecha en figura 13), como puede apreciarse en la figura, estos animales presentaban otros folículos más compactos en los que la estructura columnar del epitelio estaba desorganizada y la luz del túbulo no presentaba la agrupación de flagelos de las espermátides (\* en figura 13).

**Figuras 12 y 13. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratones knock out de 6 semanas de edad.**

Nota: 12. ver en figura 12 y 15. ver en figura 13.



Las figuras 14 y 15 muestran un claro ejemplo de los dos tipos de conductos seminíferos encontrados en los ratones knock out de seis semanas.

El conducto de la figura 14 presenta un epitelio columnar, con menos hileras celulares que los que se observaban en los animales wild type de la misma edad. Además la organización del conducto no es uniforme. Presentando zonas en las que no se observaron espermatogonias y sólo células de Sertoli (flecha fina en figura 14), mientras que en el lado opuesto del conducto las hileras de espermatogonias eran normales y estaban en proliferación (flecha gruesa en figura 14). Otro detalle es que los espermatocitos de primer y segundo orden se confunden y no son diferenciables en estratos. Por último, la parte adluminal del epitelio presentaba gran cantidad de espermátides (Ed en figura 14) pero pocos de ellos eran flagelados.

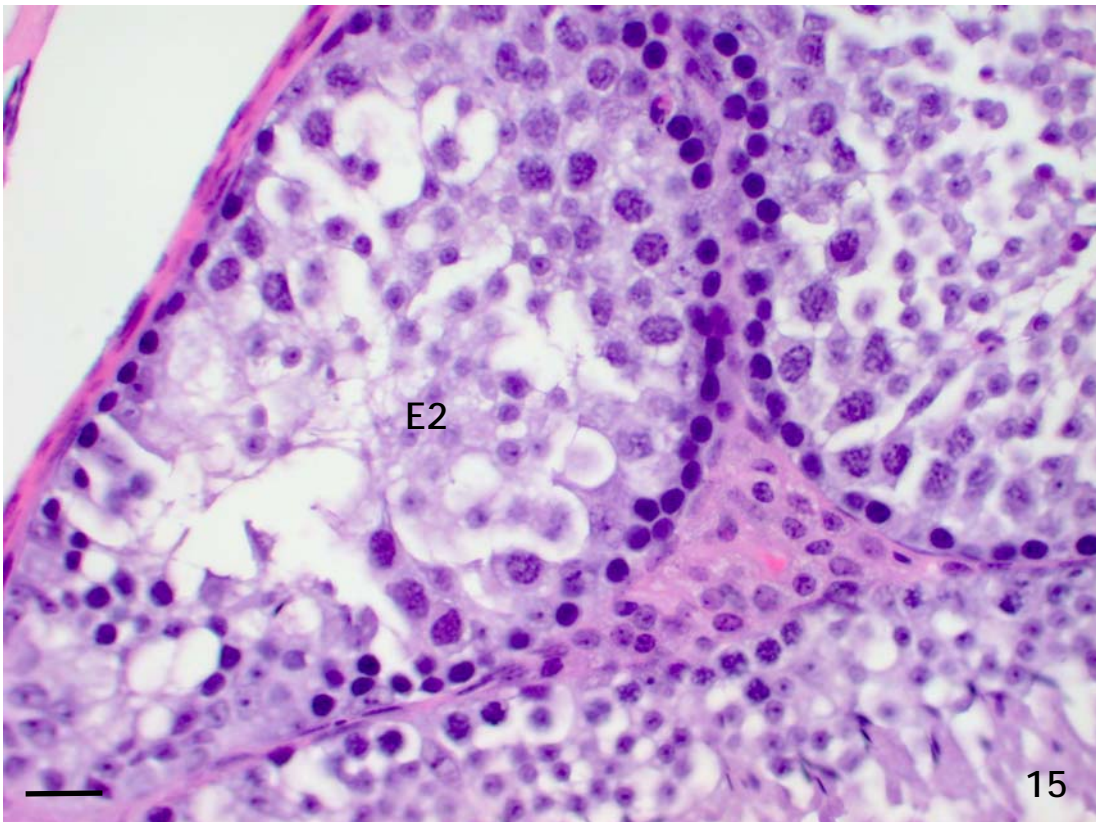
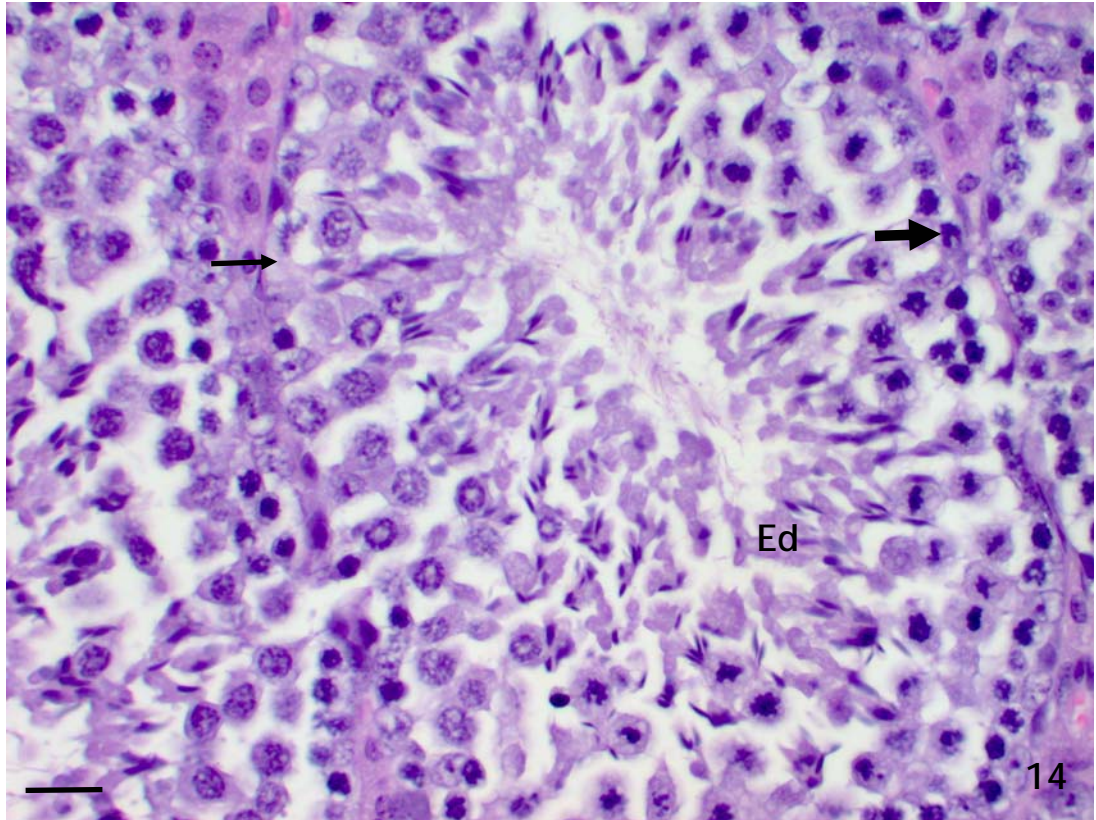
El conducto de la figura 15 muestra el aspecto típico de un conducto compacto. Estos conductos eran los menos numerosos de los dos tipos observados. Puede apreciarse que en estos conductos se mantenía de forma uniforme la hilera basal de espermatogonias y desde ella hacia la zona adluminal del epitelio se distinguían los espermatocitos de primer y segundo orden. Sin embargo, la zona central del conducto no presentaba luz, y la porción adluminal del epitelio la formaban espermatocitos de segundo orden (E2 en figura 15) en vez de espermátides.

**Figuras 14 y 15. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratones knock out de 6 semanas de edad.**

Ed: espermátides, E2: espermatocitos de segundo orden.

Revisado: 15/05/2014

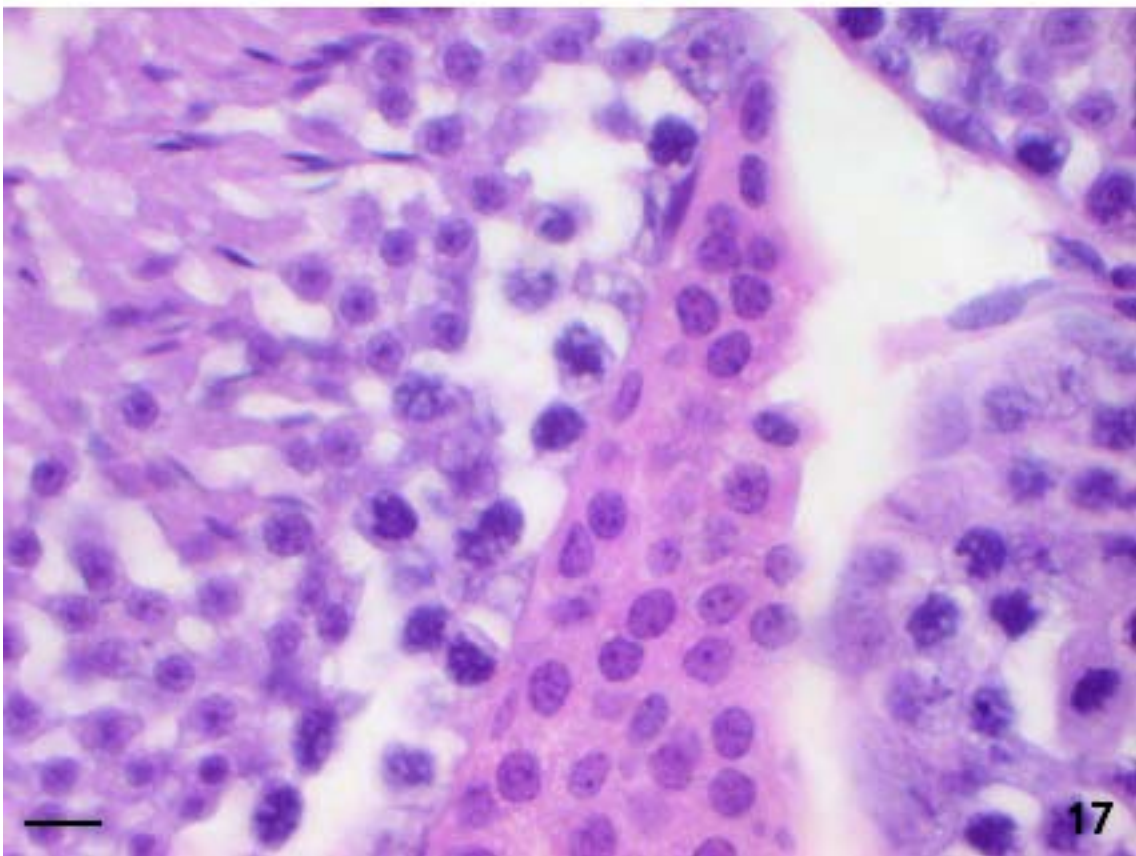
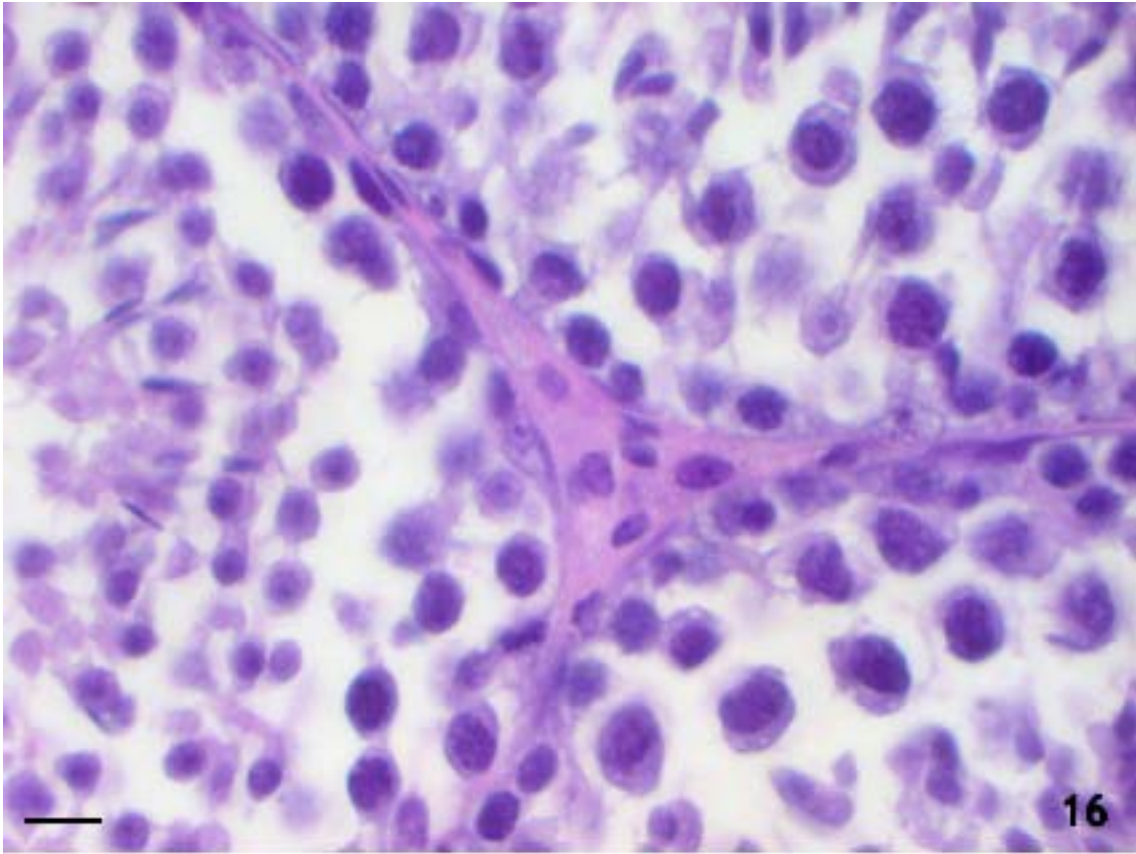




El detalle más característico que presentaron las células de Sertoli y las células de Leydig en estos animales fue una aplanamiento de sus formas y, aparentemente, presentar un citoplasma más pequeño (figuras 16 y 17).

**Figuras 16 y 17. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratones kock out de 6 semanas de edad.**

Barras: 6  $\mu$ m



## **Animales wild type de 12 semanas de edad.**

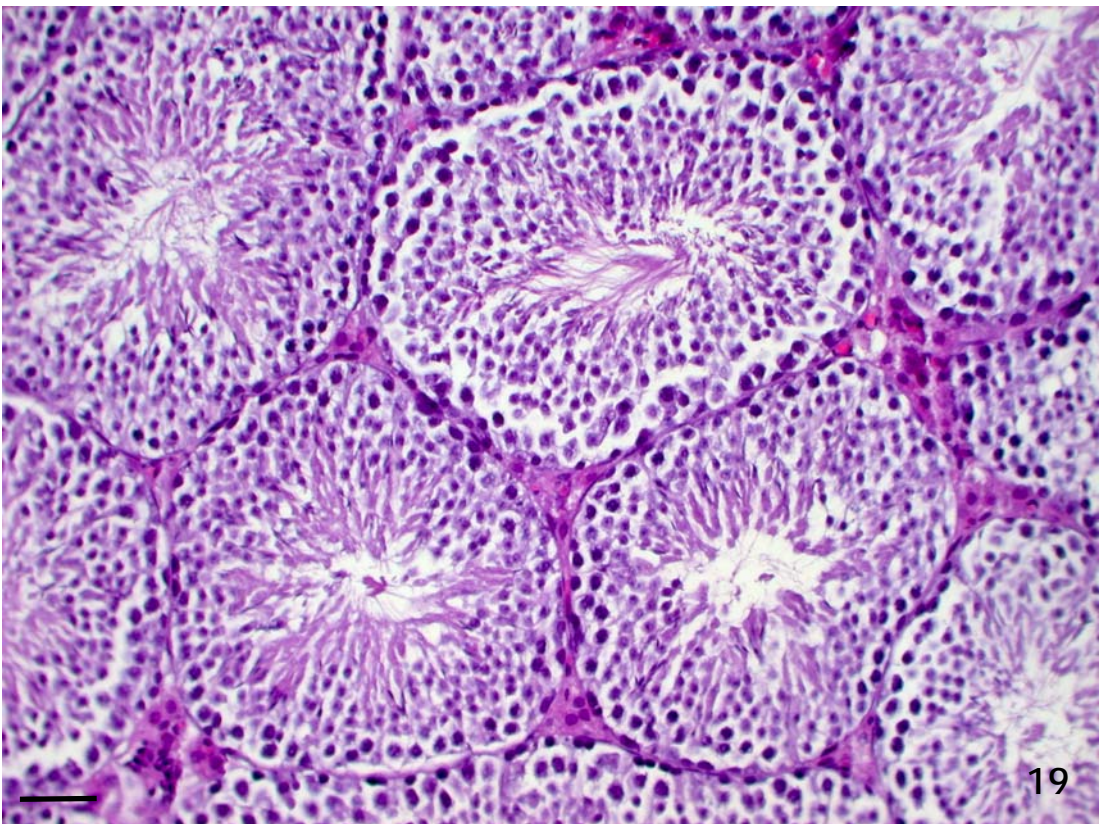
Los túbulos seminíferos de los ratones wild type de 12 semanas de edad se caracterizaron por presentar signos de normalidad en su organización y estructura, más madura que la observada en los animales de 6 semanas.

En la figura 18 pueden apreciarse en panorámica estos túbulos cortados de través o tangencialmente, con los espacios interductales ocupados por vasos sanguíneos y las células de Leydig.

A mayores aumentos, en la figura 19 se aprecia la organización columnar y ordenada del epitelio y la luz ductal llena de flagelos de espermátides

**Figuras 18 y 19. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratones wild type de 12 semanas de edad.**

Barra: 60  $\mu\text{m}$  en figura 18 y 30  $\mu\text{m}$  en figura 19



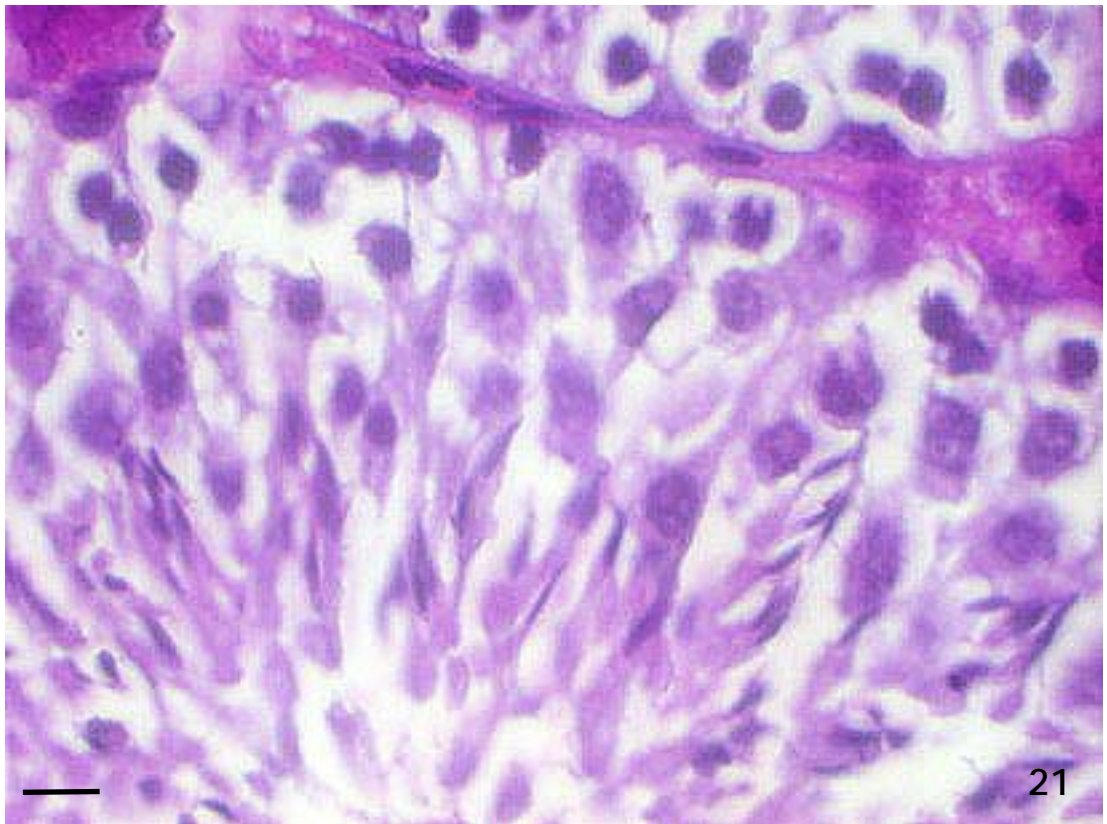
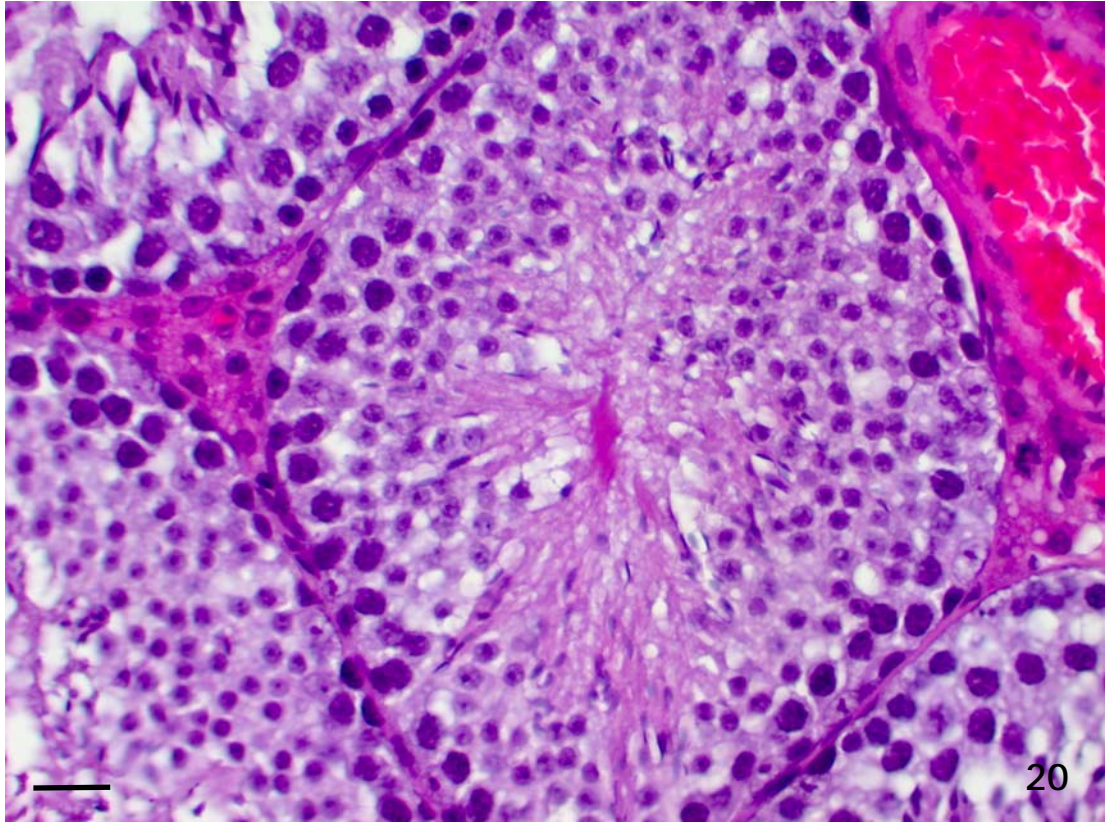
Los túbulos seminíferos de los ratones wild type de 12 semanas llegaron a presentar hasta 11 hileras celulares, dispuestas en columnas en las que eran fácilmente observables todos los tipos celulares germinales (figura 20).

La figura 21 muestra a grandes aumentos los diferentes elementos de la estirpe celular germinal.

En esta imagen también puede apreciarse la separación bien delimitada entre dos túbulos adyacentes.

**Figuras 20 y 21. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratones wild type de 12 semanas de edad.**

Barra: 15  $\mu\text{m}$  en figura 20 y 10  $\mu\text{m}$  en figura 21.



La figura 22 permite ver el aspecto y disposición más frecuente de las células de Sertoli (S) que se observaron en los ratones wild type de 12 semanas de edad.

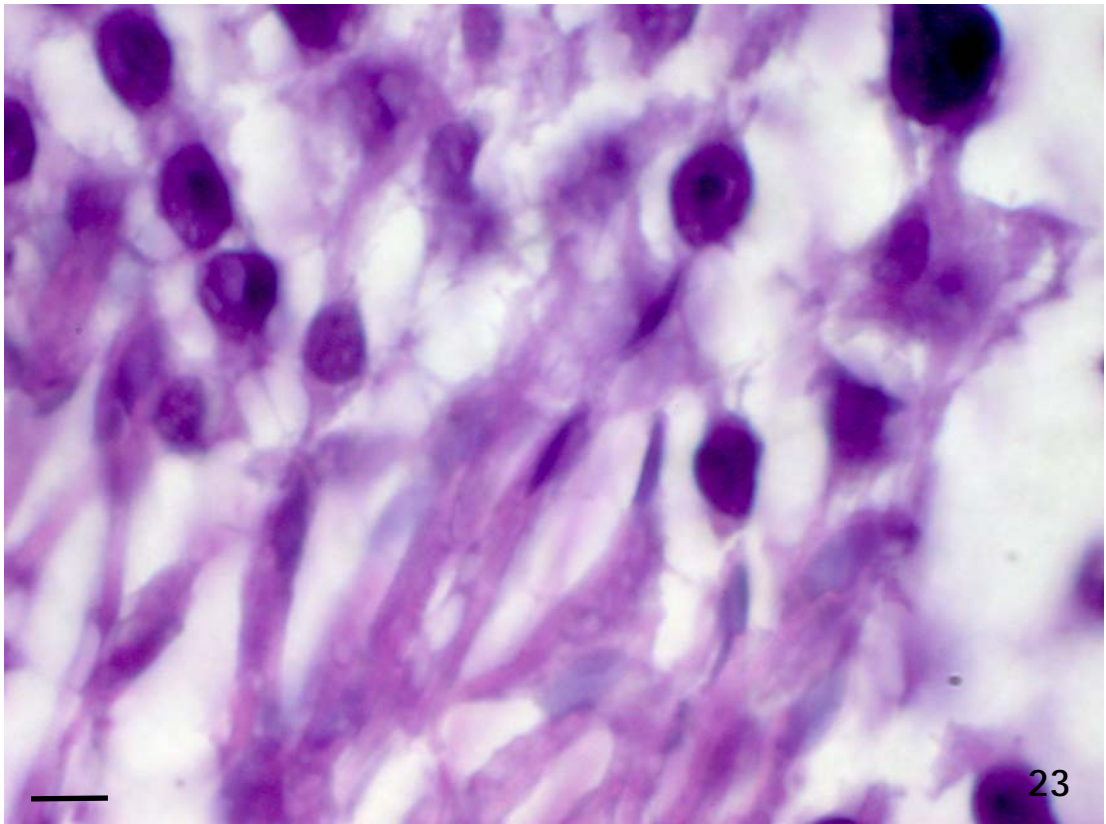
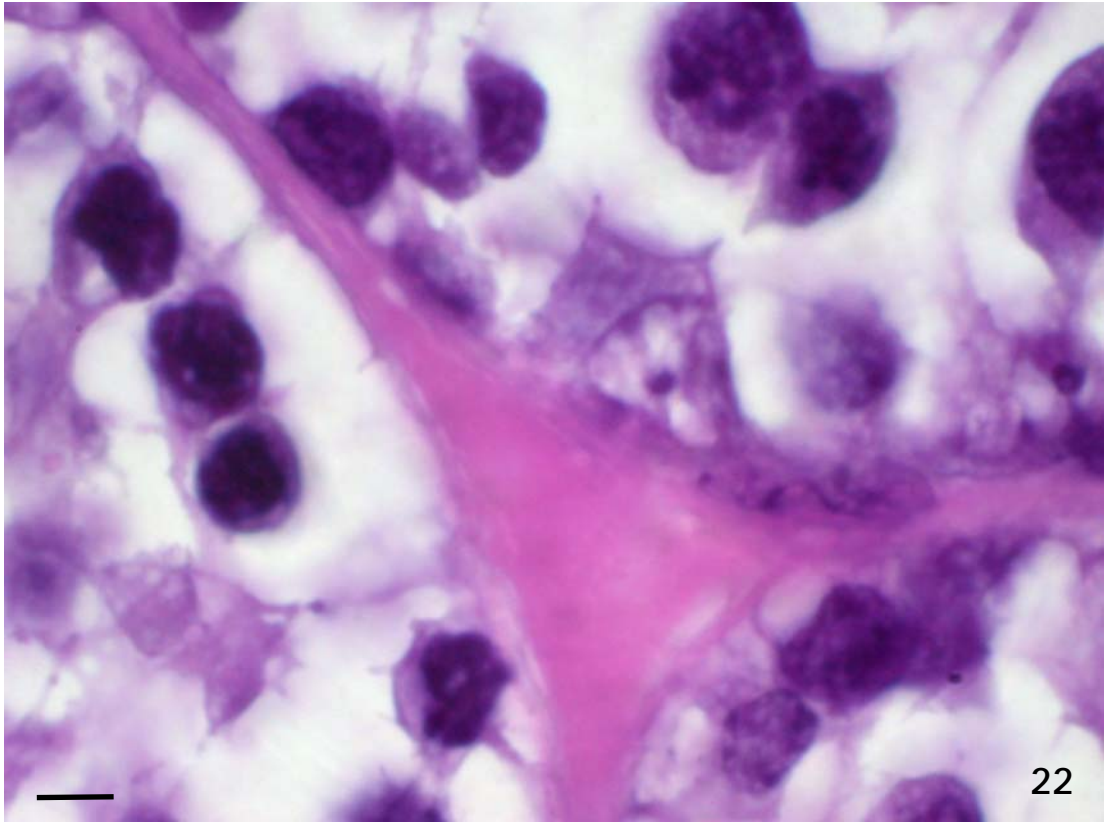
Estas células se caracterizaron por tener formas irregulares, sus núcleos en muchas ocasiones fueron triangulares y a veces ovalados, con un nucleolo bien visible. El citoplasma aparecía claro y aplanado, con prolongaciones finas entre las espermatogonias.

La figura 23 es un ejemplo claro de la organización típica de las espermátides en la porción adluminal del epitelio tubular del testículo del ratón, con sus núcleos alargados e hipercondensados dispuestos a modo de empalizada desorganizada, entremezclada con espermatoцитos de segundo orden.

**Figuras 22 y 23. Micrografías a grandes aumentos mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratones wild type de 12 semanas de edad.**

Barras: 6µm





Los espacios interductales estaban ocupados por células de Leydig (L en figuras 24 y 25).

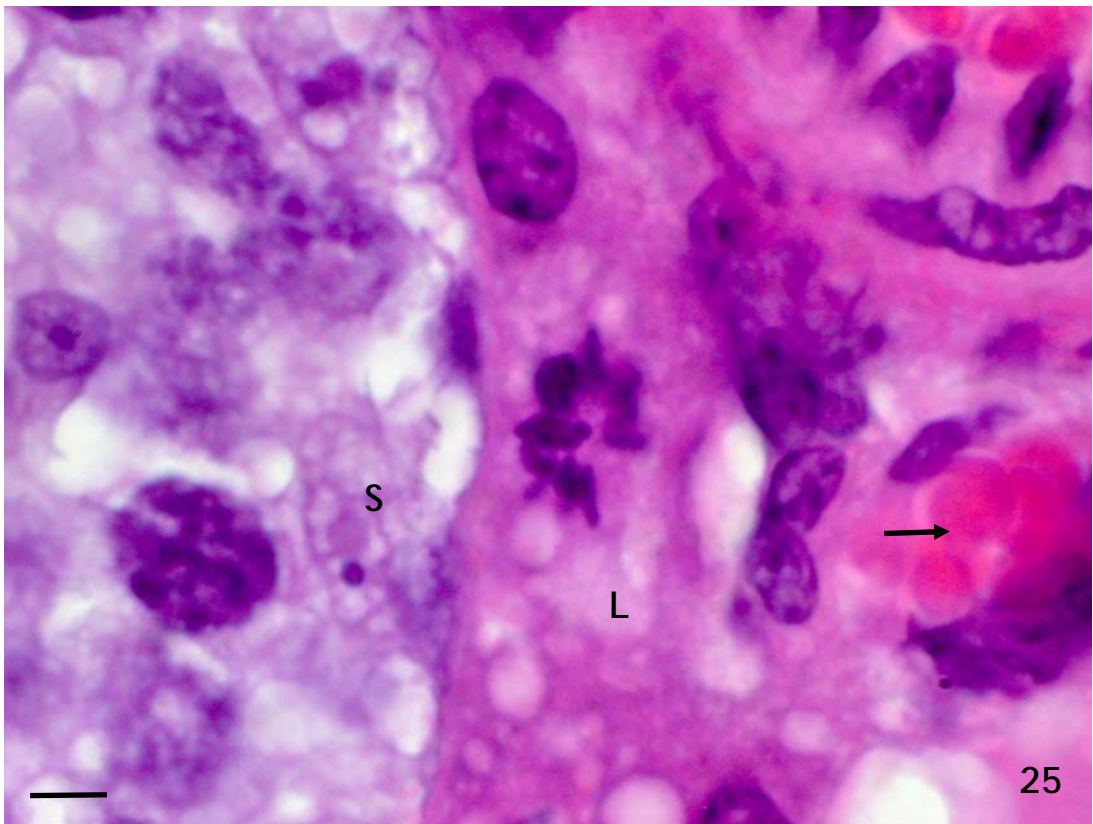
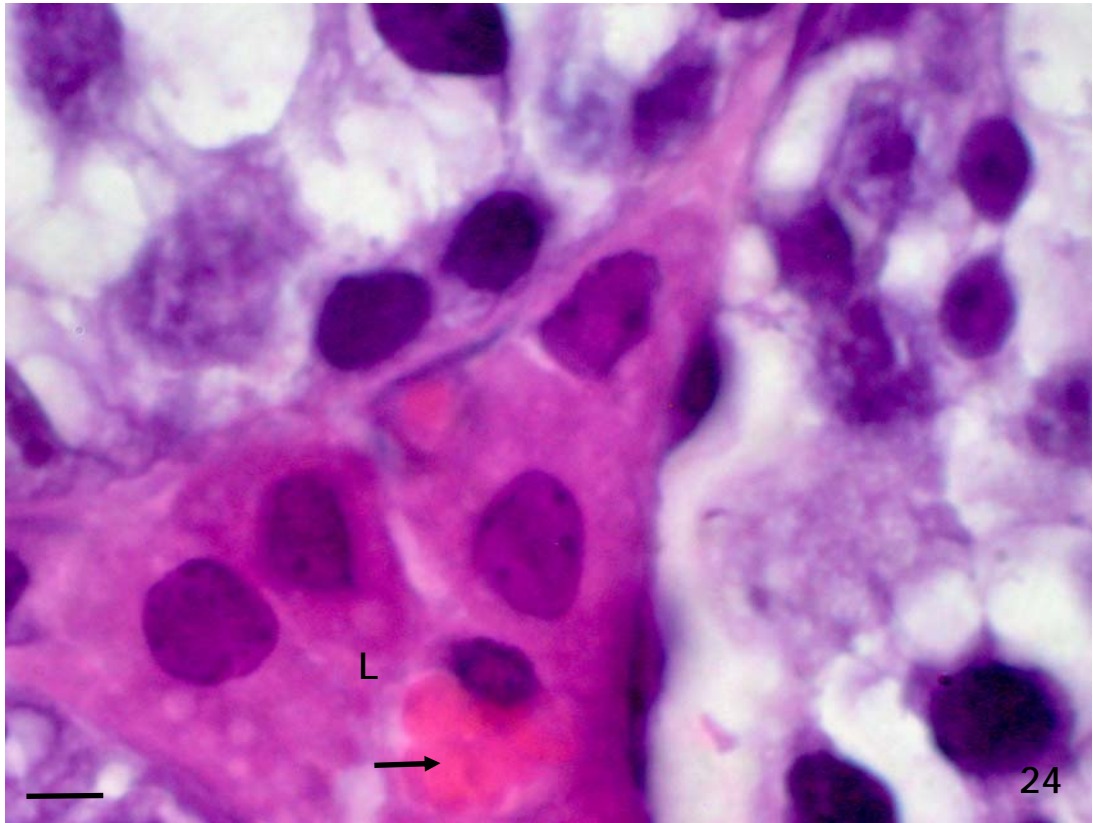
En estos animales eran células poliédricas, muchas veces rectangulares con un núcleo central, un citoplasma eosinófilo y con vesículas lipídicas en su interior.

Estas células se situaron próximas a los vasos sanguíneos (flechas en figuras 24 y 25).

Quizás sólo sea un hallazgo casual, pero en este grupo de animales fue el único en el que observamos la presencia de células de Leydig en clara división celular, como se muestra en la figura 25.

**Figuras 24 y 25. Micrografías a grandes aumentos mostrando el aspecto de los espacios interductales de ratones wild type de 12 semanas de edad.**

L: células de Leydig. Flechas: vasos sanguíneos



## **Animales knock out de 12 semanas de edad.**

En los ratones knock out de 12 semanas de edad se observaron dos tipos de túbulos seminíferos.

La figura 26 muestra el primero de ellos, estos túbulos recordaban mucho a los que se hallaron en los knock out de 6 semanas, si bien algunos túbulos presentaban signos de desorganización de su epitelio en un grado mucho mayor al del otro grupo de animales knock out.

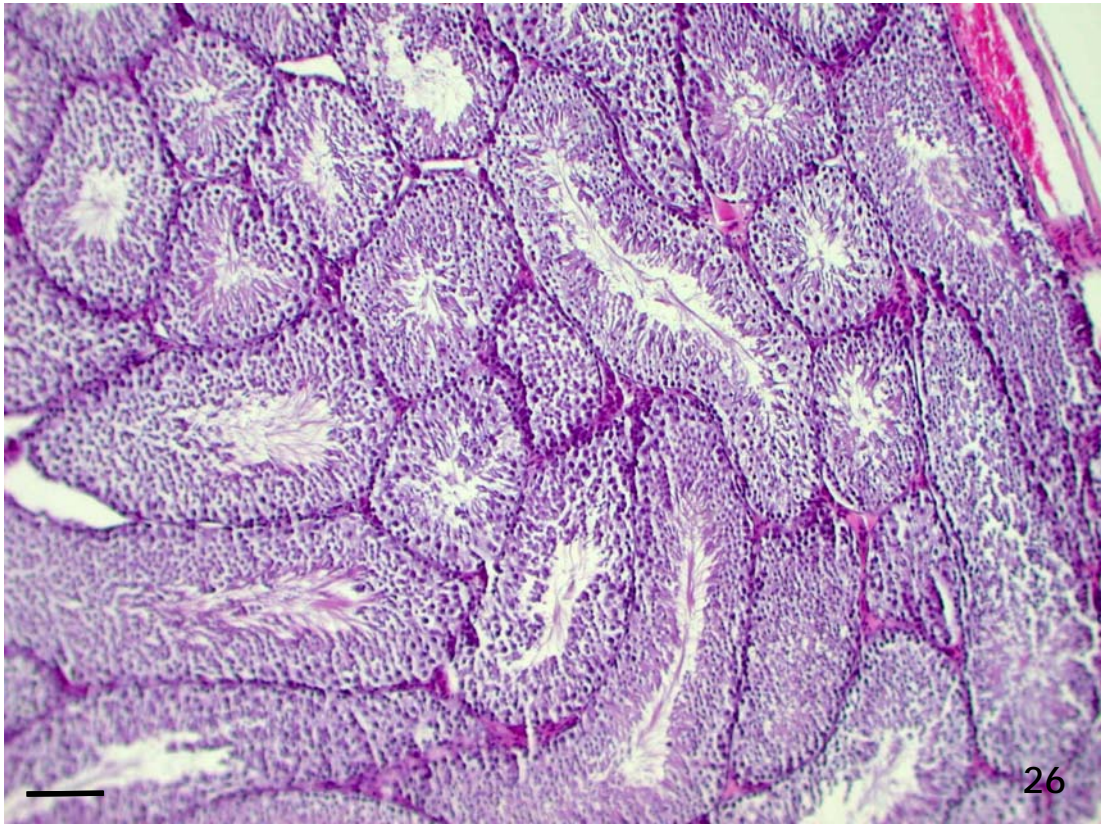
Con mayor frecuencia, los túbulos seminíferos de los knock out de 12 semanas aparecieron como se muestra en la figura 27, combinando dos tipos diferentes de túbulos.

Los primeros presentaron una gran luz con la casi total desaparición del epitelio tubular en el que prácticamente sólo se observaron espermatogonias muchas de ellas separadas de la pared del túbulo y caídas hacia la luz del mismo (asterisco en figura 27).

Los segundos (flecha en figura 27) estaban ocupados en su totalidad por células, de manera que no existía luz tubular. Como describiremos más adelante las células que ocupaban los túbulos y hacían de ellos estructuras compactas no tubulares fueron formas aberrantes con muchas variables.

**Figuras 26 y 27. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratones knock out de 12 semanas de edad.**

Barras: 60  $\mu$ m

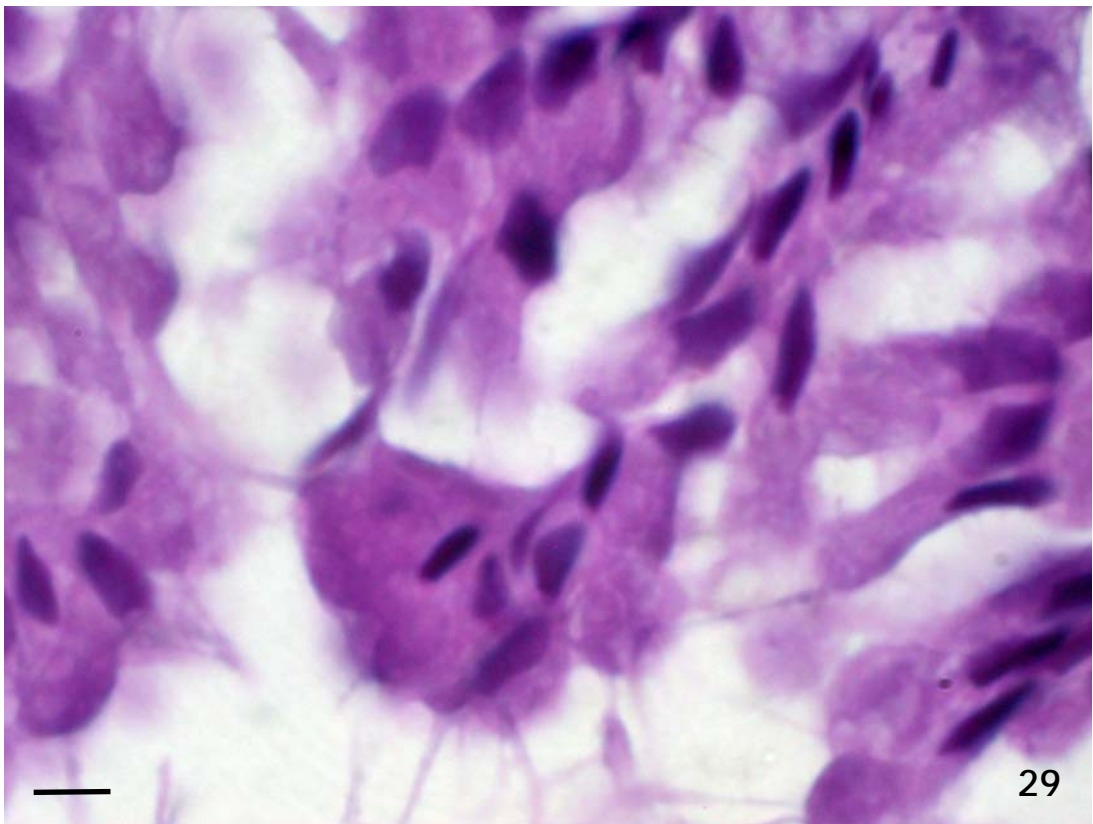
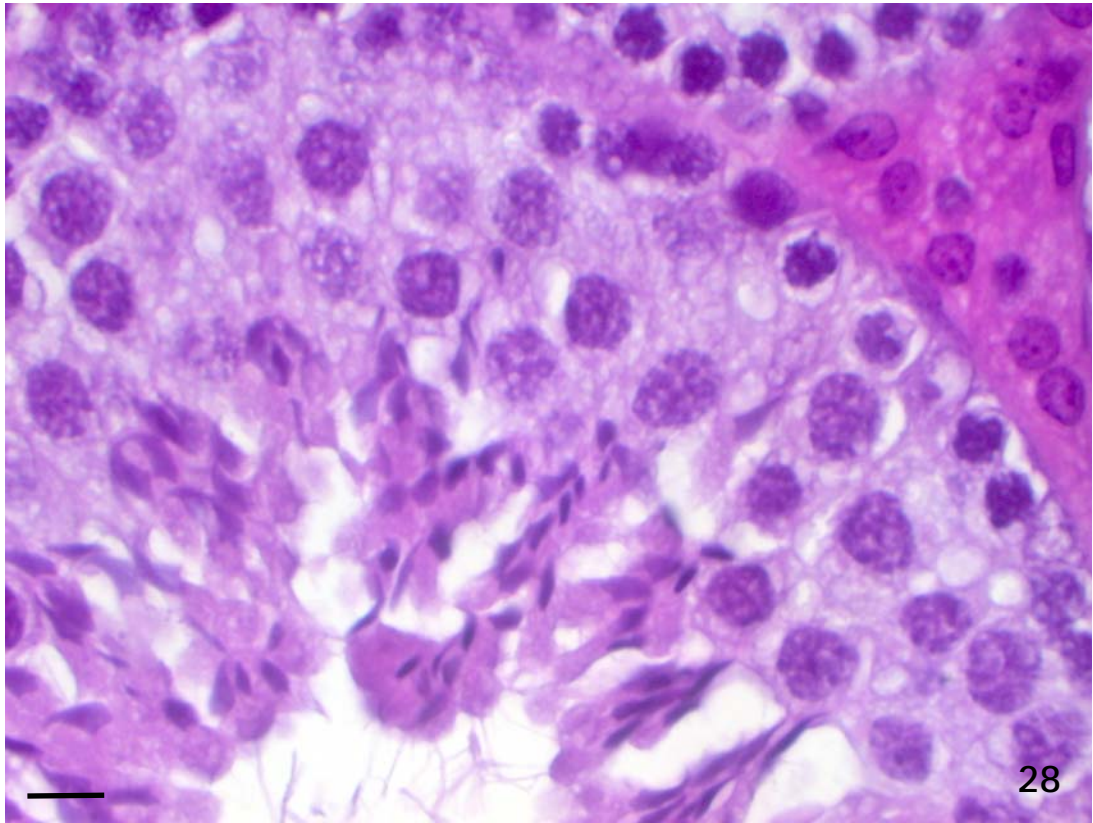


Los túbulos cuyo epeitelio mostraba un aspecto columnar mostraron un epitelio con pocas células de manera que se apreciaban de cuatro a cinco hileras concéntricas y en el polo adluminal una oseta de espermatídes la mayoría sin flagelos desarrollados (figura 28).

A grandes aumentos (figura 29) se puede apreciar como las espermatídes formaban columnas palmeadas en su extremo luminal y que el aspecto de empalizada desordenada mezclada con espermatocitos de segundo orden típica del testículo del ratón y que mostraban los animales wild type de su misma edad ha desaparecido en los ratones knock out.

**Figuras 28 y 29. Micrografías a grandes aumentos mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratones knock out de 12 semanas de edad.**

Barras: 10  $\mu$ m



Los túbulos compactos presentaron una enorme diversidad de formas celulares y de estructuración del epitelio.

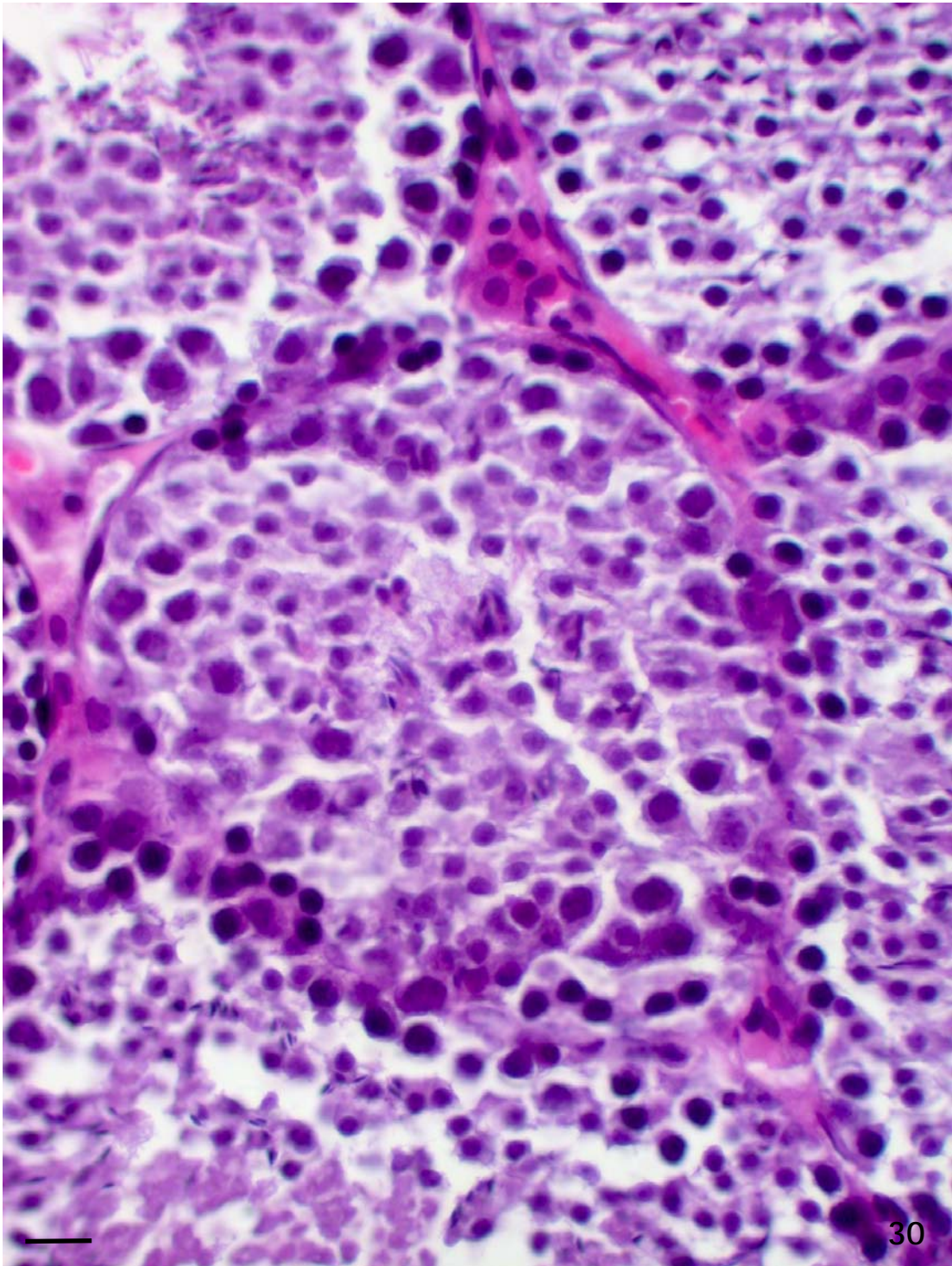
En los casos menos manifiestos, como el que se observa en la figura 30 lo que aconteció fue una desorganización total de las columnas e hileras que definen el epitelio ductal. Los túbulos presentaban espermatogonias, espermatocitos de primer y segundo orden y alguna espermátide aislada; siendo difícil observar a las células de Sertoli.

Junto a ellos, otros conductos mostraban una imagen que recordaba al derrumbe del epitelio hacia la luz tubular, perdiéndose toda la organización columnar, aunque en cierta forma persistían las hileras concéntricas de células. Estos túbulos solían presentar más espermátides que los puramente compactos.

**Figuras** **30.** **Micro-**  
grafías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratones knock out de 12 semanas de edad.

Barra: 8  $\mu$ m





Otro tipo de túbulo compacto observado se muestra en las figuras 31 y 32 a pequeños y grandes aumentos.

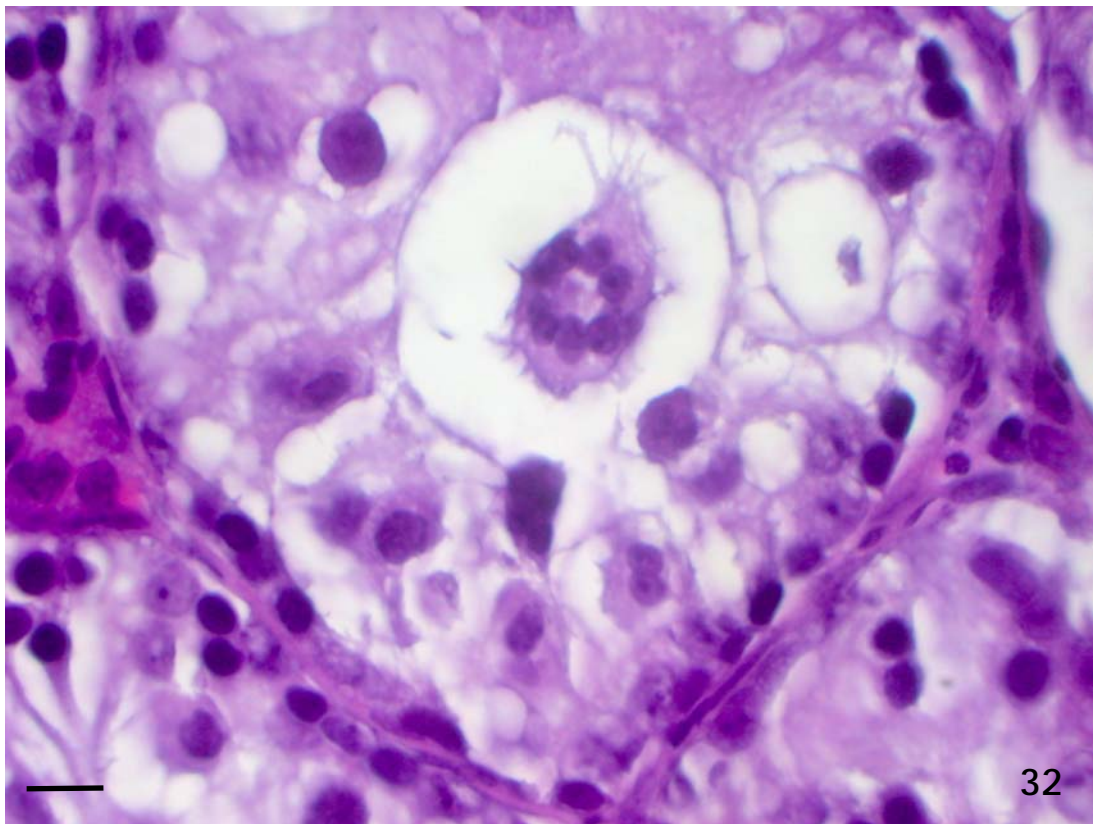
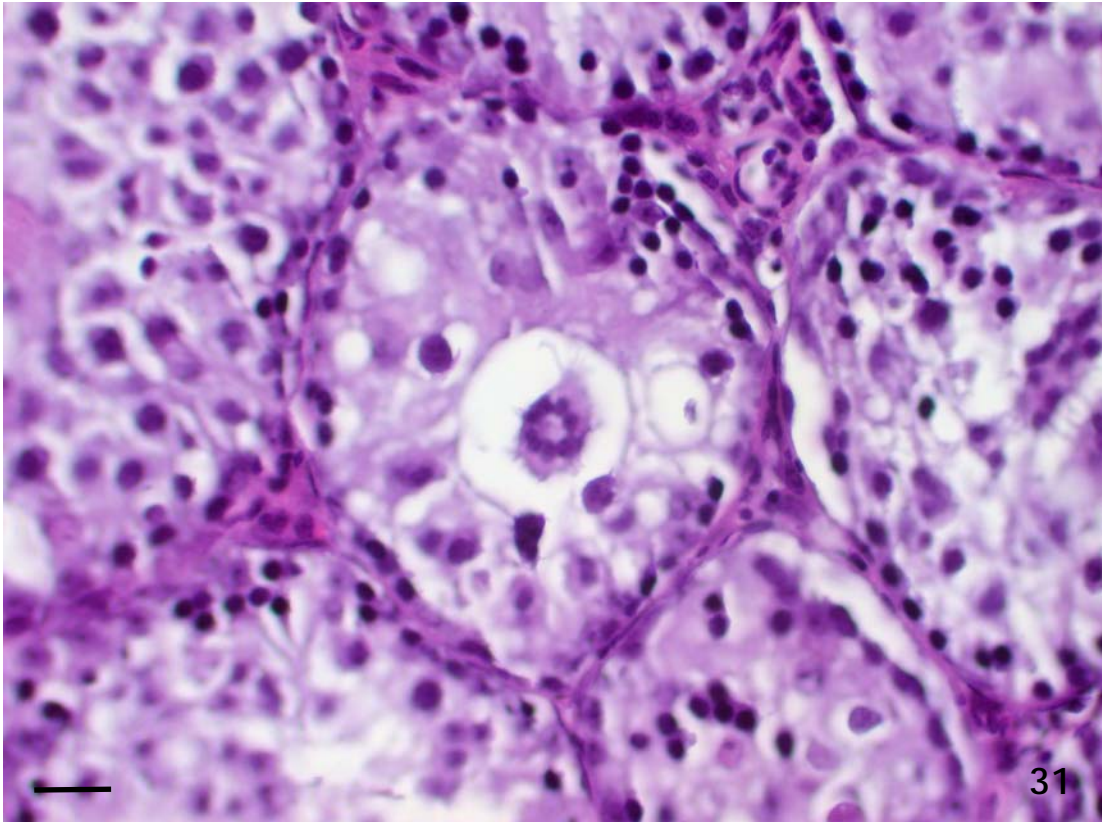
Era túbulo con muy pocas células. Se apreciaba claramente la existencia de espermatogonias con núcleos pequeños e hipercromáticos, pero no formaban una hilera basal sino que se desperdigaban por el interior del túbulo.

Hacia el centro del túbulo se apreció algún espermatocito, aparentemente de primer orden, pero su morfología era irregular con núcleos grandes y escaso citoplasma, generalmente no se observaron imágenes de división celular.

La luz del tubo aparecía ocupada por una imagen sincitial irregular con hasta 7 núcleos pequeños y redondeados. De los bordes de estas estructuras partían prolongaciones finas

**Figuras 31 y 32. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratones knock out de 12 semanas de edad.**

Barras: 30  $\mu\text{m}$  en figura 31 y 10  $\mu\text{m}$  en figura 32



Otra variedad de túbulo seminífero encontrado en los knock out de 12 semanas se muestra en las figuras 33 y 34.

También eran túbulos compactos pero con una total desorganización de su epitelio. A pequeños aumentos parecen túbulos formados sólo por espermatogonias grandes con un citoplasma claro y distribuidas sin orden por todo el interior del túbulo.

Al observar detenidamente a mayores aumentos puede apreciarse que. Como muestra la figura 34, en el interior del túbulo seminífero hay muchos tipos celulares.

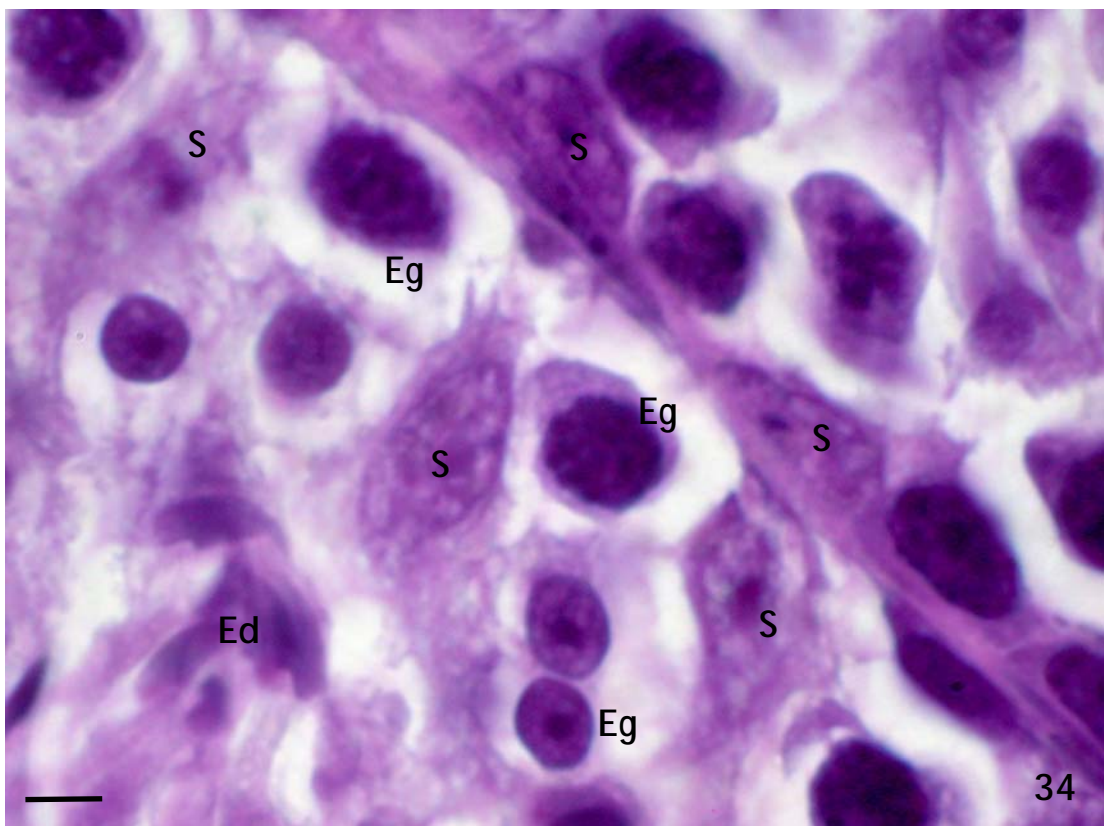
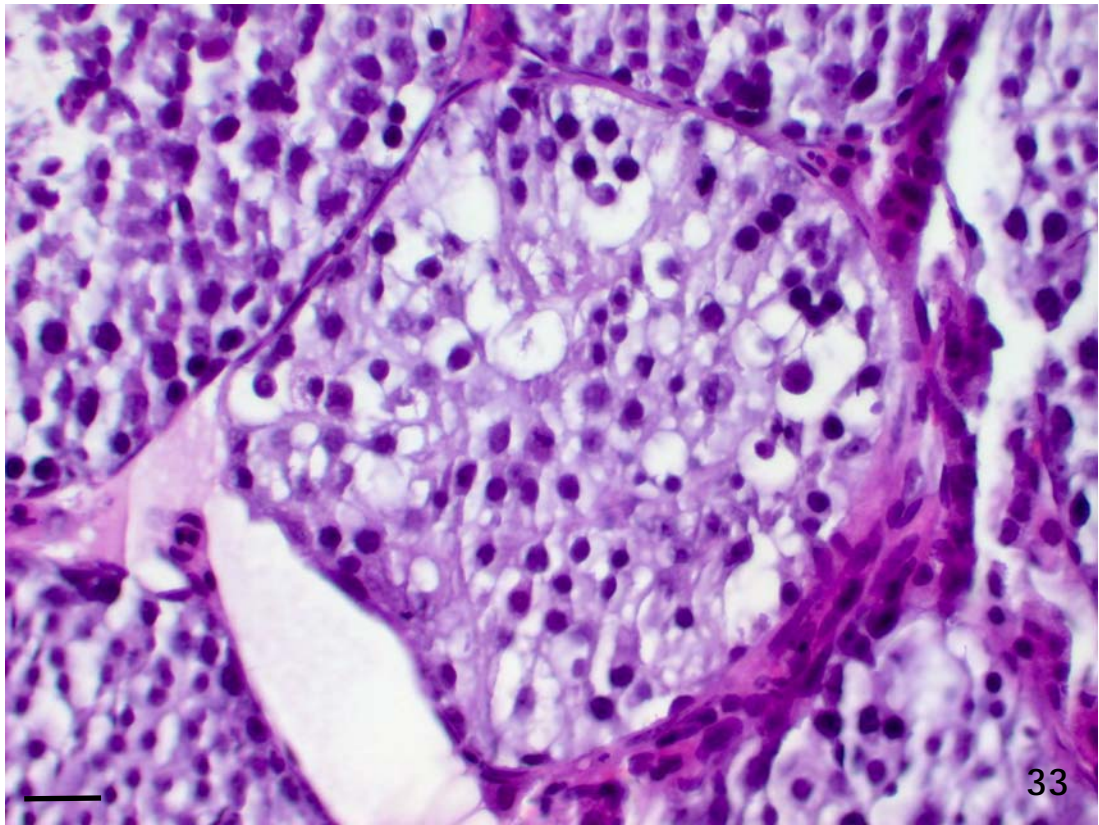
Hay células de Sertoli (S en figura 34) que en ocasiones persisten en su disposición y forma y otras veces en el túbulo adyacente estas células no están dispuestas basalmente sino que se entremezclan con las espermatogonias separándose de la membrana basal.

Las espermatogonias (EG en figura 34) son de dos tipos, unas tienen un aspecto semejante al de las observadas en los ratones wild type, no muy grandes de núcleo redondeado e hipercromático que puede presentar nucleolo y otras son células grandes con un citoplasma claro excepto en su porción yuxtanclear y con un núcleo más grande.

De forma llamativa, en esos túbulos puede apreciarse la presencia de espermátides, sin flagelo pero situadas entremezcladas con espermatogonias (Ed en figura 34).

**Figuras 33 y 34. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratos wild type de 6 semanas de edad.**

Barras: 15 µm en figura 33 y 6 µm figura 34

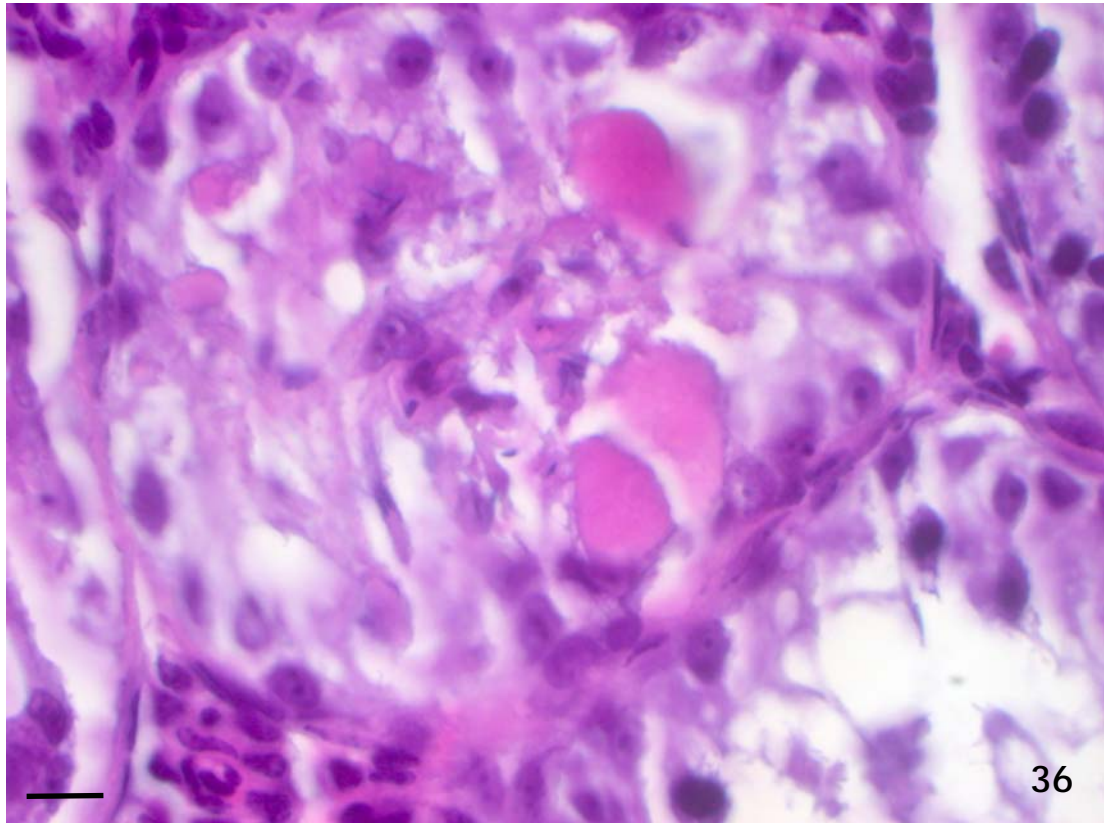
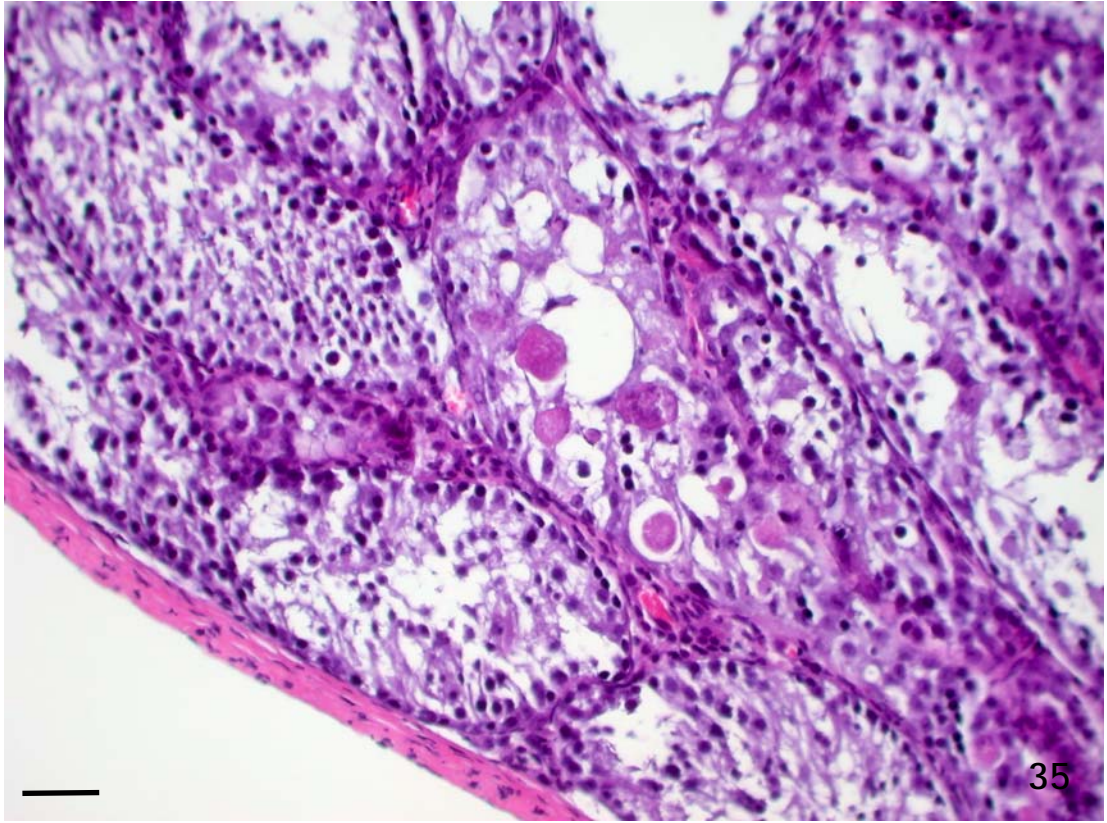


Otro tipo de túbulo seminífero aberrante observado en los ratones knock out de 12 semanas se caracterizó por presentar células probablemente germinales pero completamente desorganizadas y con una morfología totalmente variante.

Sin embargo, el hallazgo más llamativo encontrado en estos túbulos lo formaban estructuras redondeadas u ovaladas, fuertemente eosinófilas, casi siempre anucleadas y que en muchas ocasiones se rodeaban de un espacio claro no delimitado por membranas (flechas en figuras 35 y 36).

**Figuras 35 y 36. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratones knock out de 12 semanas de edad.**

Barras: 30  $\mu$ m en figura 35 y 10  $\mu$ m en figura 36



Algunos túbulos compactos estaban ocupados por un material basófilo en el que se disponían núcleos que recuerdan a los de las espermatogonias y espermatocitos de primer orden y a los de las células de Sertoli, pero sin que puedan delimitarse contornos celulares (figura 37).

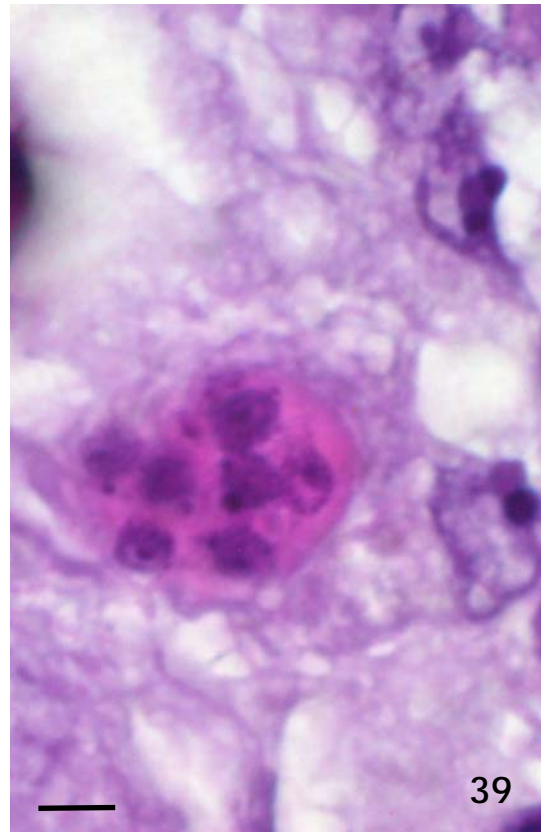
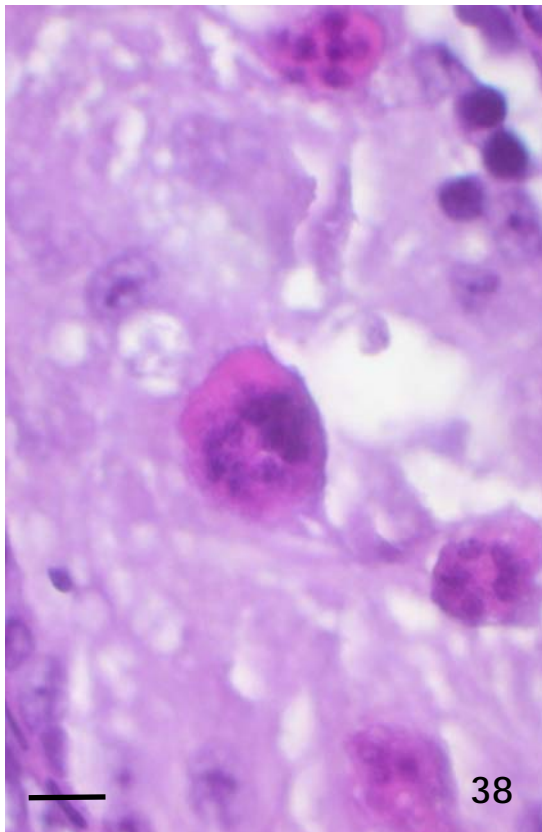
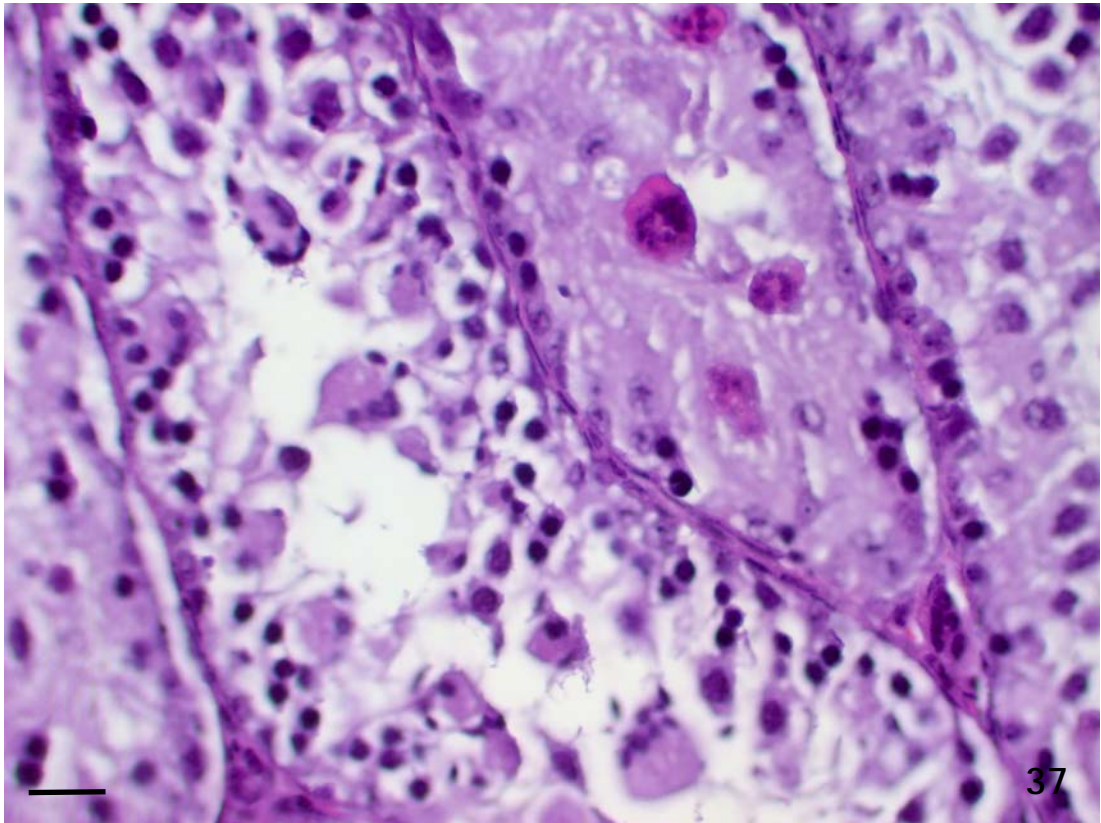
El material basófilo que rellena el tubo a modo de matriz intratubular, a grandes aumentos tiene aspecto de malla o retículo.

Delimitadas por el material basófilo, se observaron células de aspecto sincitial que se caracterizaban por ser de gran tamaño, en torno a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, y poseer en su interior entre 6 y 12 núcleos redondeados y, junto a ellos, pequeñas estructuras hipercromáticas que recuerdan a los cuerpos apoptóticos (figuras 38 y 39).

**Figuras 37 a 39. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratos wild type de 6 semanas de edad.**

Barras: 30  $\mu\text{m}$  en figura 37 y 10  $\mu\text{m}$  en figuras 38 y 39





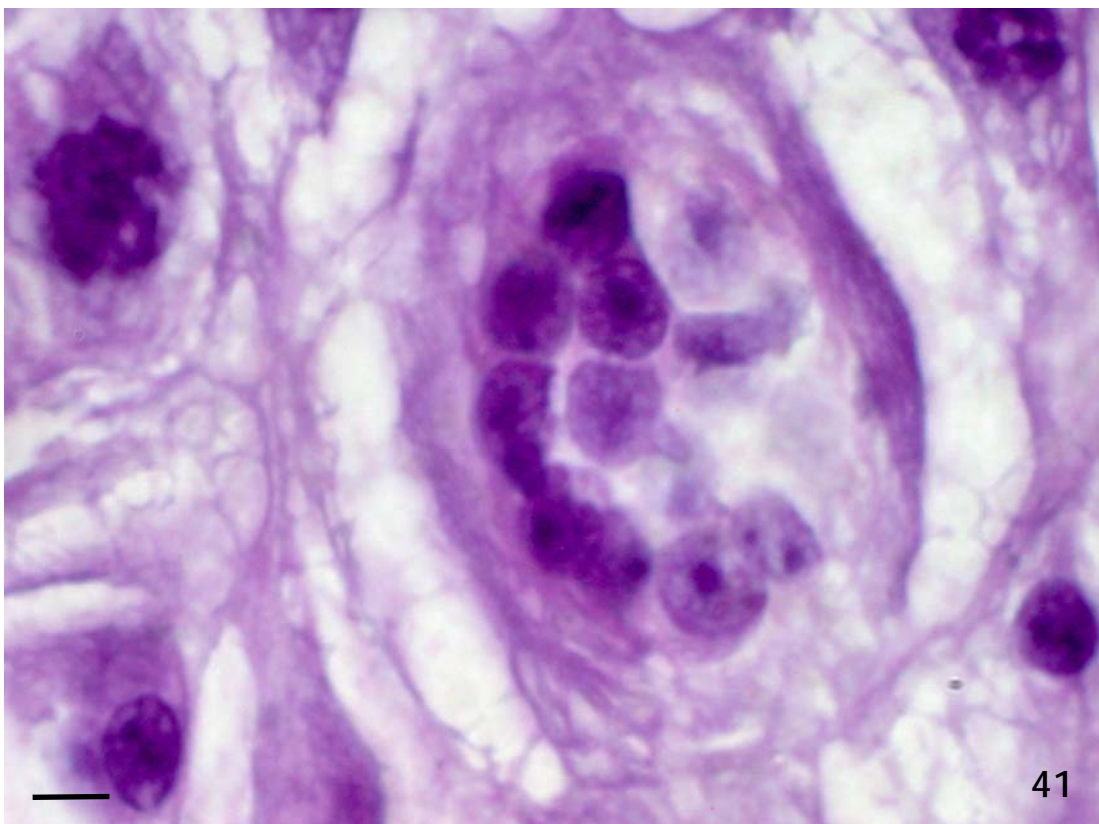
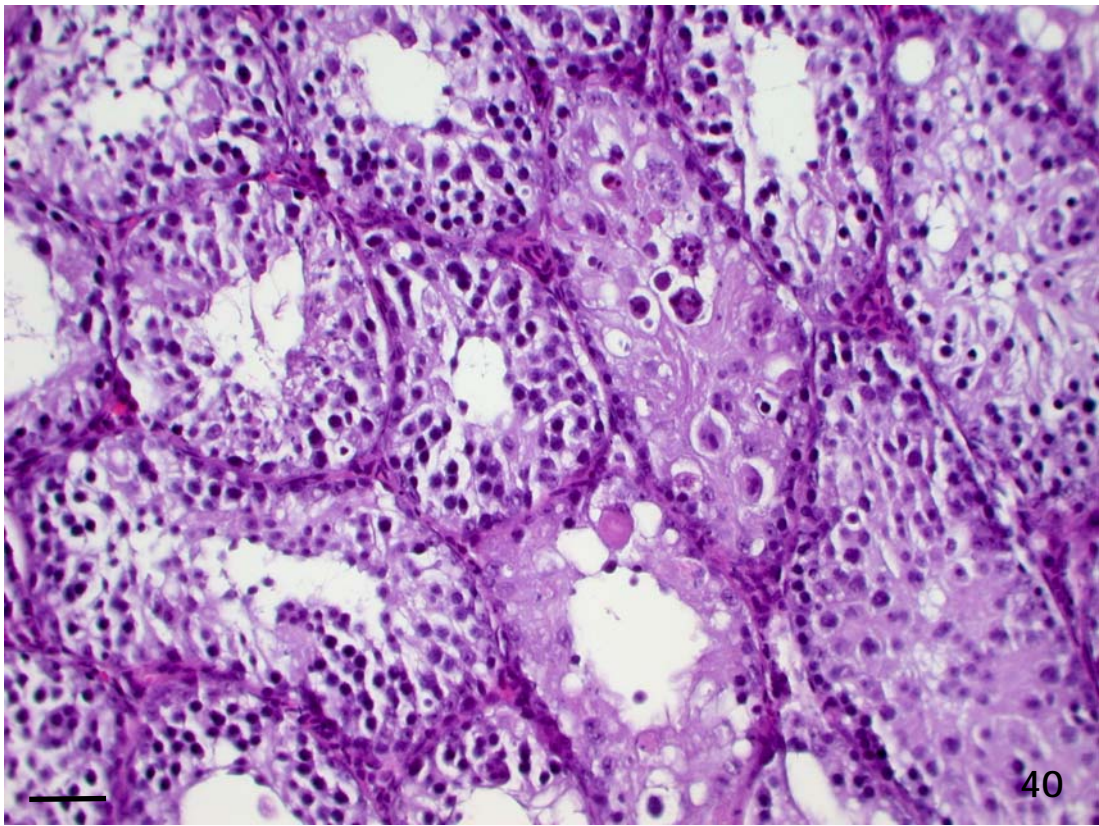
Una variante del túbulo seminífero que acabamos de describir los constituyen los tubos seminíferos que presentan características idénticas al anterior a excepción de que las imágenes sincitiales no son eosinófilas sino basófilas (figura 40).

Al igual que en la otra variedad, el material basófilo que forma la matriz intratubular es de aspecto reticular (figuras 40 y 41).

A grandes aumentos destaca que el interior de las estructura sincitial presenta una aspecto laminar y que los núcleos que contiene en muchas ocasiones exhiben un nucleolo evidente (figura 41).

**Figuras 40 y 41. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratos wild type de 6 semanas de edad.**

Barras: 30  $\mu$ m en figura 40 y 6  $\mu$ m en figura 41



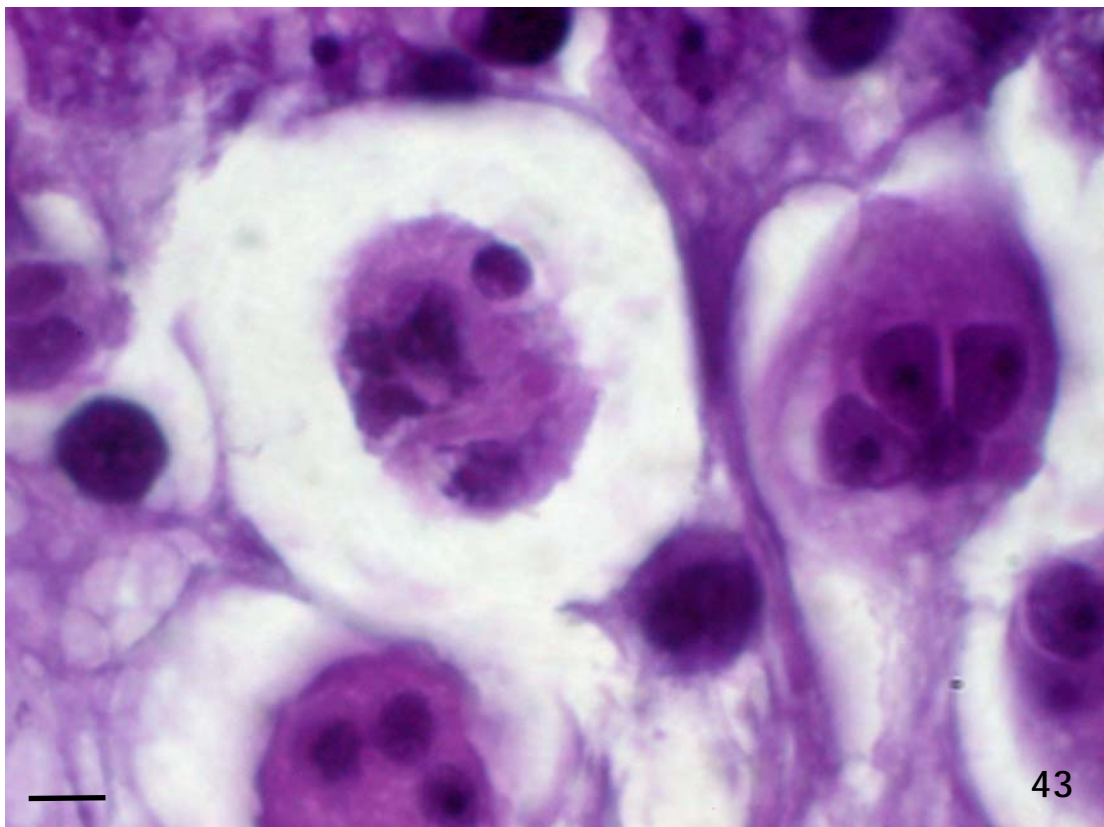
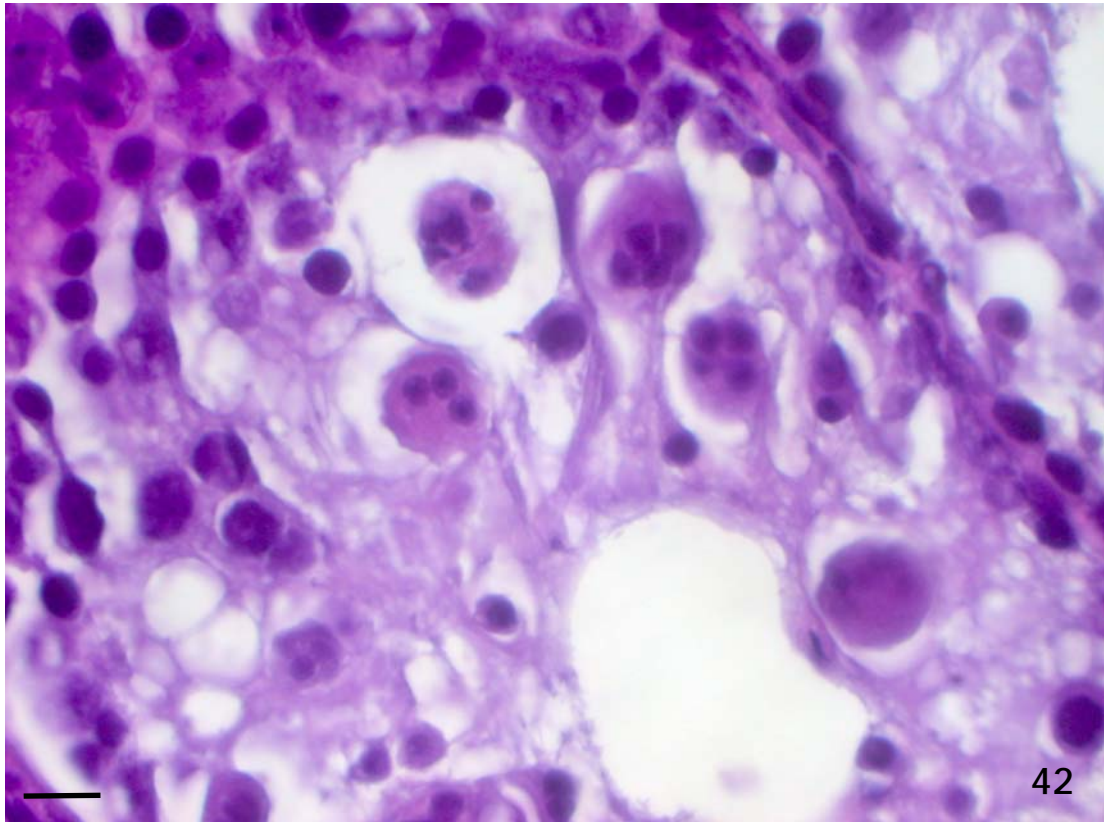
Las estructuras sincitiales que hemos descrito en los dos tipos de tubo seminífero anteriormente presentan algunas variantes que sugieren la posibilidad de que todo ello sean el resultado de observar diferentes fases de un mismo proceso.

En ocasiones, como se muestra en las figuras 42 y 43, el tubo mantiene en una zona el aspecto tubular y su organización, con células de Sertoli, espermatogonias y espermatocitos, pero no espermatídes. Sin embargo, en otra zona del mismo tubo, aparecen imágenes sincitiales rodeadas de un amplio espacio vacío.

Estas estructuras presentan un citoplasma con ligera eosinofilia y los núcleos que contiene pueden ser pequeños y redondeados, o bien grandes poligonales y con nucleolo evidente (figura 43).

**Figuras 42 y 43. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratos wild type de 6 semanas de edad.**

Barras: 15  $\mu$ m en figura 42 y 6  $\mu$ m en figura 43



Otra variante de la anterior es la que se muestra en las figuras 44 y 45.

Como puede apreciarse en un mismo tubo, en el que se observan células germinales y de Sertoli, coexistían estructuras sincitiales con diferentes morfologías y patrones:

Estructuras basófilas, con una imagen lacunar grande en su interior y pequeños núcleos redondeados e hiper cromáticos (1 en figura 44).

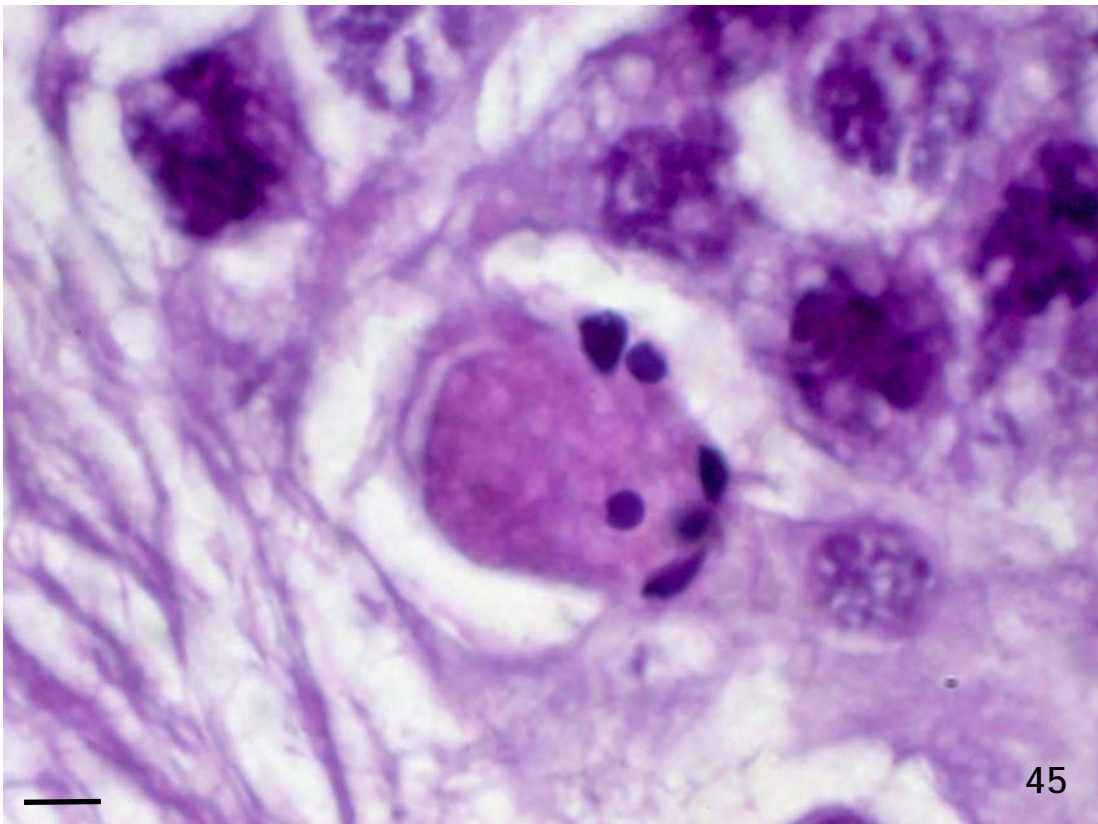
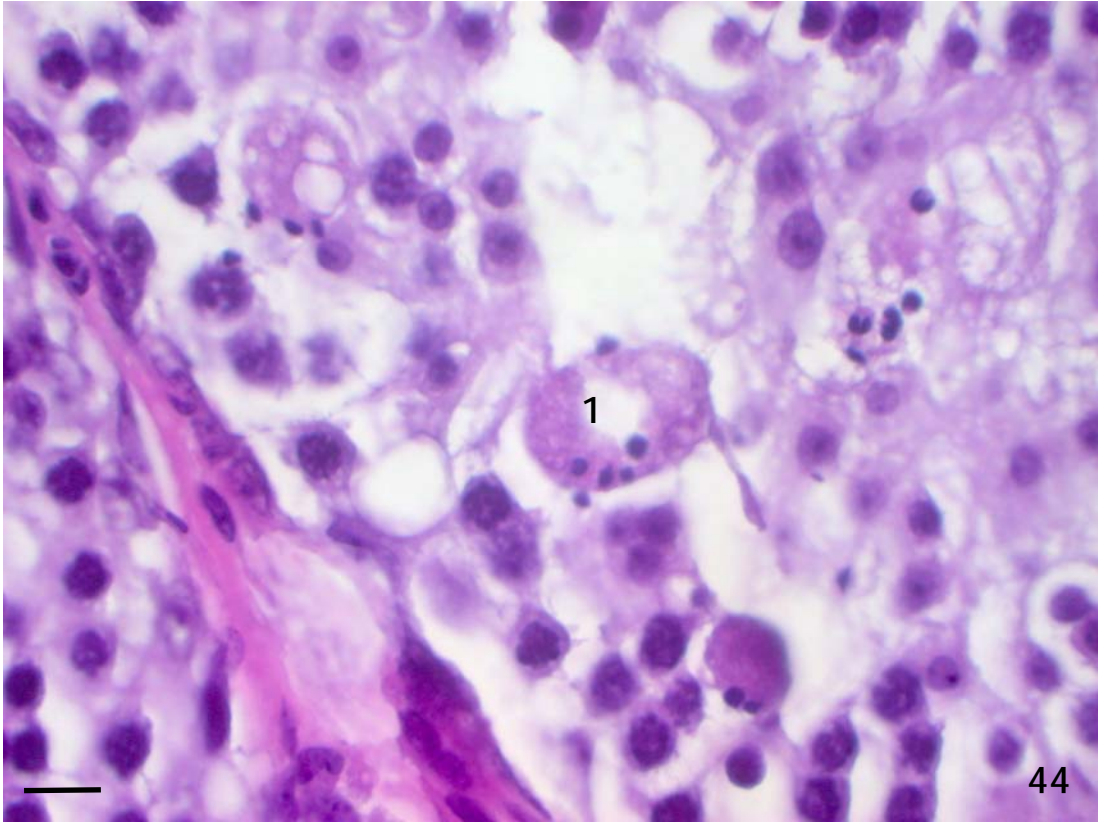
Estructuras basófilas con vacuolas de diferente tamaño que parecen convergen y núcleos pequeños desplazados hacia la periferia (2 en figura 44).

Estructuras acromáticas formando un retículo con nucleos pequeños de formas variables (3 en figura 44),

Estructuras ovaladas compactas con una discreta eosinofilia y núcleos pequeños hiper cromáticos y muy periféricos (4 en figura 44). A mayores aumentos (figura 45) se aprecia claramente que el interior es ligeramente vesiculoso y que los núcleos marginales hiper cromáticos son muy pequeños y de morfología variable, quizás cuerpos apoptóticos.

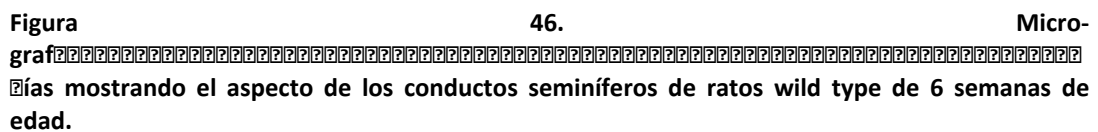
**Figuras 44 y 45. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratos wild type de 6 semanas de edad.**

Barras: 15µm en figura 44 y 6 µm en figura 45



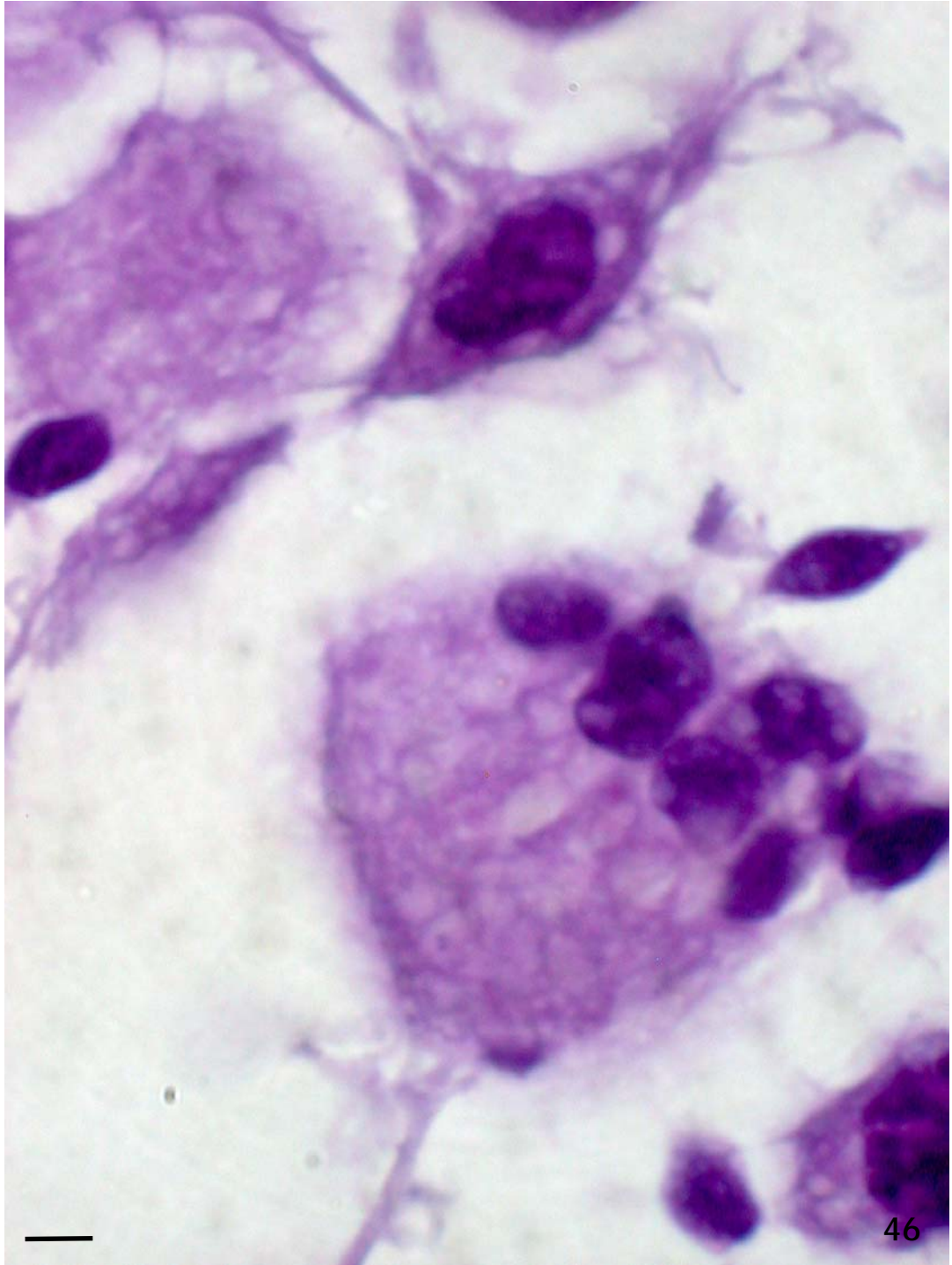
La figura 46 muestra a grandes aumentos la desorganización de la porción central del tubo seminífero, con la presencia de una imagen sincitial con nueve núcleos desplazados hacia un polo, un citoplasma reticular y basófilo.

Junto a ella pueden observarse células sin parecido a las células germinales normales y tramas fibrosas que parten de ellas.

**Figura 46. Micro-**  
**grafía**  **Mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratos wild type de 6 semanas de edad.**

Barra: 3µm



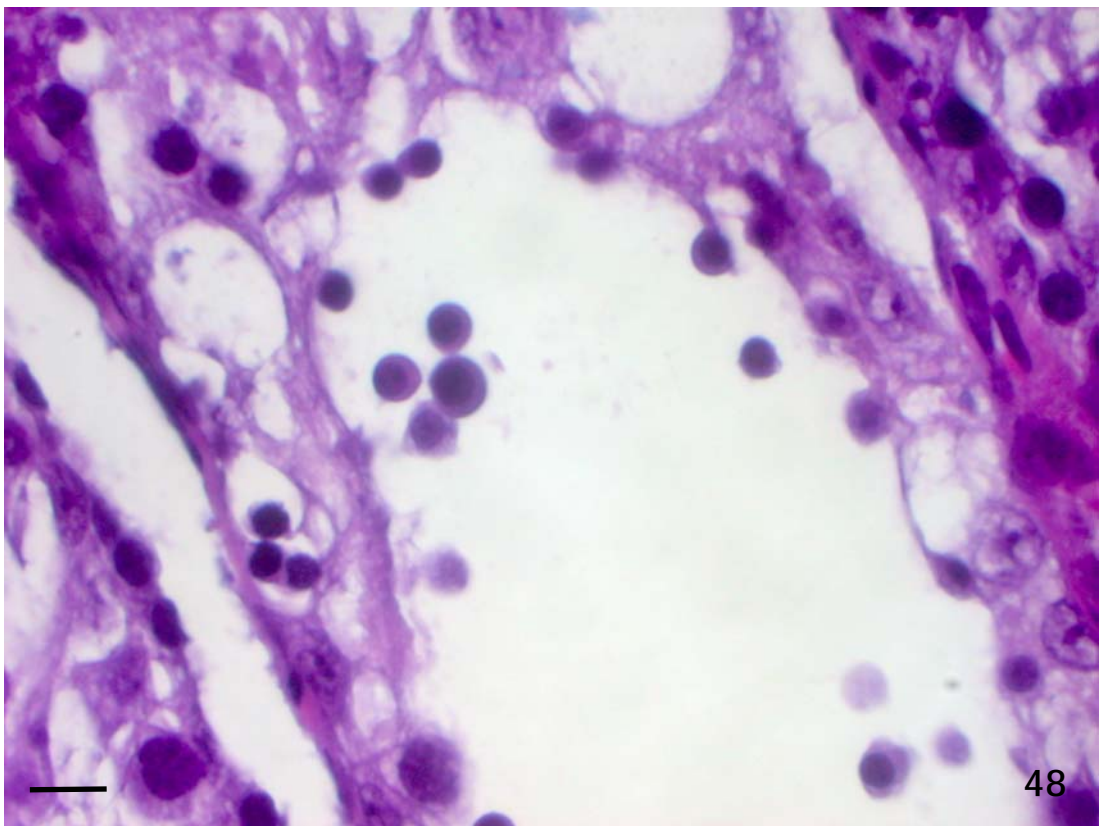
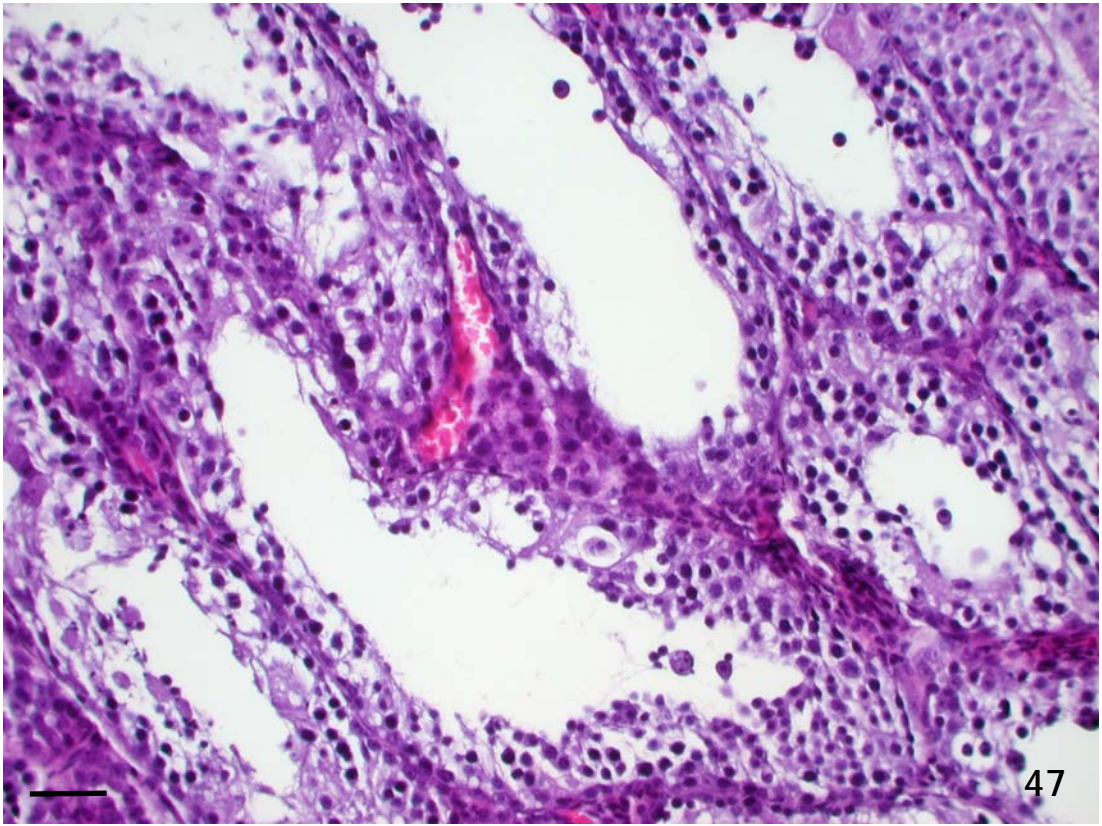


Los tubos seminíferos vacíos (figuras 47 y 48) se caracterizaron por presentar células de Sertoli pegadas a la membrana basal, alguna hilera concéntrica discontinua de espermatogonias y espermatocitos de primer orden.

Algunas de las espermatogonias estaban desprendidas del residuo epitelial y aparecían aisladas y dispersas por la luz del tubo (figura 48

**Figuras 47 y 48. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratos wild type de 6 semanas de edad.**

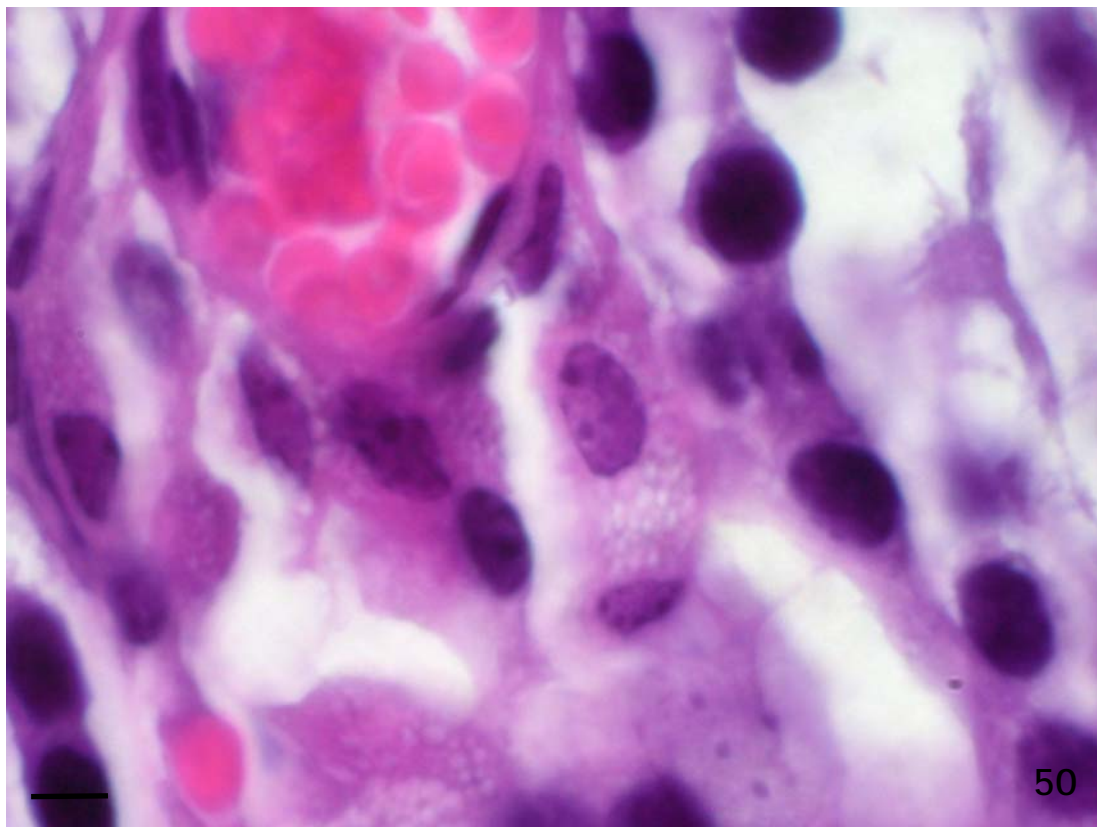
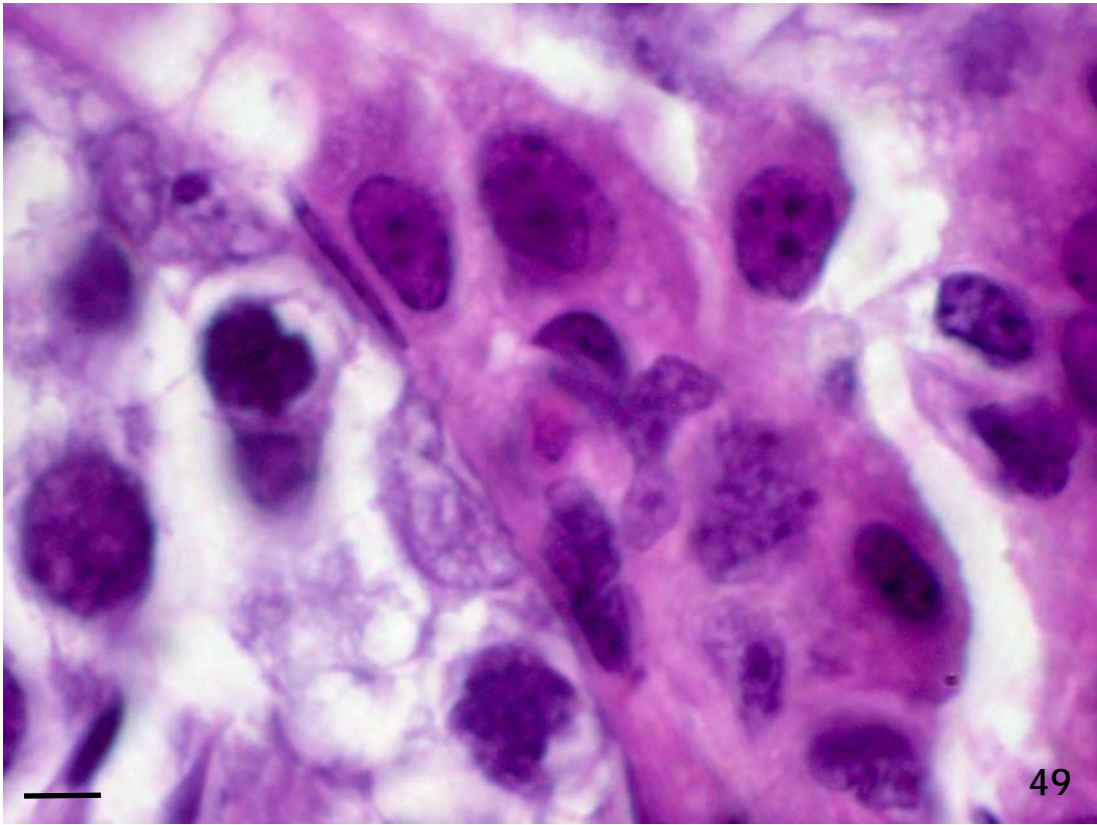
Barras: 30μ μm en figura 47 y 10 μm en figura 48



Las células de Leydig en estos animales presentaron formas poligonales y se caracterizaron por ser menos eosinófilas que en los demás grupos de animales estudiados (figuras 49 y 50).

**Figuras 49 y 50. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos seminíferos de ratos wild type de 6 semanas de edad.**

Barras: 6  $\mu$ m



## ***Valores morfométricos.***

### **Epitelio ductal (grosor o altura).**

AL describir los cambios morfológicos ya hemos puntualizado como los animales knock out presentaban menos hileras celulares que los animales wild type. Este dato hemos querido cuantificarlo mediante el grosor o altura lineal del epitelio de los túbulos seminíferos y son los resultados que se presentan a continuación.

En los animales knock out de 12 semanas de edad, algunos túbulos prácticamente no tenían epitelio mostrando tan solo alguna célula basal aislada. Estos túbulos no han sido considerados en el estudio morfométrico. De igual manera, aquellos túbulo compactos en los que no se podía diferenciar de modo evidente donde estaba la zona luminal del túbulo tampoco han sido considerados para el estudio morfométrico. Por lo que, en este grupo de animales, fue criterio de selección el que hubiera una luz clara en el centro del túbulo y que el epitelio tuviera al menos dos hileras concéntricas de células.

Como muestra la figura 52 al analizar la altura media del epitelio del túbulo seminífero los ratones wild type de 12 semanas presentaron un epitelio más grueso y de mayor altura ( $p < 0.05$ ) que los de 6 semanas.

Los ratones knock out de 6 semanas de edad presentaron una altura epitelial media significativamente menor ( $p < 0.01$ ) que la observada en los wild type de su misma edad.

A las 12 semanas de edad, esta diferencia entre los wild type y los knock out aumentó de forma considerable, de manera que la altura epitelial en los knock out fue mucho menor, casi un tercio, que la observada en los wild type ( $p < 0.001$ ).

Además, la altura epitelial de los knock out de 12 semanas fue significativamente menor que la observada en los knock out de 6 semanas ( $p < 0.01$ ).

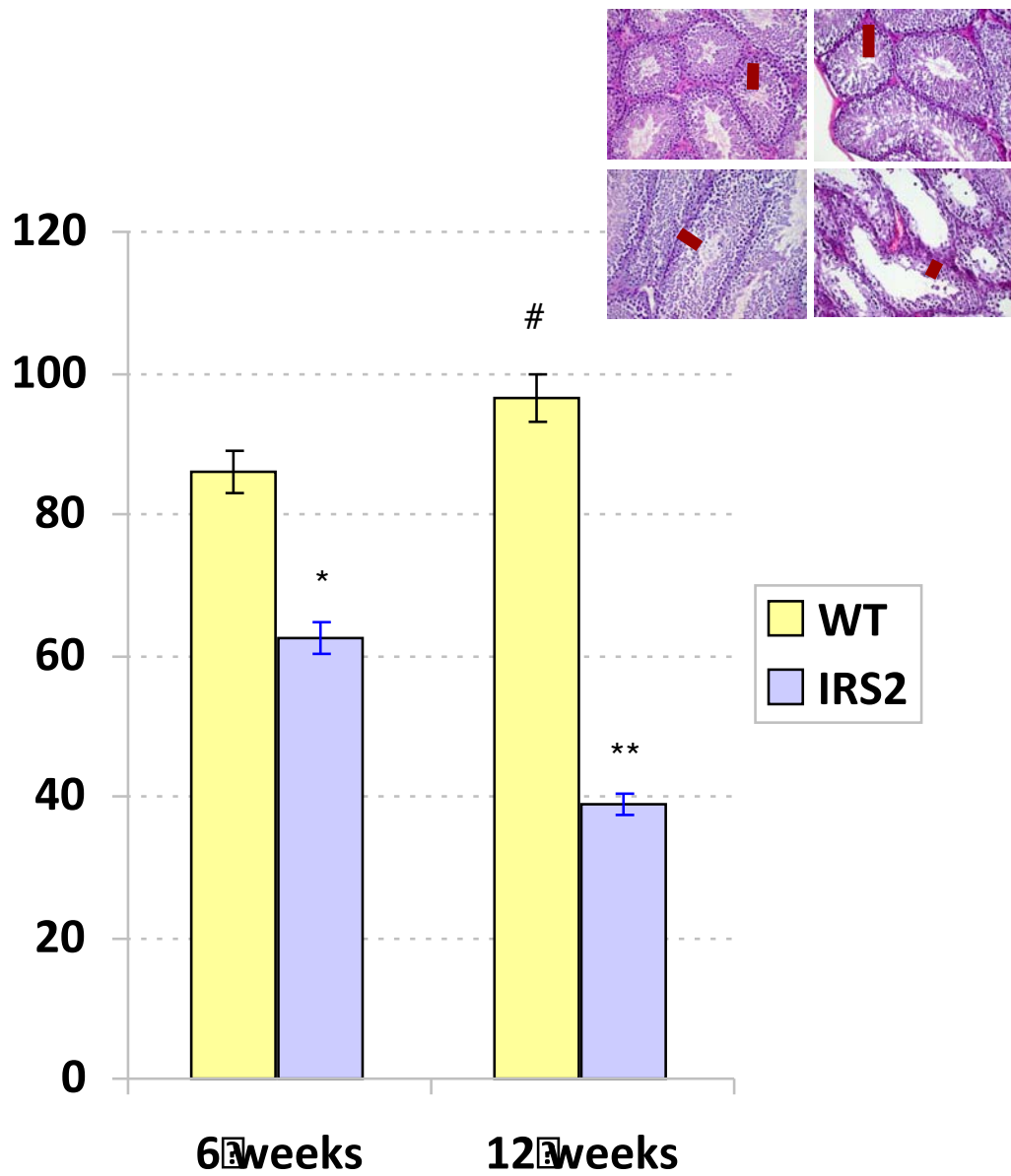


Figura 52. Gráfica que muestra las diferencias observadas en el grosor (altura) del epitelio de los túbulos seminíferos al comparar los animales wild type WT con los knock out (KO).

Valores expresados en píxeles.

#:  $p < 0.05$  con respecto a los WT de 6 semanas.

\*:  $p < 0.01$ , con respecto a WT de 6 semanas

\*\* :  $p < 0.001$  con respecto a los WT de 12 semanas y  $p < 0.01$ , con respecto a KO de 6 semanas

## **Perímetro ductal.**

Aunque el perímetro ductal medio de los ratones wild type de 6 semanas fue discretamente superior al observado en los WT de 12 semanas de edad, las diferencias observadas no alcanzaron valores significativos (Figura 52).

Al comparar el perímetro ductal de los knock out de 6 semanas con el de los WT de su misma edad se apreció una disminución significativa ( $p < 0.01$ ).

Un efecto parecido, un poco más manifiesto se observó al comparar el perímetro ductal medio entre los animales de 12 semanas, presentado un perímetro significativamente menor ( $p < 0.01$ ) los knock out frente a los wild type.

Los ratones knock out de 12 semanas de edad presentaron un perímetro ductal medio significativamente menor que el de los knock out de 6 semanas ( $p < 0.05$ ).



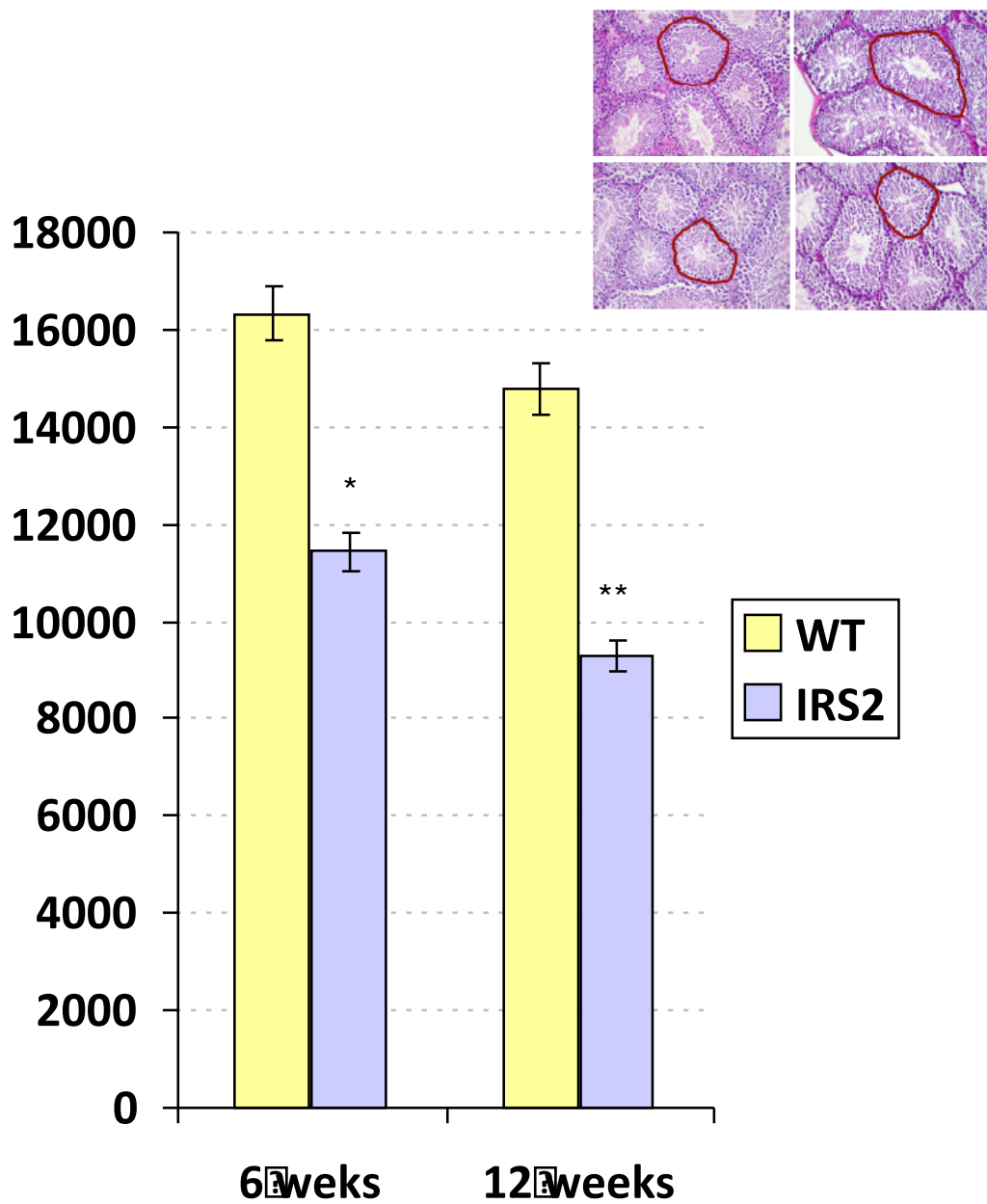


Figura 52. Gráfica que muestra las diferencias observadas en el perímetro de los túbulos seminíferos al comparar los animales wild type WT con los knock out (KO).

Valores expresados en píxeles.

\*:  $p < 0.01$ , con respecto a WT de 6 semanas

\*\* :  $p < 0.01$  con respecto a los WT de 12 semanas y  $p < 0.05$ , con respecto a KO de 6 semanas

## **Superficie ductal.**

El estudio de la superficie media de los túbulos seminíferos en cortes transversales de los mismos puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los animales wild type de 6 y los de 12 semanas.

Como puede observarse en la gráfica de la figura 53 la superficie ductal a las 12 semanas de edad fue significativamente mayor ( $p < 0.01$ ) que la observada a las 6 semanas.

La superficie ductal media en los ratones knock out a IRS2 fue siempre menor que la observada en los ratones wild type de la misma edad. Ya a las 6 semanas esa superficie fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ).

Estas diferencias se incrementaron a las 12 semanas de edad, los ratones knock out de esta edad presentaron una superficie ductal significativamente menor que la observada en los ratones knock out de 6 semanas ( $p < 0.01$ ).

Como consecuencia de que superficie ductal en los animales wild type de 12 semanas fue mucho mayor que la de los wild type de 6 semanas y que la superficie de los knock out de 12 semanas fue casi la mitad de la observada en los knock out de 6 semanas, las diferencias observadas en la superficie ductal media de los knock out de 12 semanas y los wild type de su misma edad ( $p < 0.005$ ) fue mucho mayor que la que se apreció a las 6 semanas.

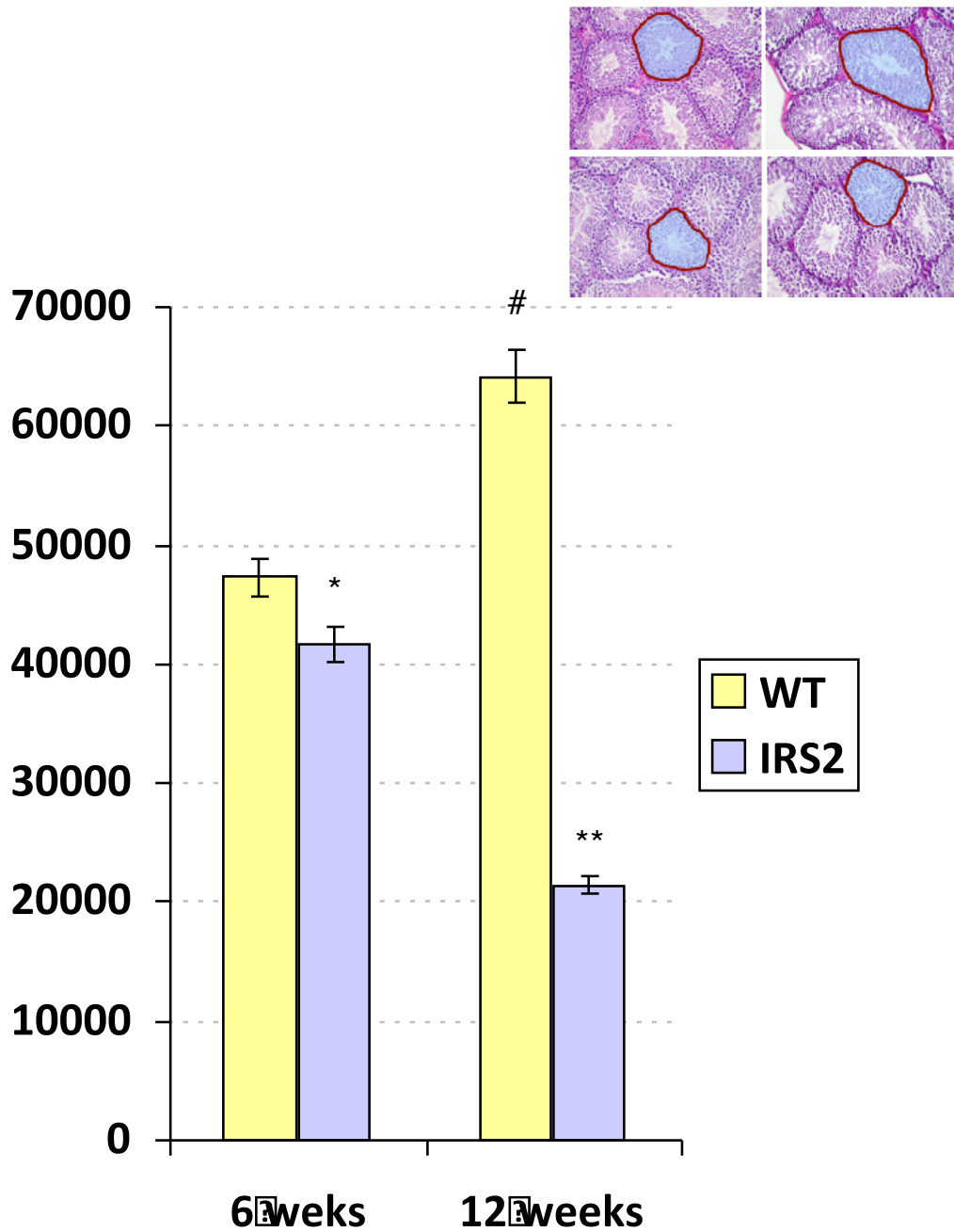


Figura 53. Gráfica que muestra las diferencias observadas en la superficie de los túbulos seminíferos al comparar los animales wild type WT con los knock out (KO).

Valores expresados en píxeles.

#:  $p < 0.01$  con respecto a los WT de 6 semanas.

\*:  $p < 0.05$ , con respecto a WT de seis semanas

\*\* :  $p < 0.005$ , con respecto a WT de 12 semanas y  $p < 0.01$  con respecto a KO de 6 semanas

## **Rete Testis.**

### **Animales de 6 semanas de edad.**

Los conductos de la rete testis en los ratones de 6 semanas de edad se manifestaron como estructuras con un epitelio simple de células prismáticas monoestratificado que descansaba sobre la muscular del conducto, con núcleos bien teñidos, circulares y dispuestos basalmente (figura 54).

La parte central del conducto estaba ocupada por espermatozoides de aspecto y en número normal, aunque claramente inferior al observado en los ratones wild type de 12 semanas de edad.

Los ratones knock out de 6 semanas presentaron diferencias llamativas en los conductos de la rete testis con respecto a los animales wild type de su misma edad.

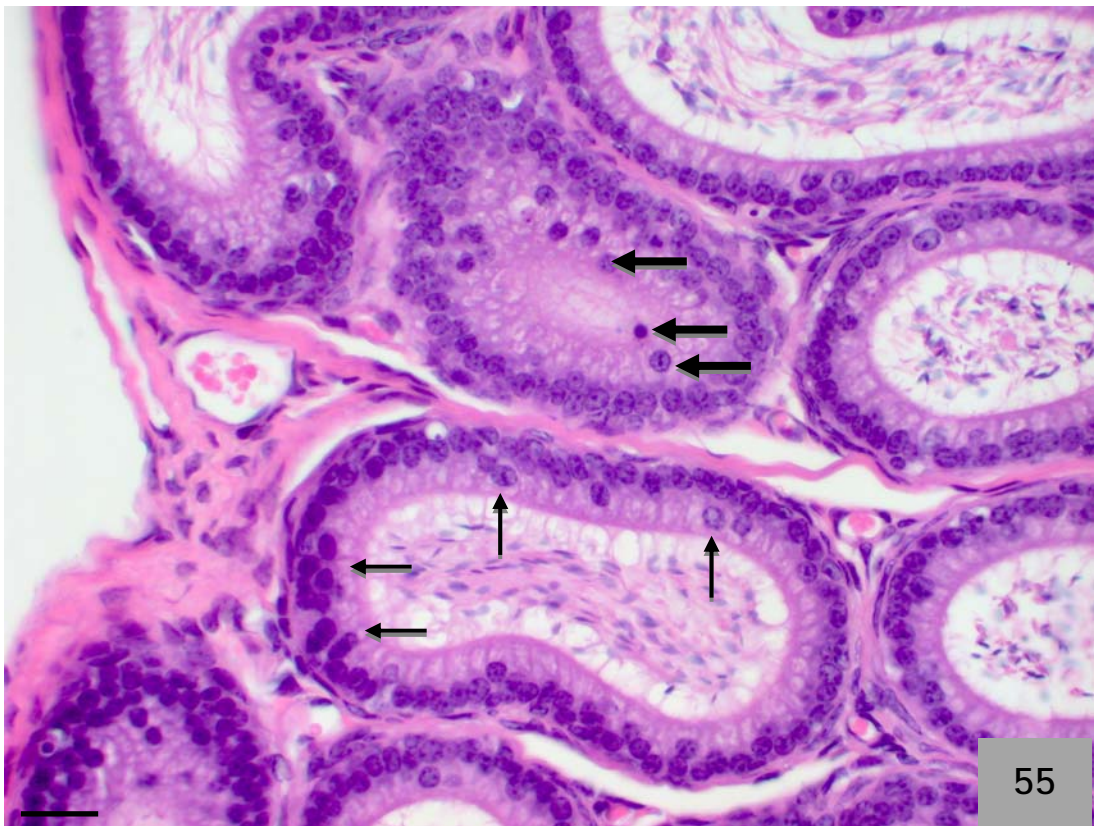
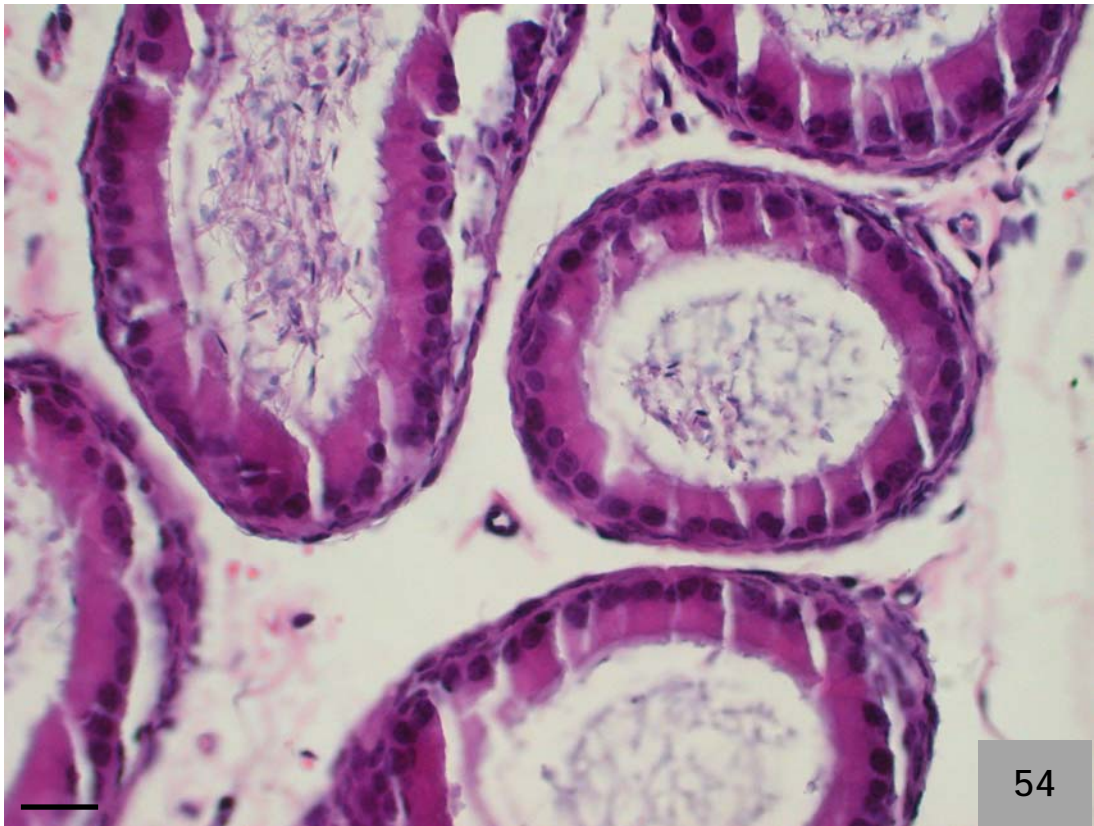
Como puede observarse en la figura 55, las diferencias no afectaban sensiblemente a los espermatozoides luminales, pero sí al epitelio del conducto.

Este epitelio estaba formado por células prismáticas altas y con núcleos de mayor tamaño y menos teñidos que en los wild type.

La diferencia más notable fue la aparición de núcleos desplazados hacia el polo apical de las células epiteliales, que le daba aspecto de epitelio pseudoestratificado, y la eliminación de células epiteliales por descamación hacia la luz del conducto (flechas en figura 55).

**Figuras 54 y 55. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos de la rete testis de ratones wild type (figura 54) y knock out (figura 55) de 6 semanas de edad.**

Las flechas en la figura 55 señalan las células con desplazamiento nuclear o incluso descamadas hacia la luz del conducto.



## Animales de 12 semanas de edad.

Los conductos de la rete testis de los animales wild type de 12 semanas de edad presentan características semejantes a las que se observaban en los wild type de 6 semanas (figura 56).

La luz del conducto (asterisco en figura 56) estaba llena de espermatozoides y ocasionalmente alguna forma inmadura (flecha corta en figura 56).

El epitelio del conducto estaba formado por células prismáticas con un núcleo basal pequeño e intensamente tenido con hematoxilina.

Los animales knock out de 12 semanas de edad (figura 57) se caracterizaron por presentar conductos anfractuados cuyo epitelio estaba formado por células prismáticas si bien la altura de las células era menor que en los animales wild type de la misma edad.

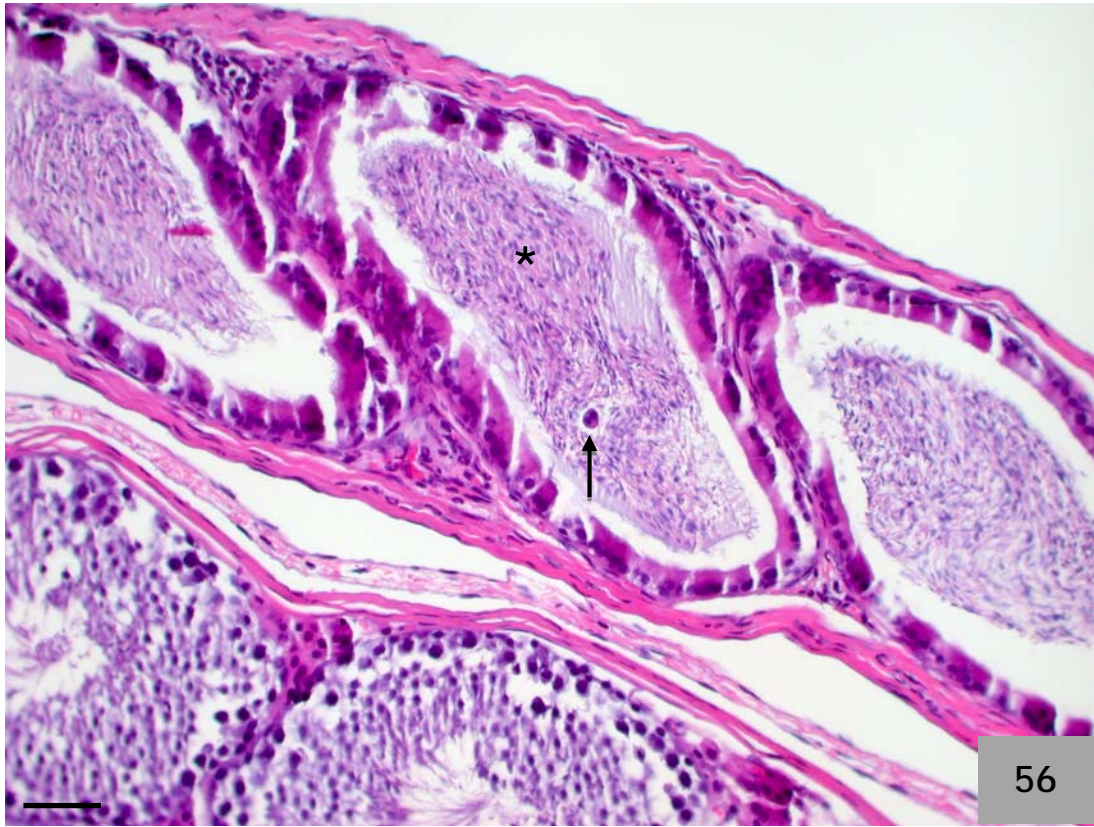
En los animales en los que pudo comprobarse que la espermatogénesis no estaba activa y presentaban las mayores alteraciones estructurales en los conductos seminíferos, la luz de los conductos epididimarios estaba prácticamente vacía de células y sin contenido (asterisco en figura 57).

La pseudoestratificación observada a las 6 semanas, también se apreció a las 12 semanas (flechas cortas en figura 57).

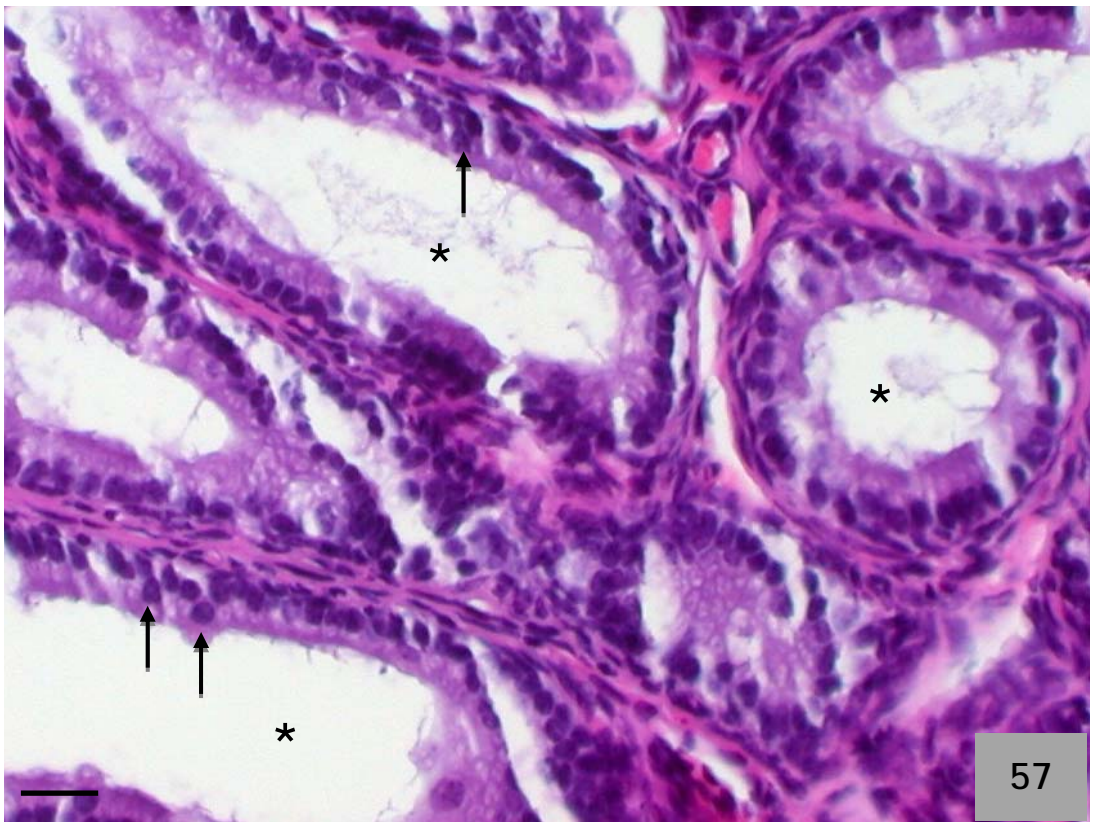
**Figuras 56 y 57. Micrografías mostrando el aspecto de los conductos de la rete testis de ratones wild type (figura 56) y knock out (figura 57) de 12 semanas de edad.**

La flecha en la figura 56 señala la presencia de una forma inmadura en la luz del conducto. Las flechas de la figura 57 muestran los desplazamientos nucleares hacia el polo apical de la célula.

\* Luz del tubo, repleta de espermatozoides en los WT y mostrando la ausencia de los mismos en los KO.



56



57

## ***Proliferación Celular***

Los resultados obtenidos al estudiar la proliferación celular pusieron de manifiesto que si bien las diferencias morfológicas observadas entre los machos wild type y los knock out de seis semanas no eran tan llamativas como los que aparecieron en animales de doce semanas, a las seis semanas de edad, los ratones knock out presentan serias alteraciones del ciclo espermático.

Ante los hallazgos observados en los animales de seis semanas de edad, que detallaremos a continuación, no pareció necesario ampliar el estudio a los animales de 12 semanas.

La gráfica de la figura 58 muestra el porcentaje de células positivas (barras azules) y el de las no positivas (barras rojas) a PCNA en el estrato basal del epitelio de los túbulos seminíferos.

Como puede observarse fácilmente, en los animales wild type de 6 semanas de edad prácticamente el 50% de las células estaban en proliferación y, muy probablemente, eran células madre de espermatogonias en división, manteniendo activo el ciclo espermático.

En los machos knock out de seis semanas el porcentaje de células positivas a PCNA, en torno al 4%, fue significativamente inferior ( $p < 0.001$ ) al observado en los animales wild type de la misma edad.



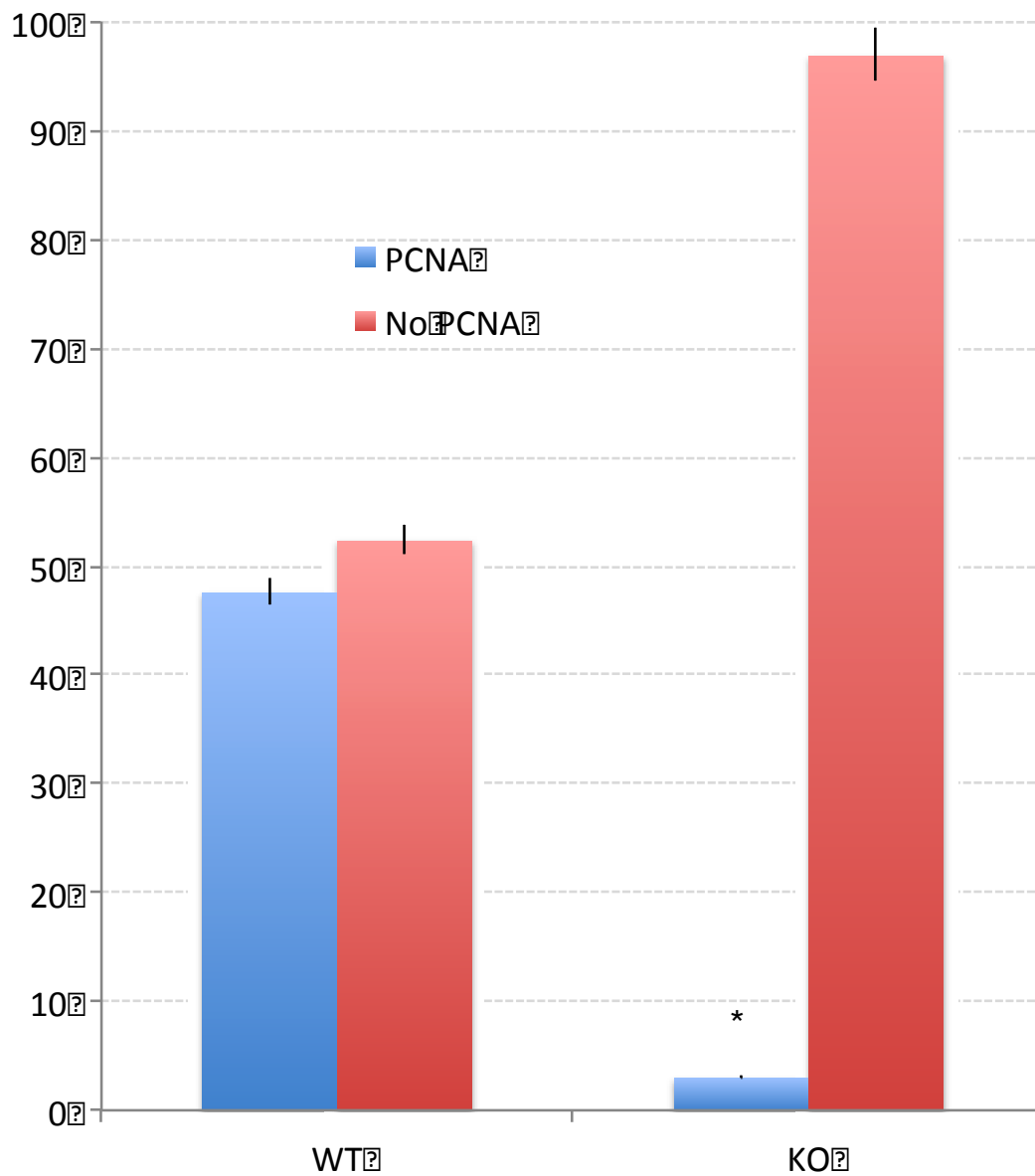


Figura 58. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a PCNA (barras azules) y el de las no positivas (barras rojas) en los animales wild type (WT) y knock out (KO) de seis semanas de edad.

\*:  $p < 0.0001$

Las siguientes micrografías muestran a bajos y medios aumentos de microscopio el aspecto de la reacción observada para PCNA que afecta fundamentalmente al estrato basal, obtenidas a partir de secciones de testículo de ratones de seis semanas wild type y knock out.

Excepto en la última plancha que todo son imágenes obtenidas de knock out, en las demás, las imágenes superiores corresponden a animales wild type (WT) y las inferiores a los knock out (KO).

Como puede apreciarse en ellas, la positividad a PCNA observada en los ratones wild type afectó principalmente a las espermatogonias, sin embargo no fue raro observar núcleos marcados en células próximas a la zona adluminal del epitelio, correspondientes a espermatoцитos.

En su generalidad los tubos seminíferos de los ratones knock out de 6 semanas no presentaban positividad a PCNA.

**Figuras 59 a 76. Micrografías mostrando el aspecto de la reacción a PCNA en los túbulos seminíferos de ratones wild type o knock out de 6 semanas de edad.**  
**La reacción a PCNA aparece en todos los casos en color marrón. El color azul se corresponde con el contraste con hematoxilina de Mayer.**

Barras:

Figuras 59 a 62: 60  $\mu\text{m}$ ; Figuras 63 a 70: 30  $\mu\text{m}$ ; Figuras 71 a 76: 15  $\mu\text{m}$

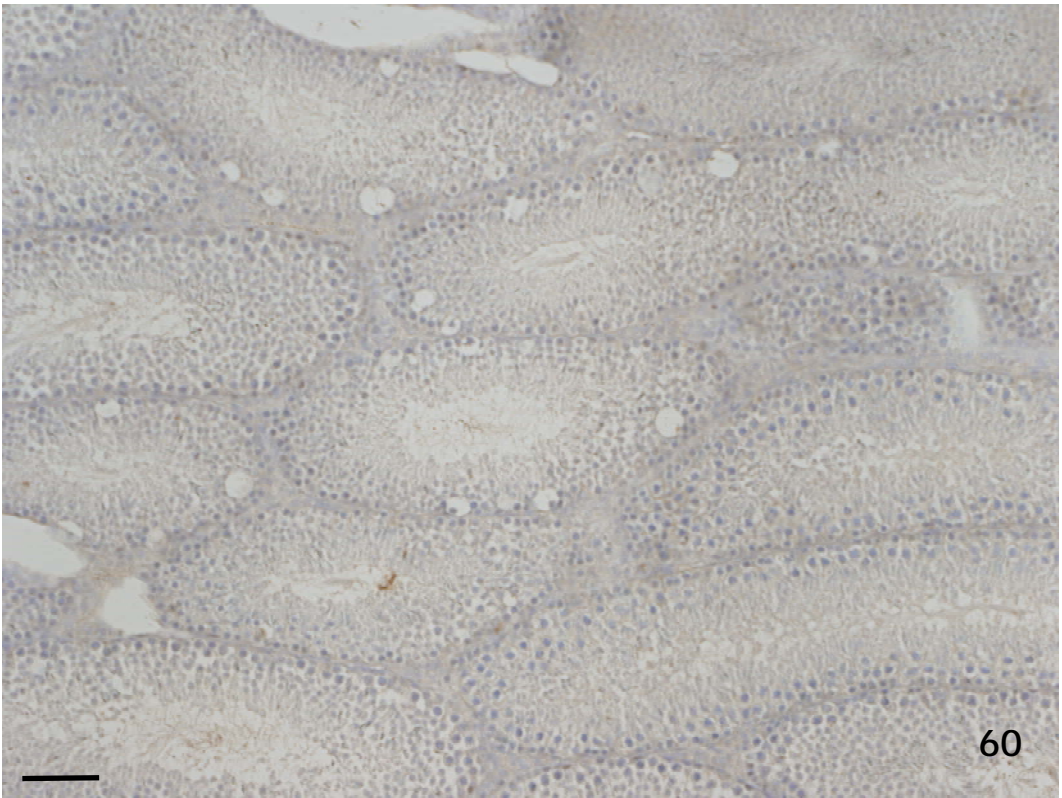
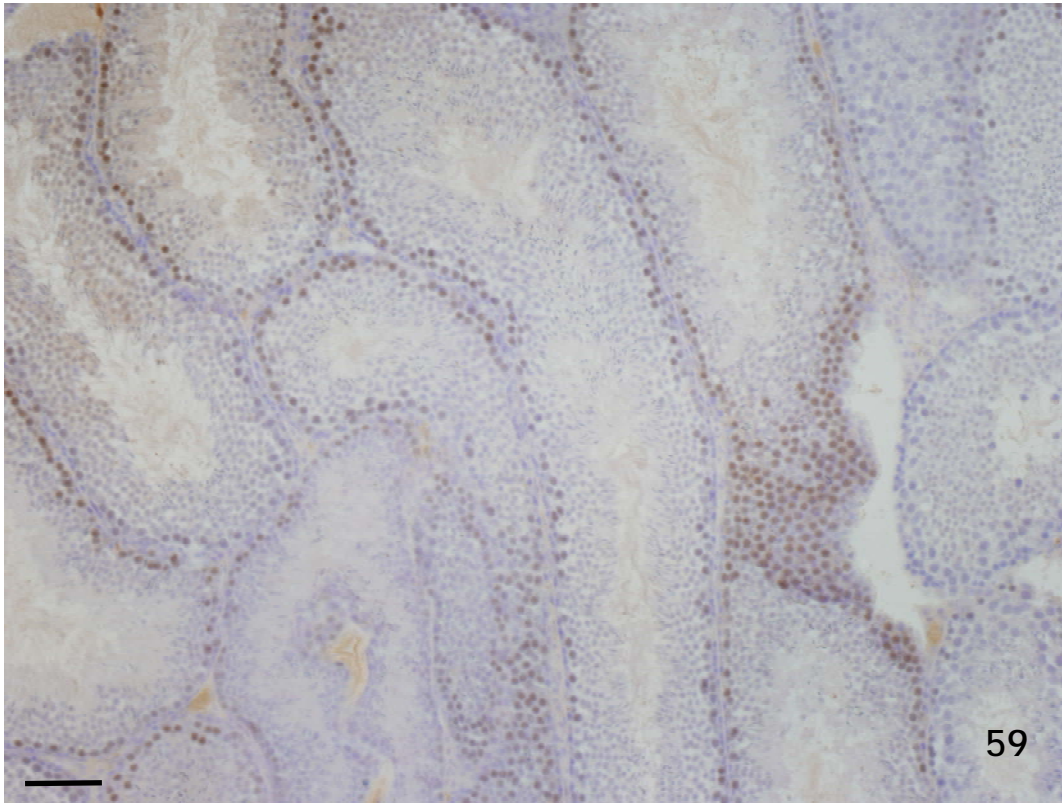
Flechas en figura 61: espermatoцитos en proliferación en un ratón wild type.

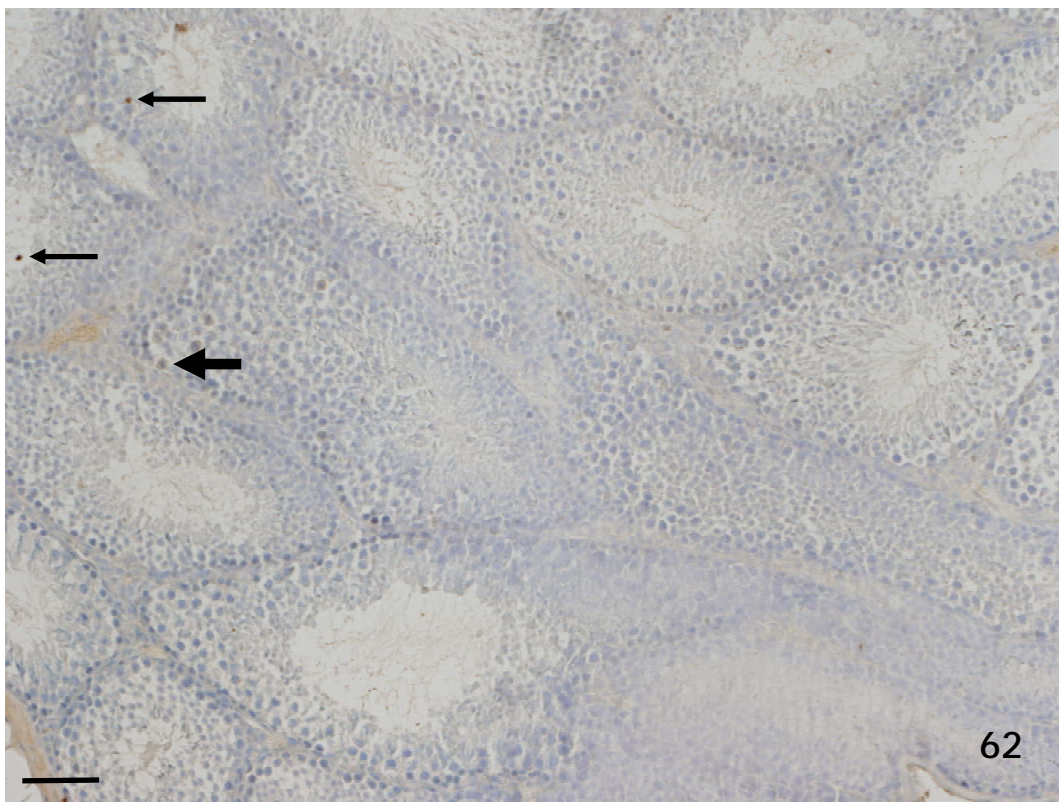
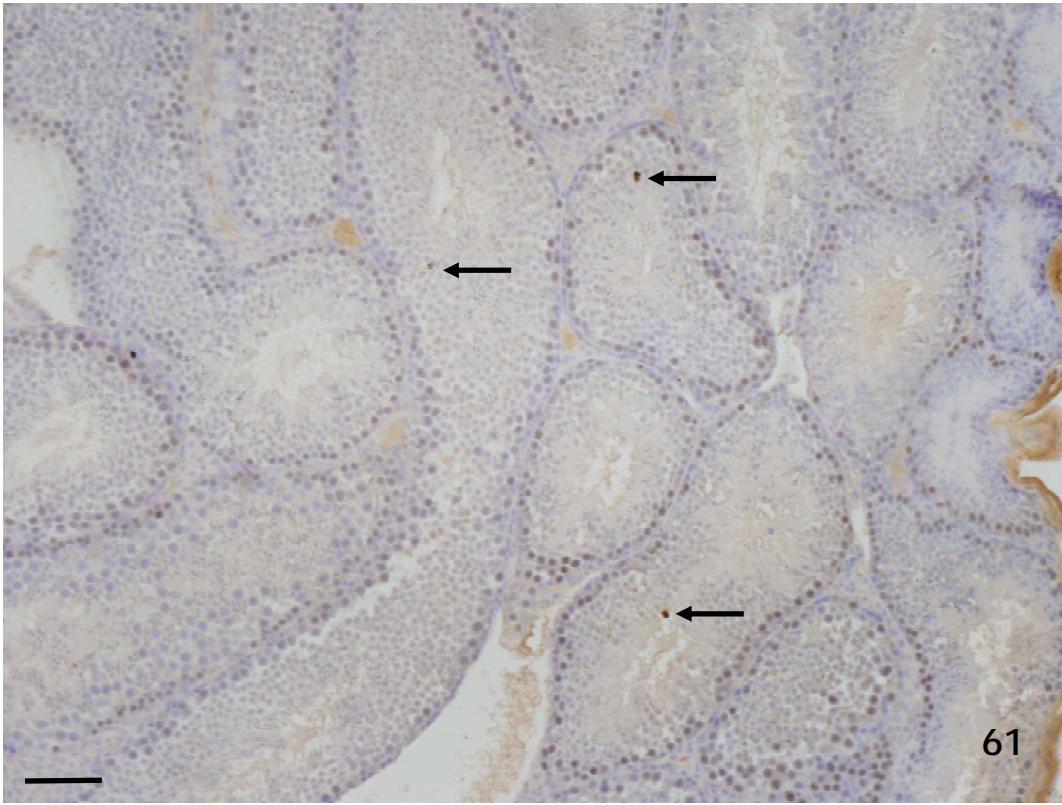
Flechas finas en figura 62: espermatoцитos positivos a PCNA en un ratón knock out.

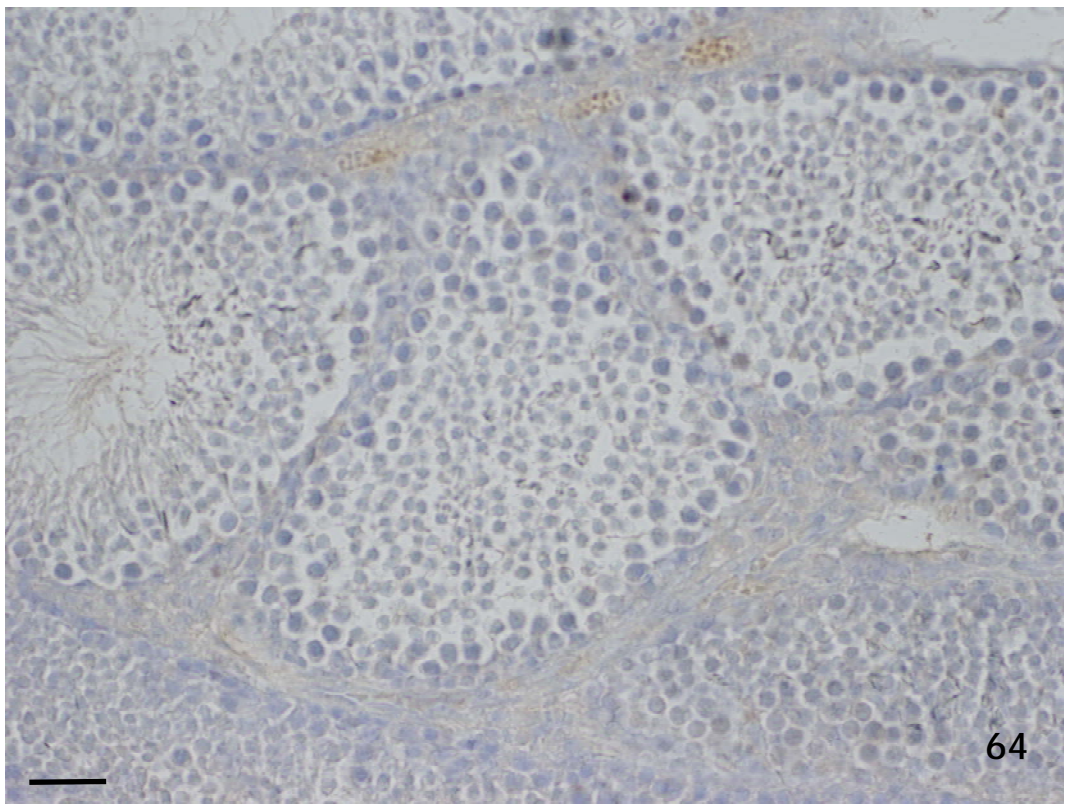
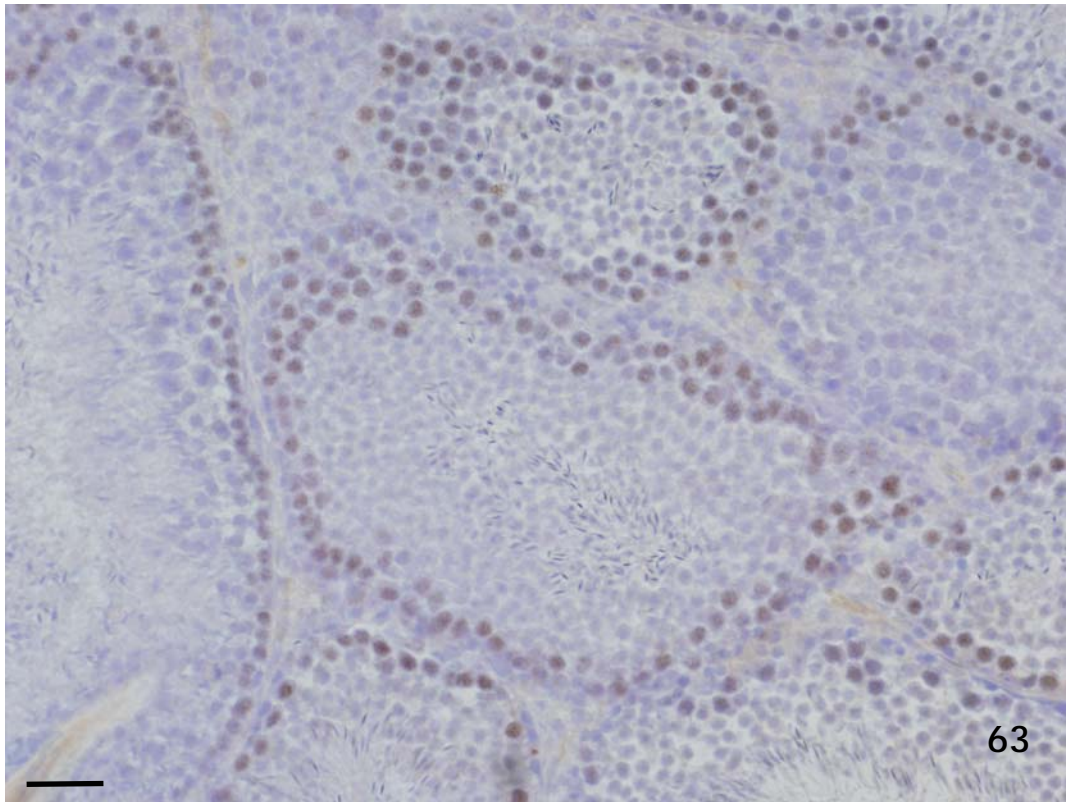
Flecha gruesa en figura 62: espermatogonia positiva a PCNA en un ratón knock out.

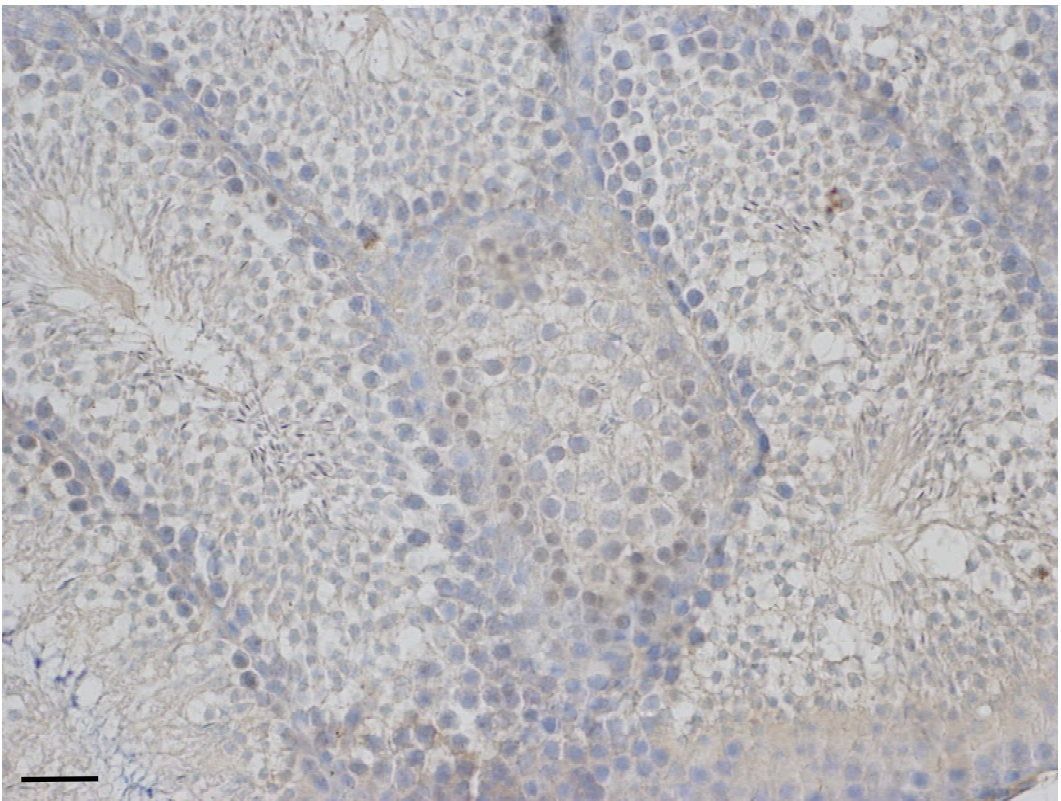
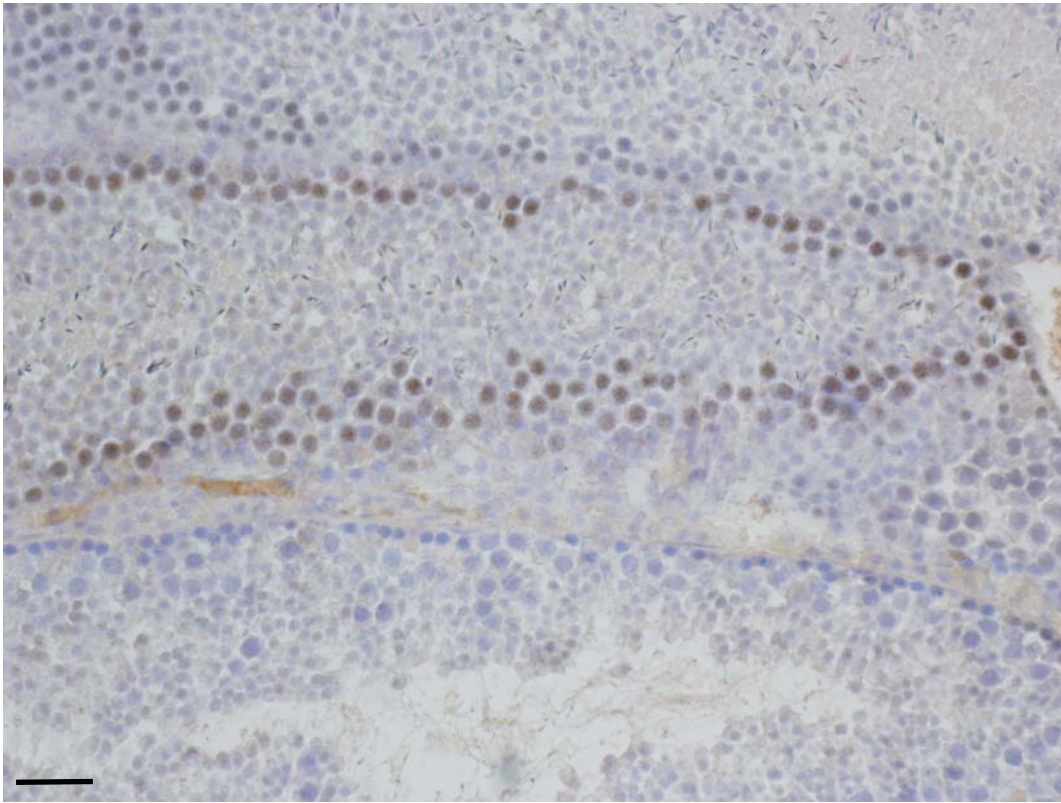
Flechas en figura 72: espermatoцитos en división en un ratón knock out.

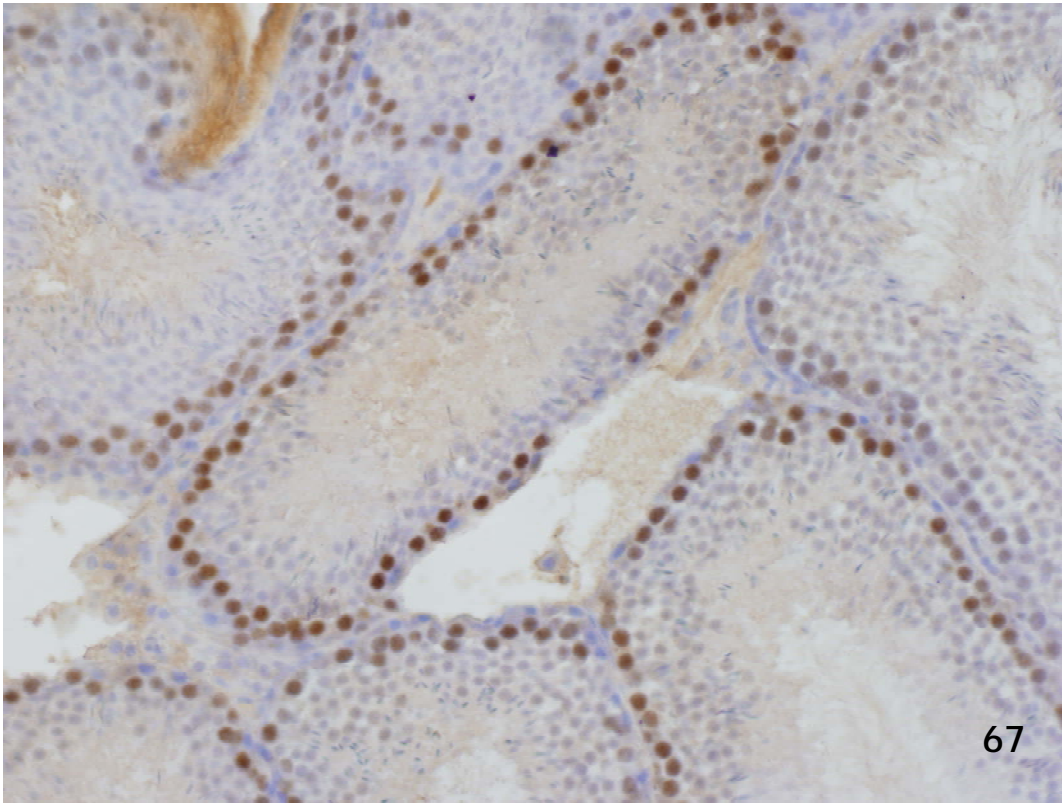
Flechas en figura 75: espermatogonias de citoplasma vacuolado no positivas



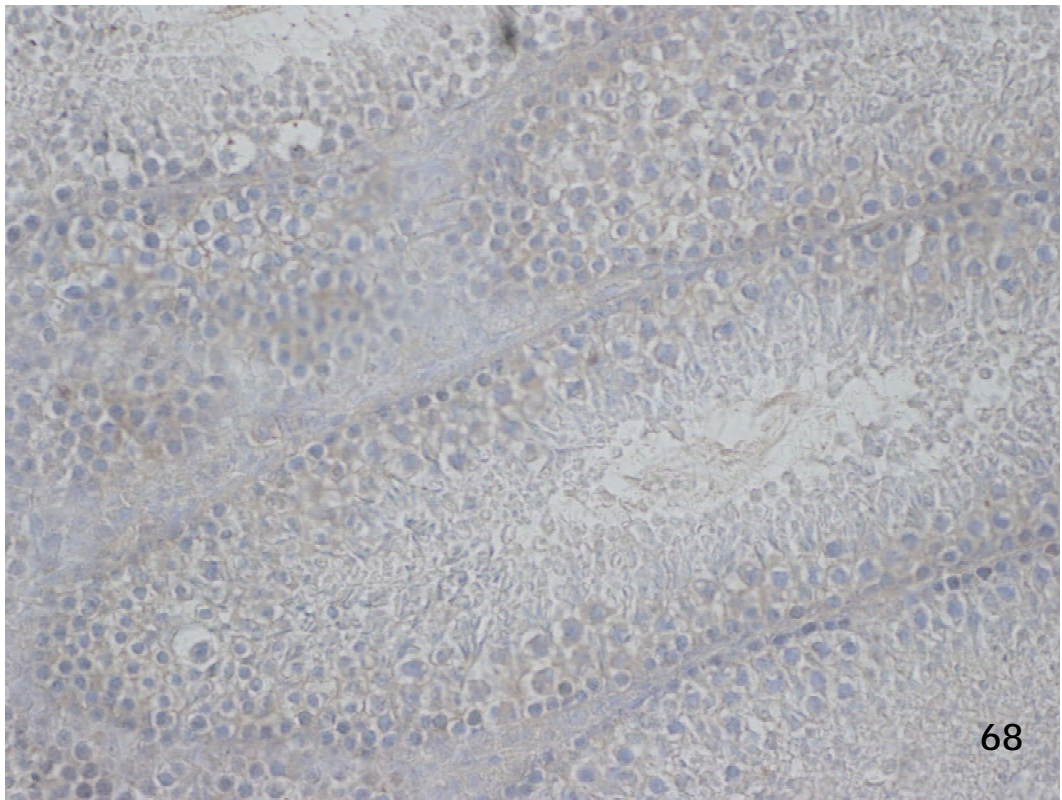




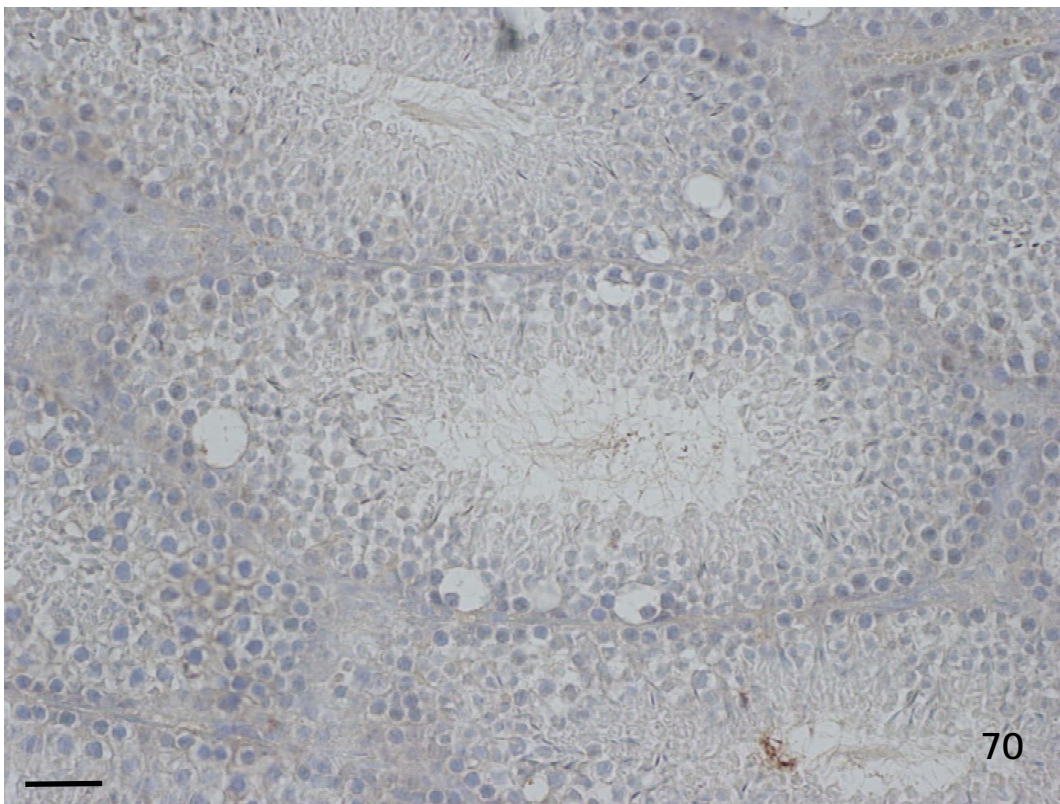
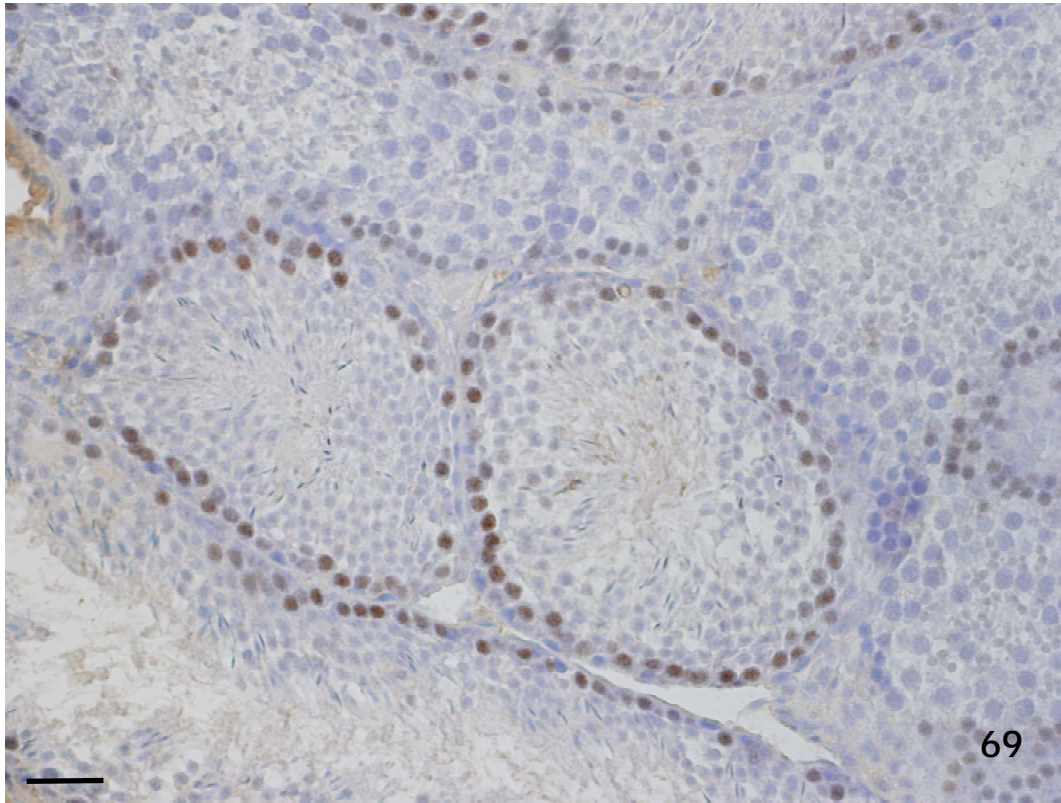




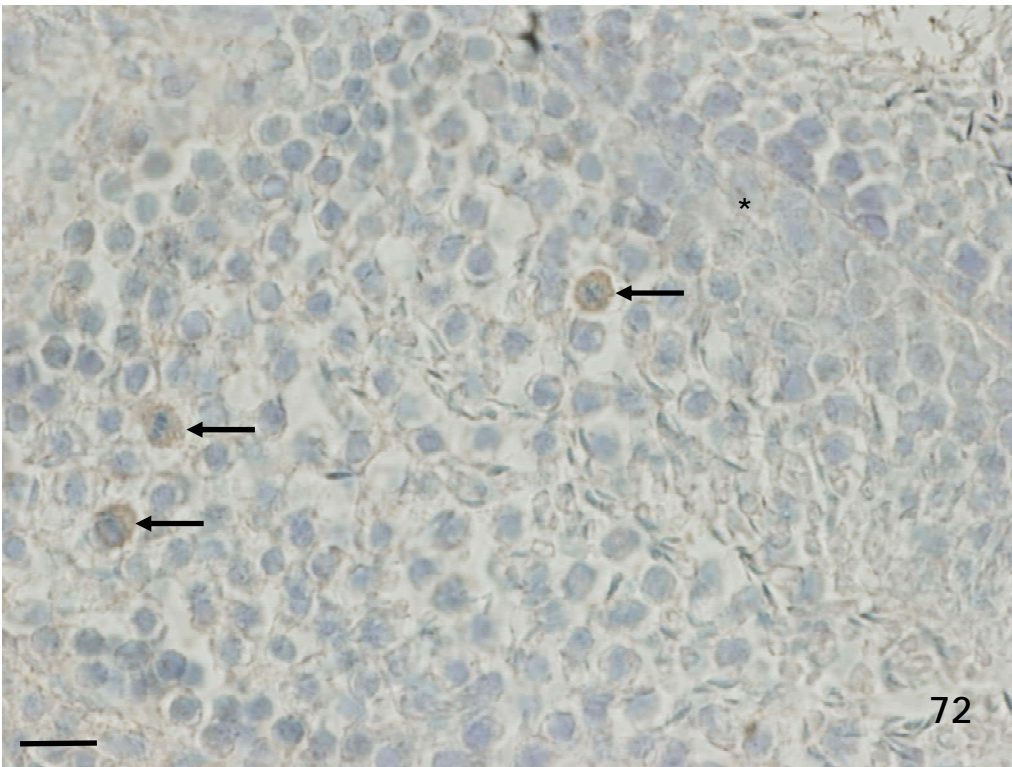
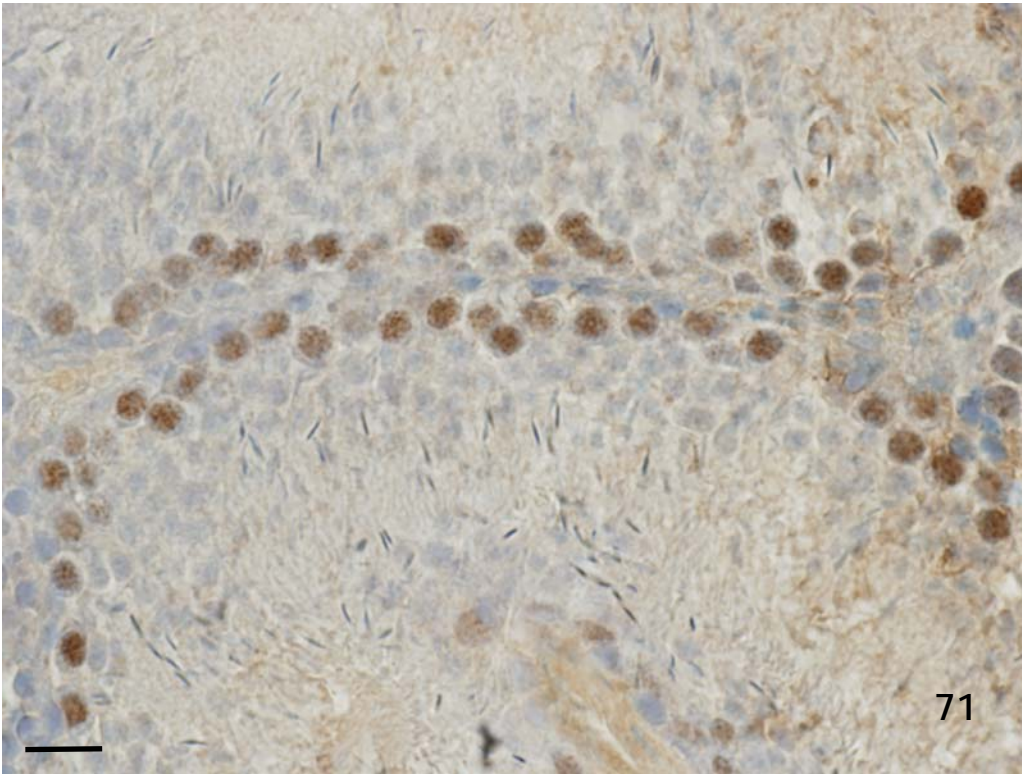
67

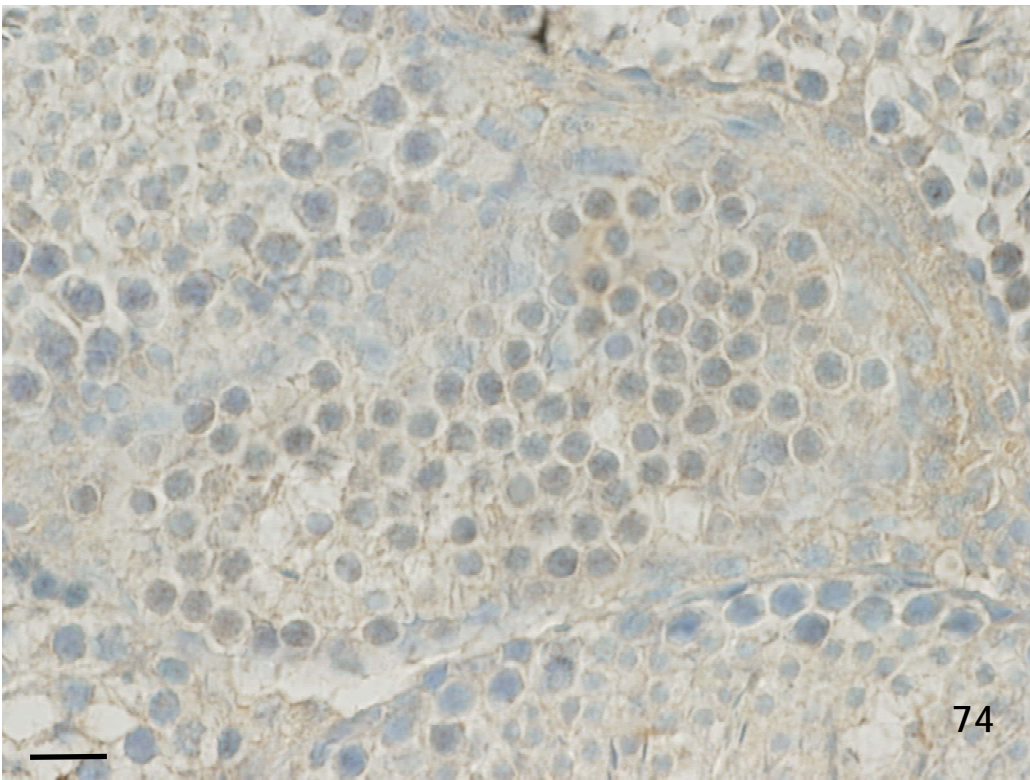
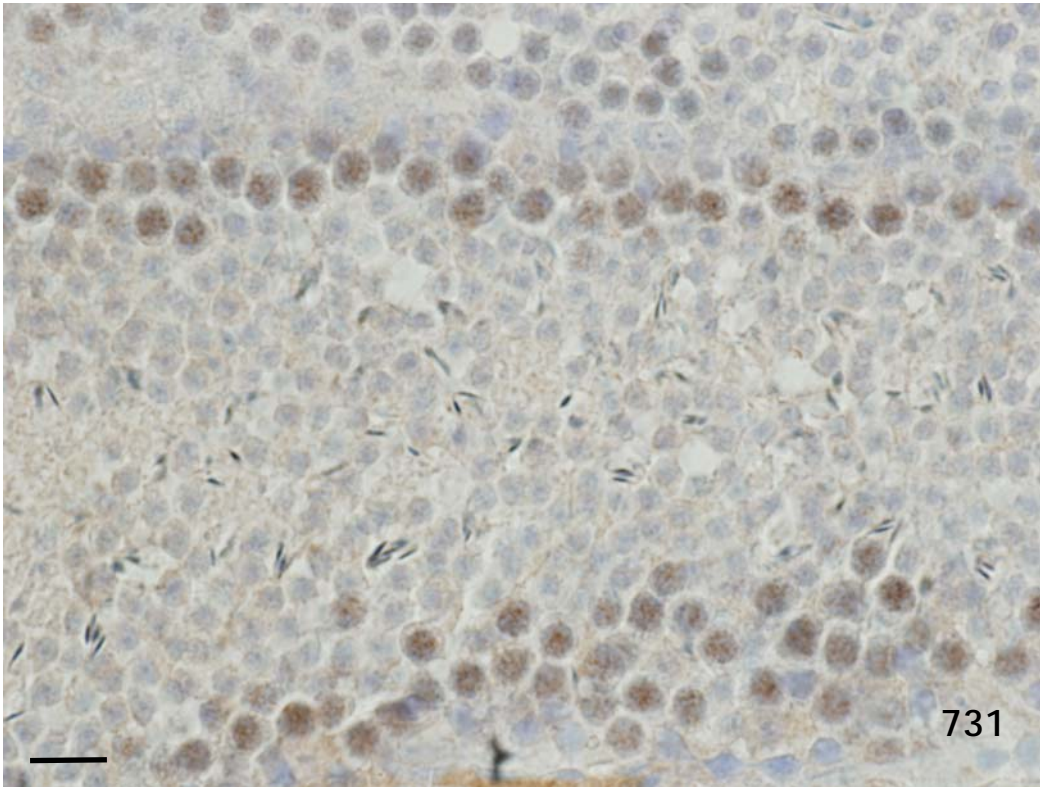


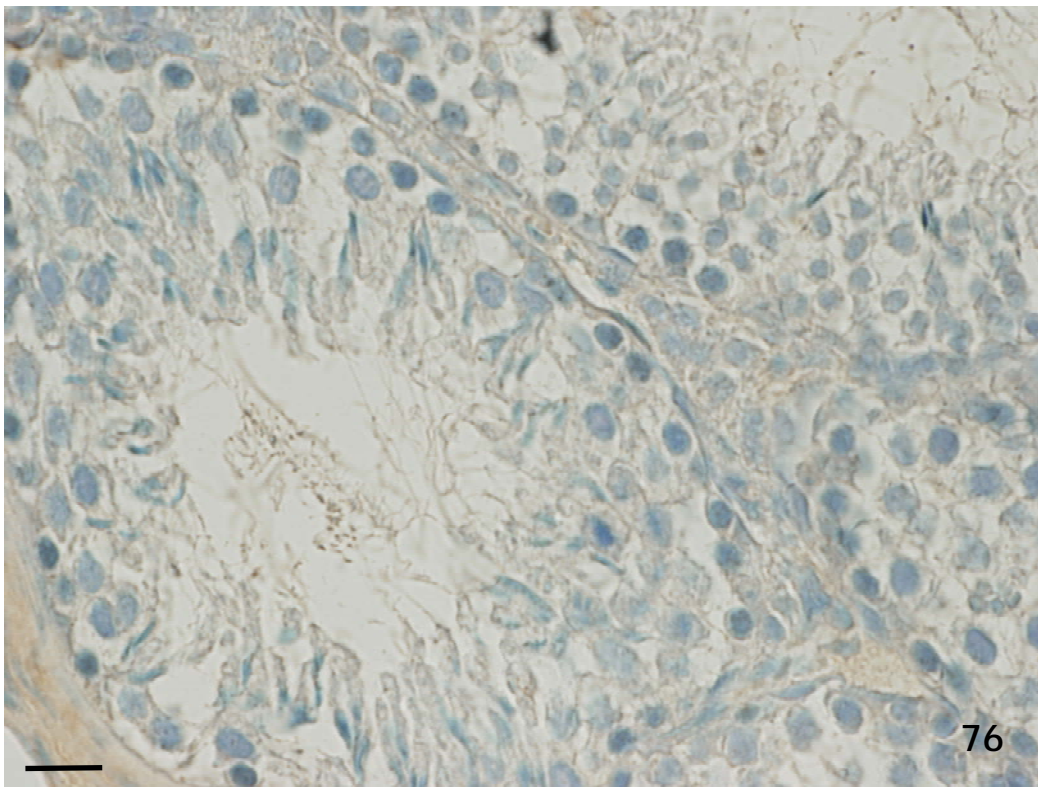
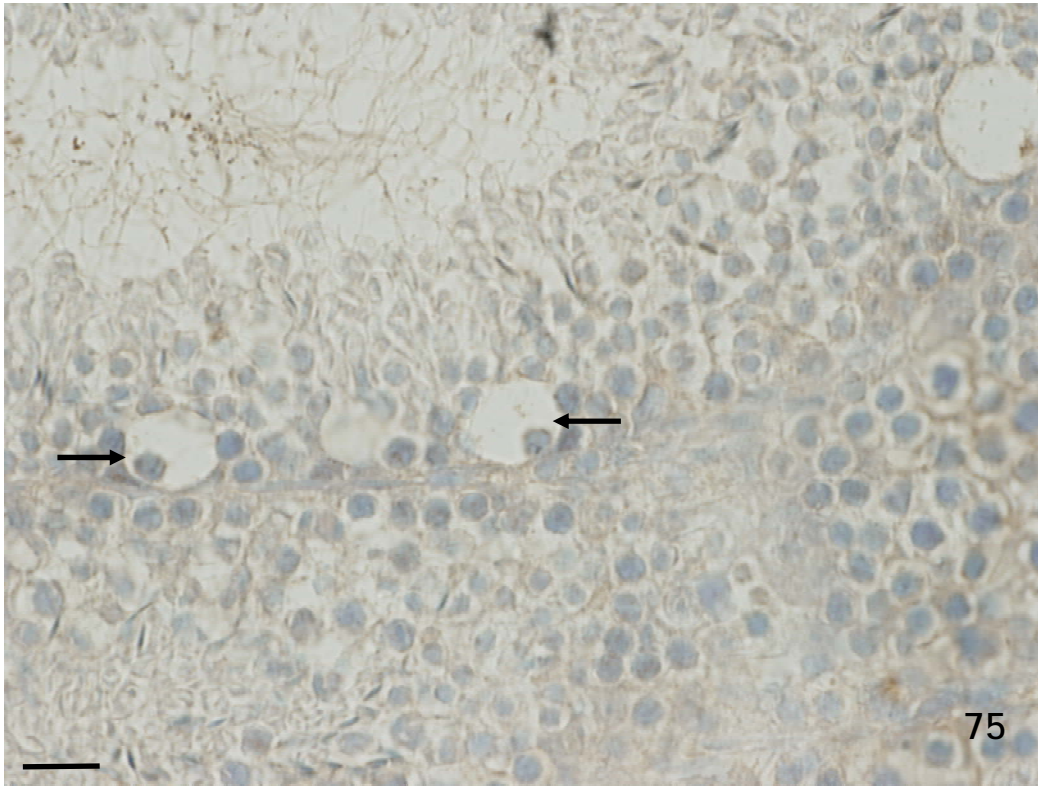
68











## **Apoptosis.**

Ante los resultados obtenidos después de analizar y comparar morfológicamente los testículos de los ratones wild type y knock out para IRS2, y tras comprobar la casi total ausencia de proliferación en los animales knock out y la aparición de tubos aberrantes con imágenes que podría ser cuerpos apoptóticos, se realizó un adeterminación inmuncitoquímica de caspasa 3 activa con la finalidad de si los ratones knock out para IRS2 presentaban más apoptosis que los wild type.

Este estudio se realizó, al igual que el estudio de proliferación, en animales de seis semanas de edad.

Como muestran las imágenes que presentamos a continuación, fue muy raro encontrar alguna células positiva a caspasa 3 activa en los animales wild type, mientras que en sí se encontraron en los ratones knock out.

Al igual que hicimos para presentar las imágenes de proliferación, en las planchas de figuras 77 a 84, la imagen superior se corresponde con un animal wild type y la inferior con un knock out. A partir de la figura 85 todas son micrografías obtenidas a partir de ratones knock out.

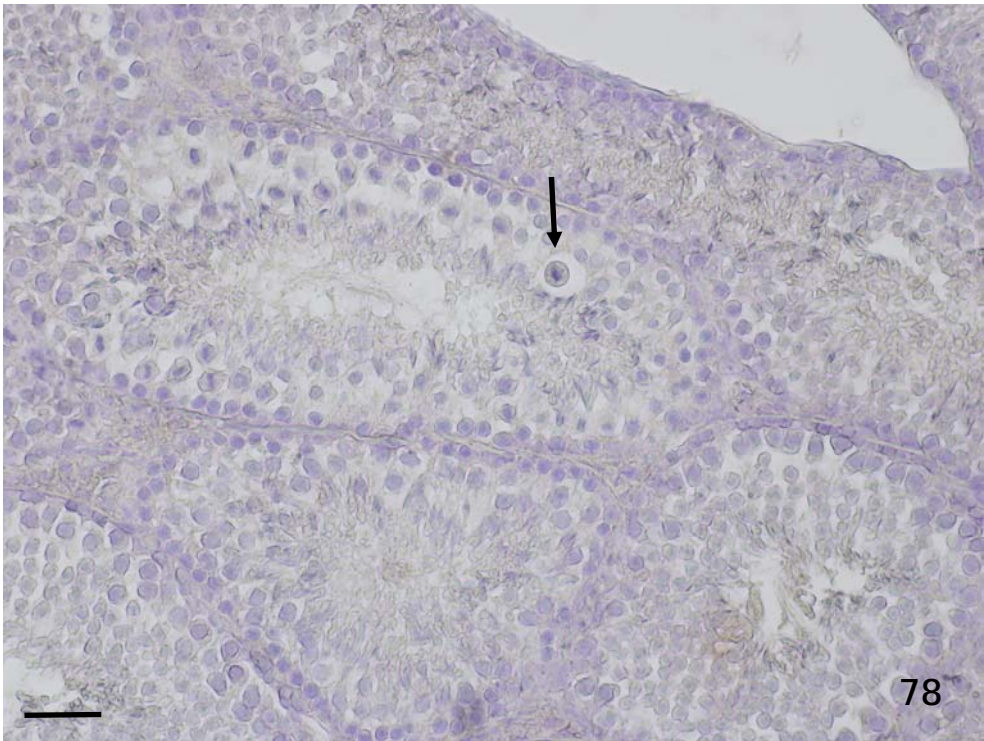
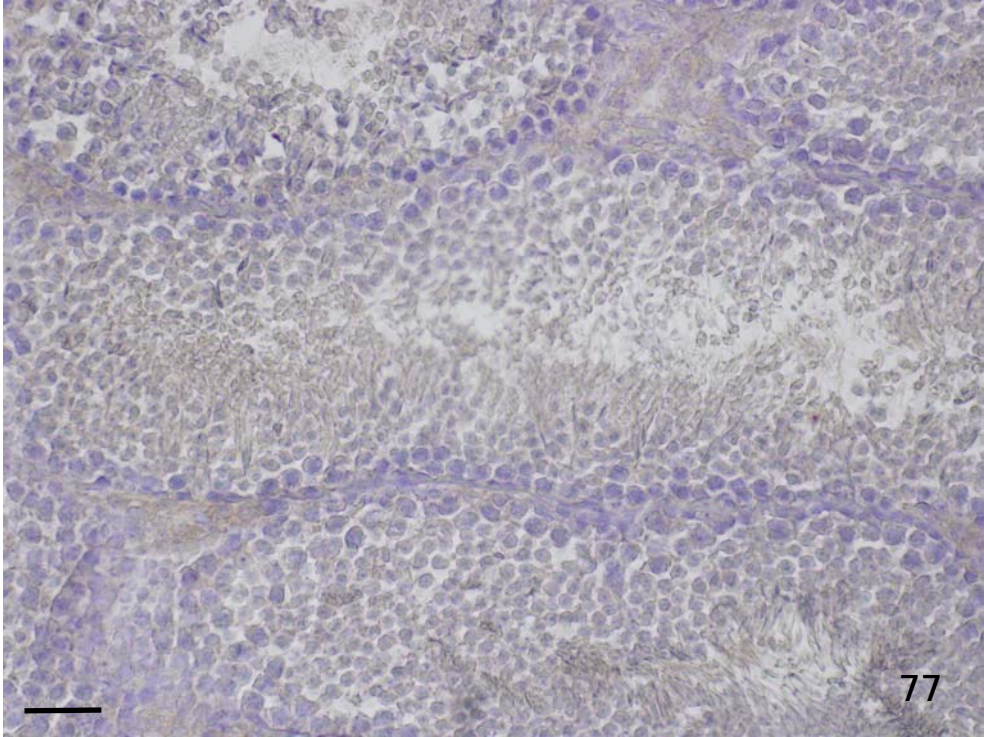
**Figuras 76 a 9. Micrografías mostrando el aspecto de la reacción a caspasa 3 activa en los túbulos los seminíferos de ratones wild type o knock out de 6 semanas de edad. La reacción a caspasa aparece en todos los casos en color marrón. El color azul se corresponde con el contraste con hematoxilina de Mayer.**

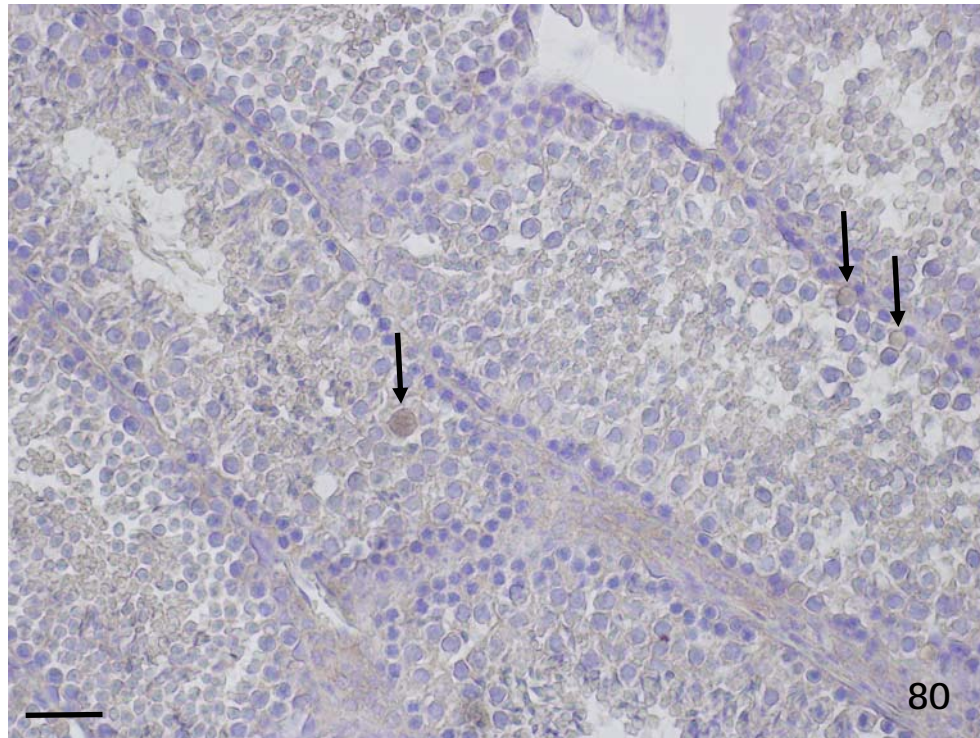
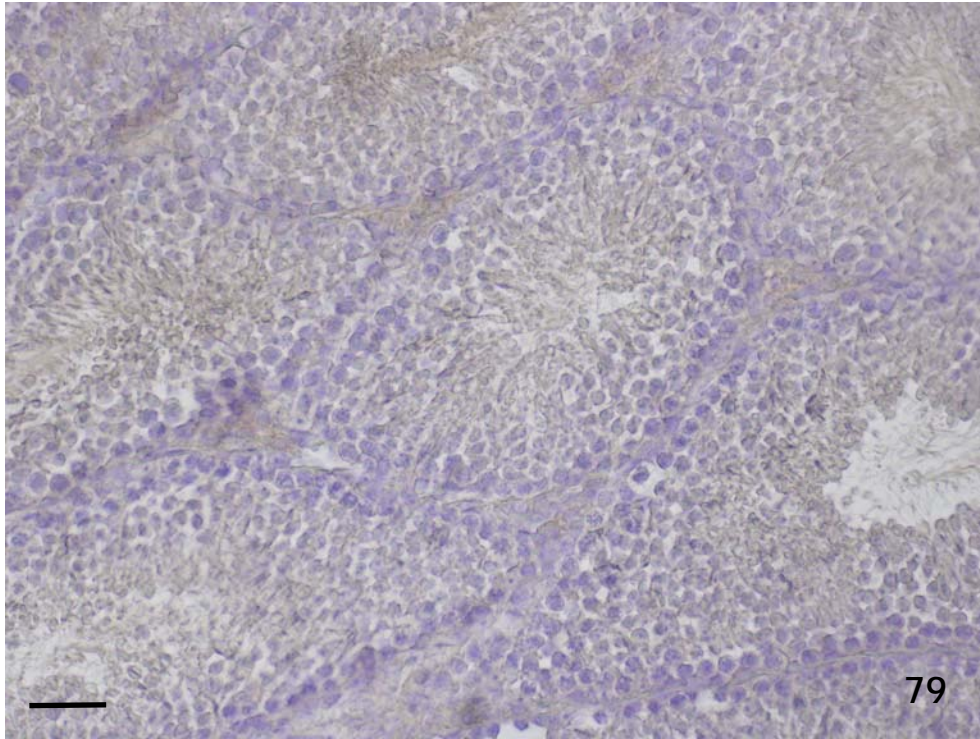
Barras:

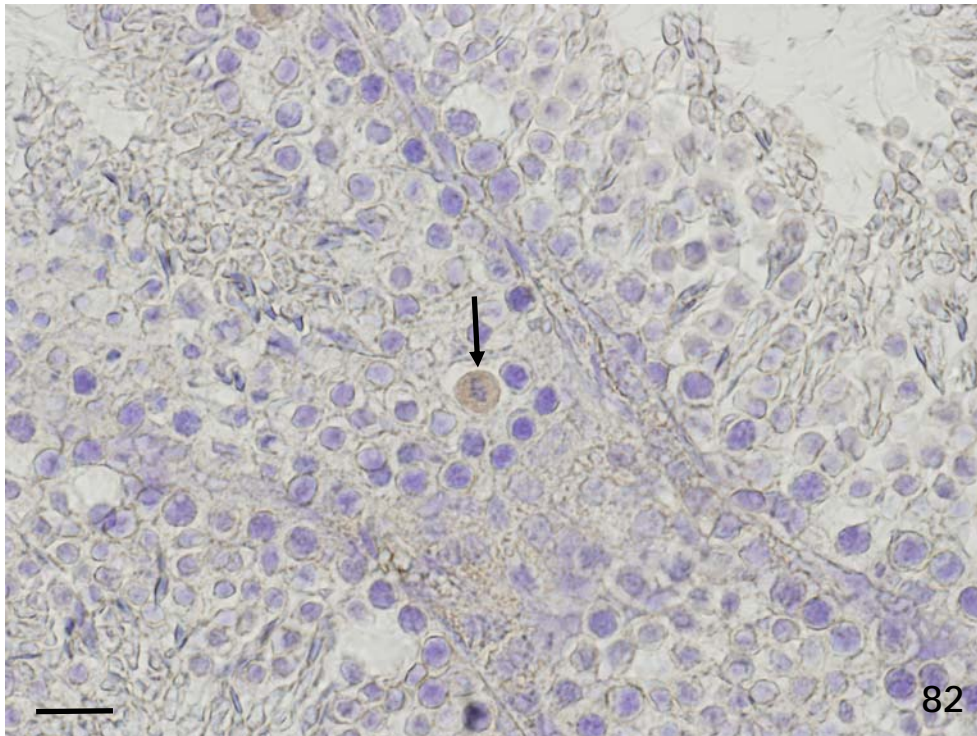
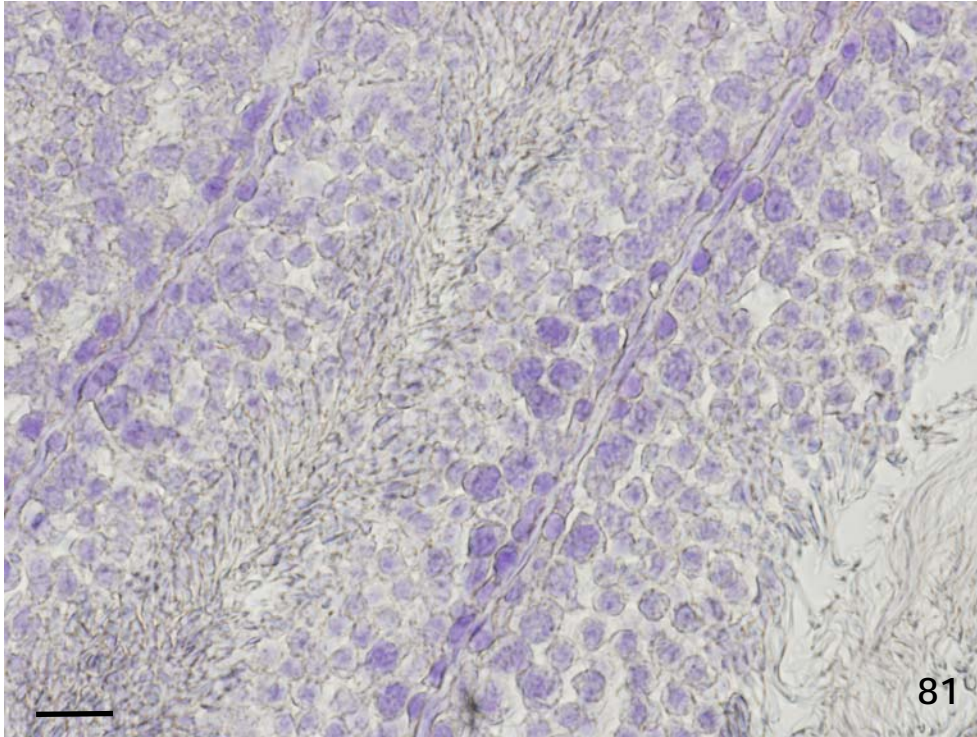
Figuras 77 a 80: 30  $\mu\text{m}$ ; Figuras 81 y 82: 15  $\mu\text{m}$ ; Figuras 83 y 84: 10  $\mu\text{m}$

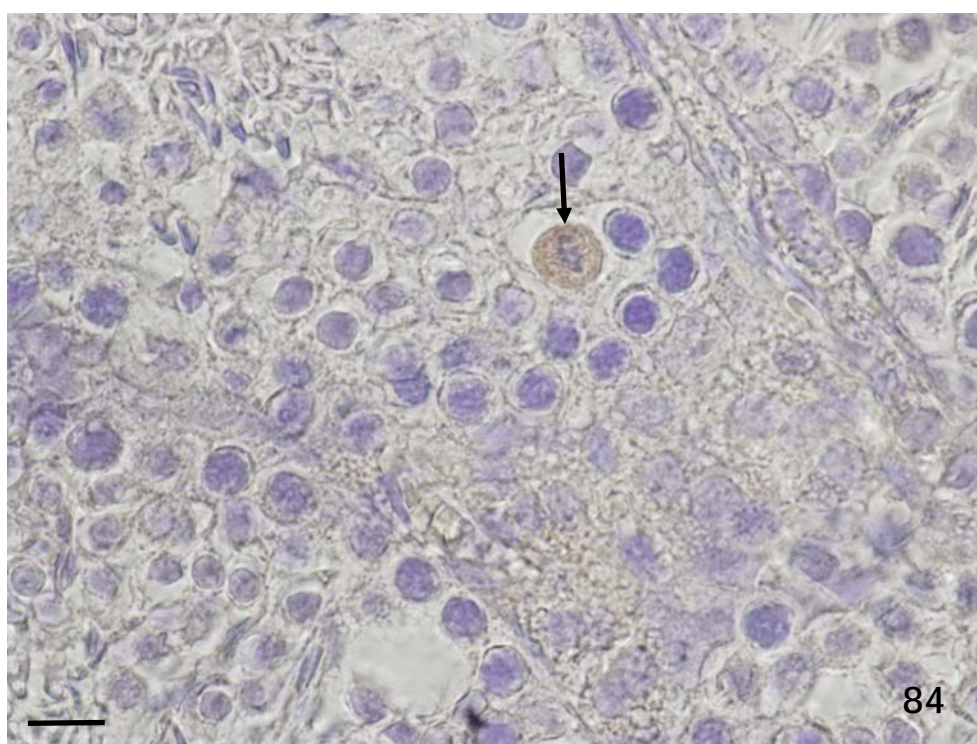
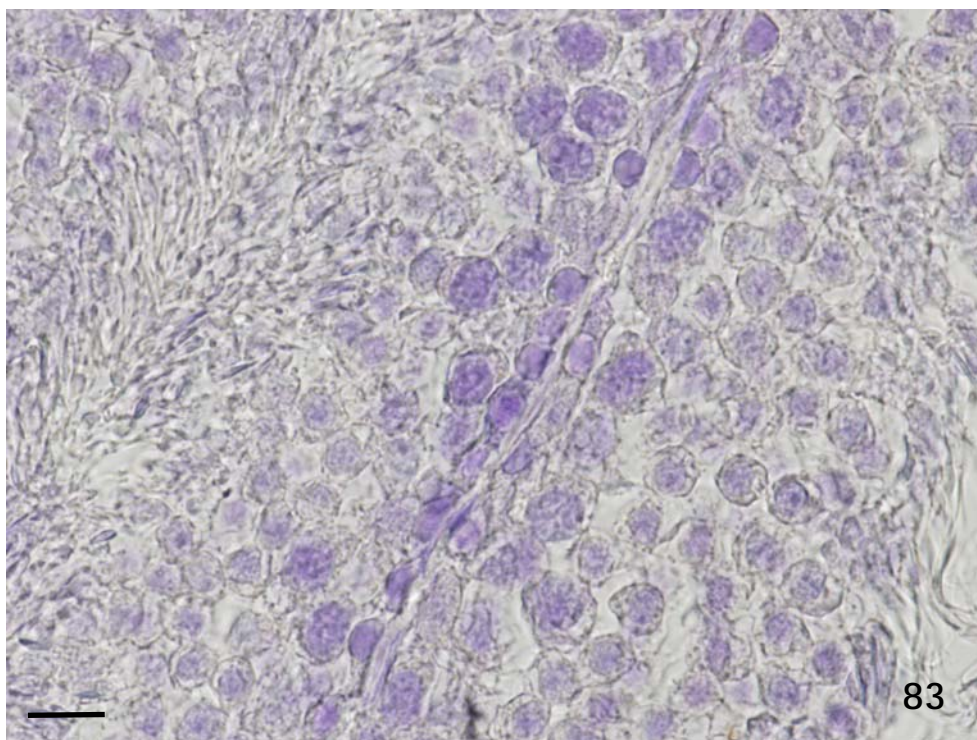
Figura 87: 30  $\mu\text{m}$ ; figuras 86,88 y 93: 15  $\mu\text{m}$ ; figuras 85, 89 a 92 y 94: 10  $\mu\text{m}$

En todos los casos las flechas señalan células positivas a caspasa 3 activa.

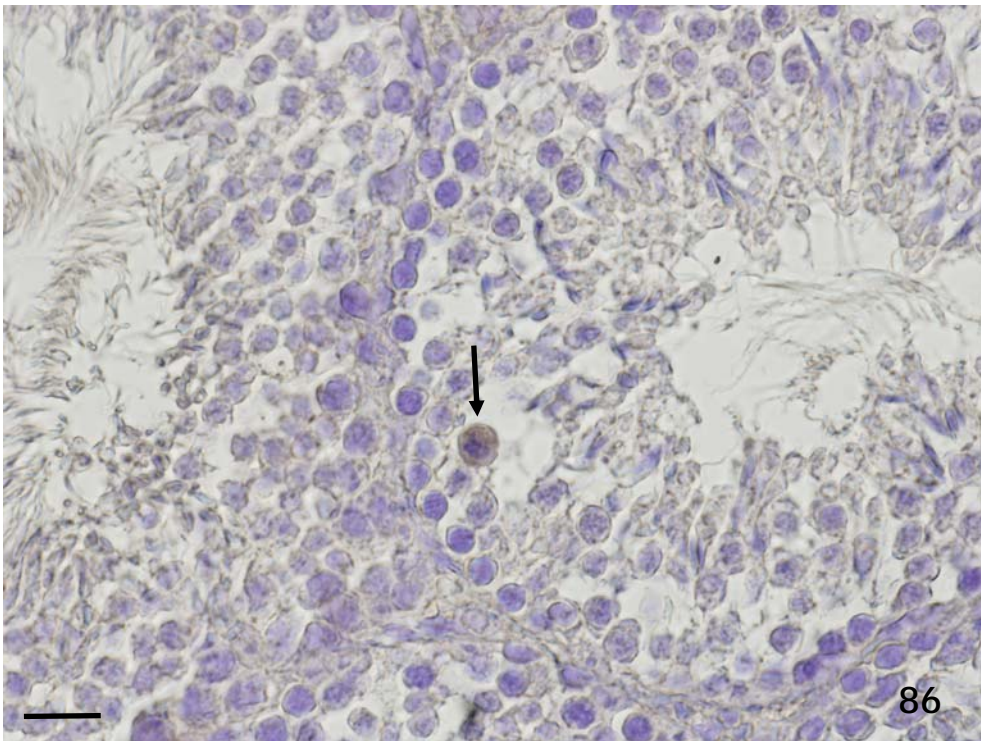
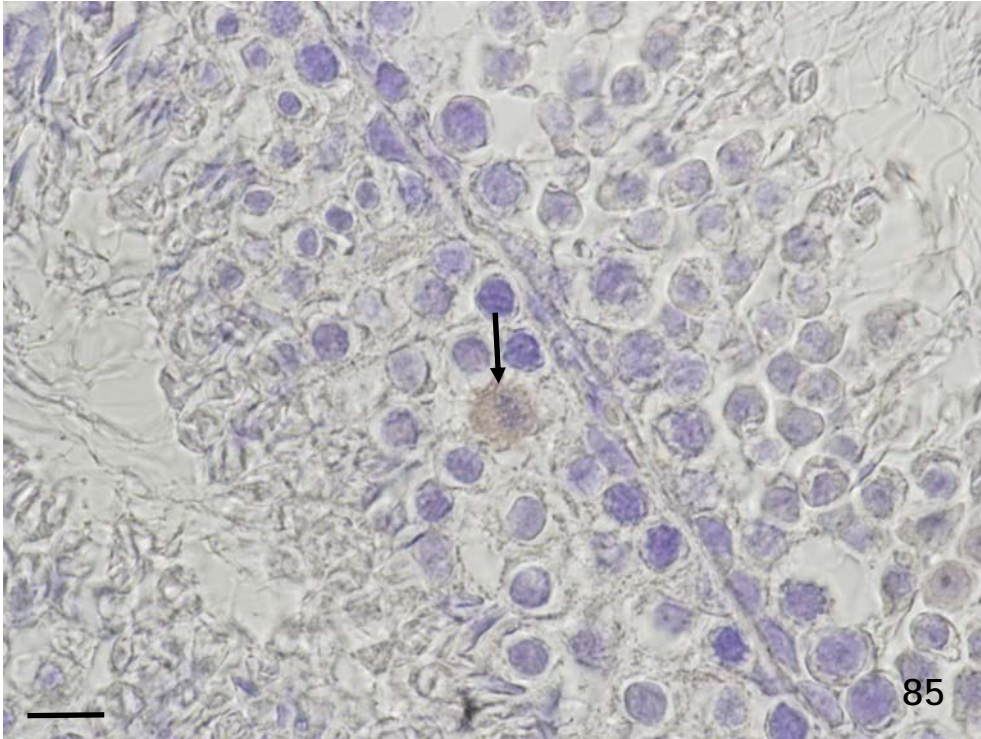


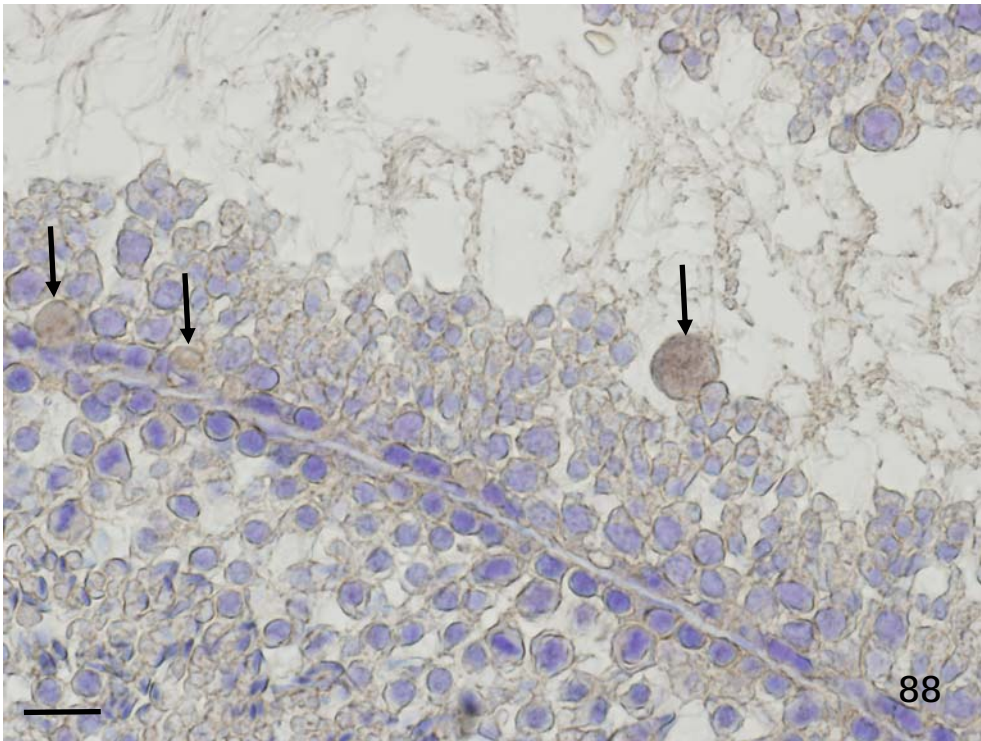
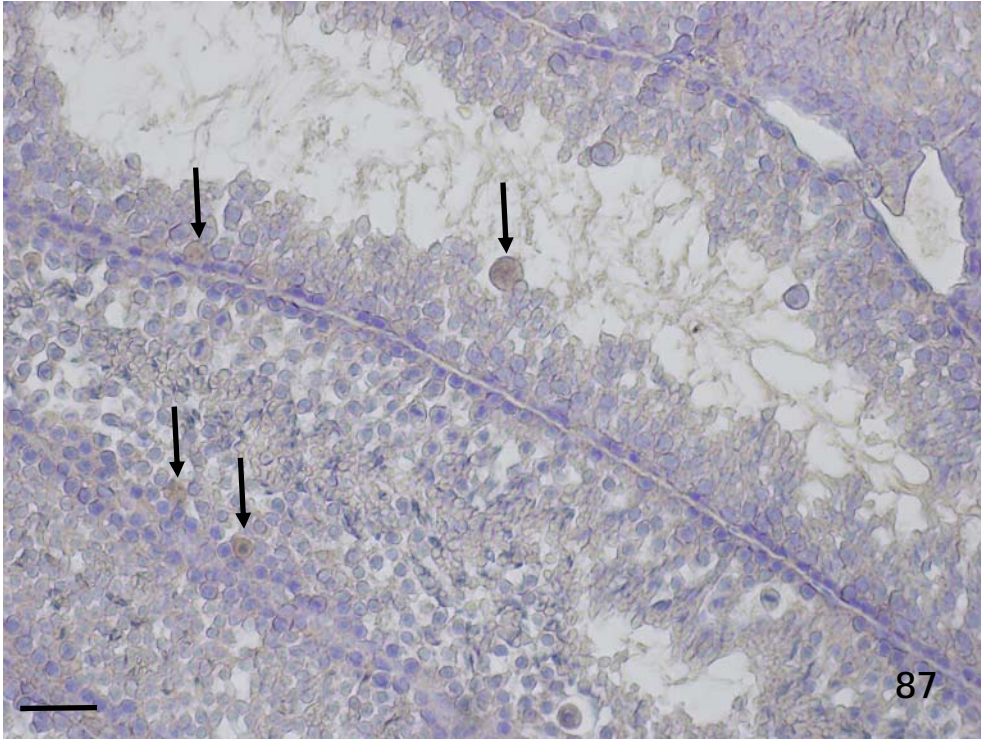


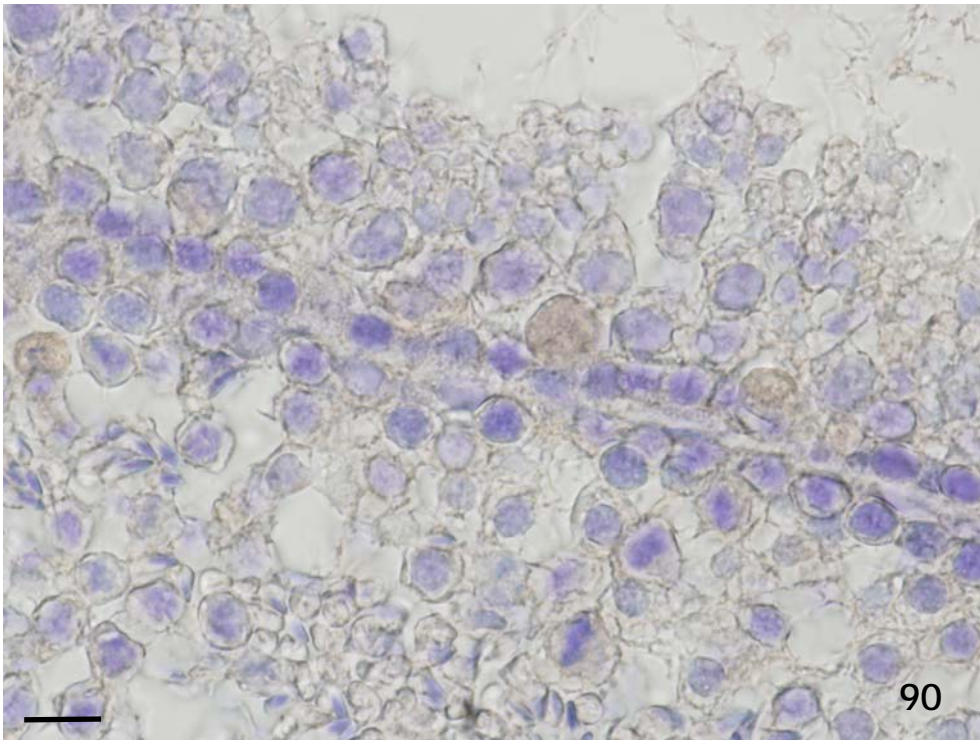
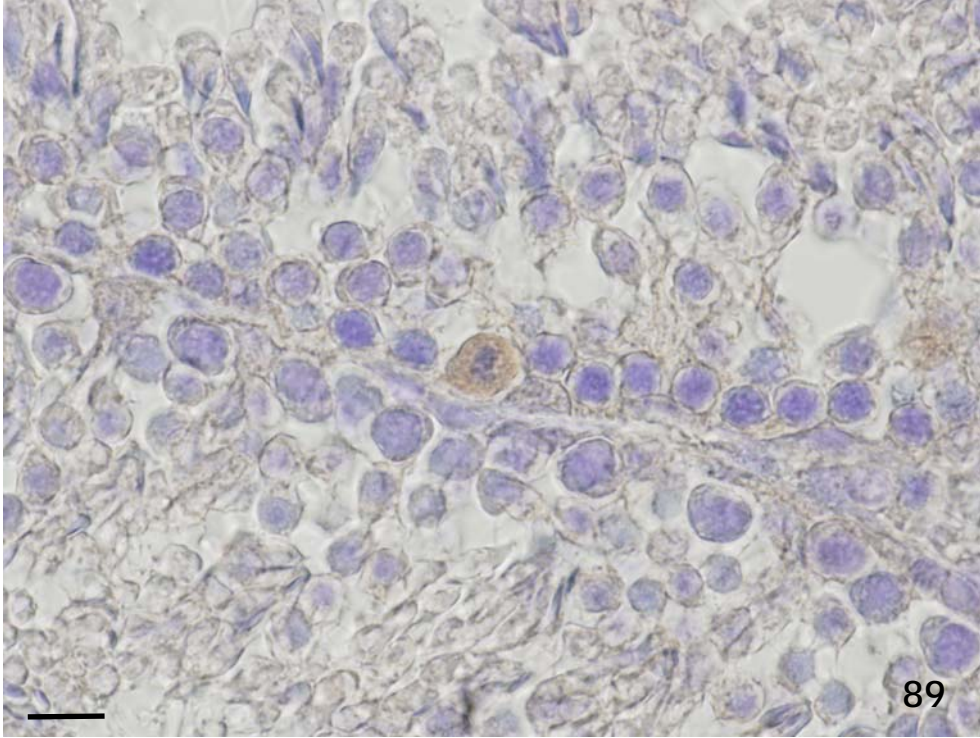


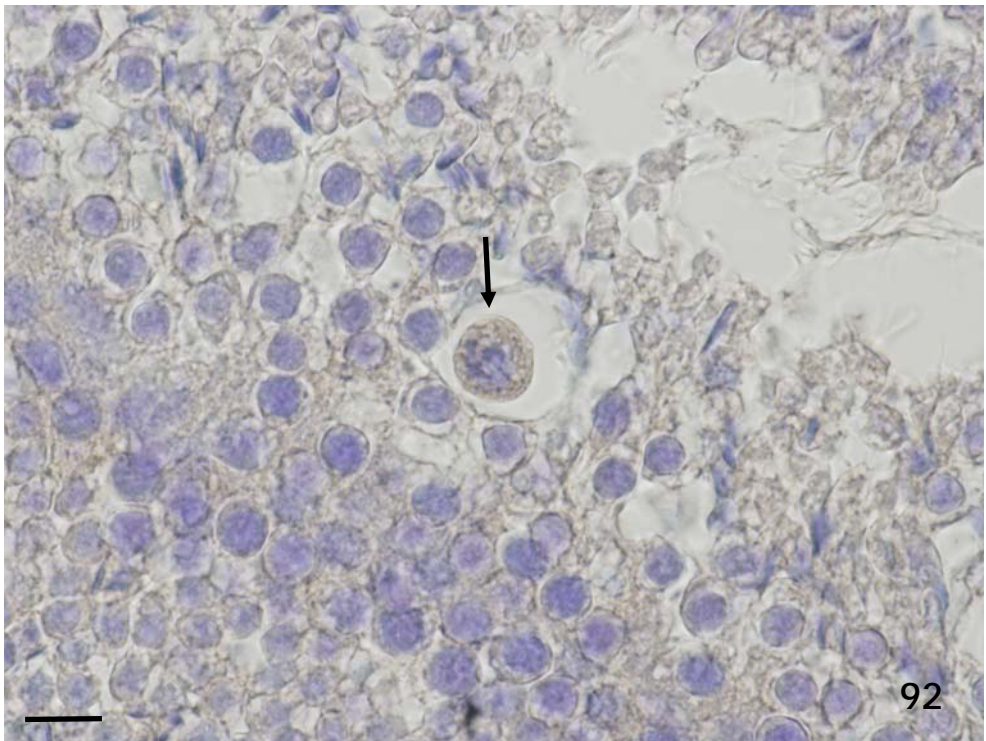
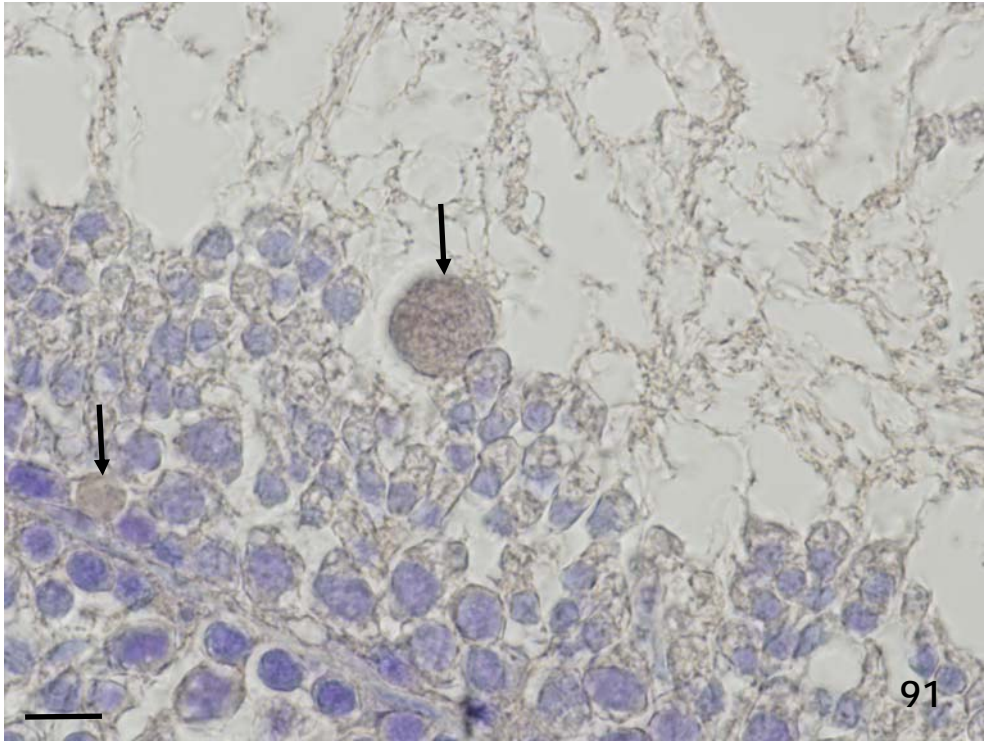


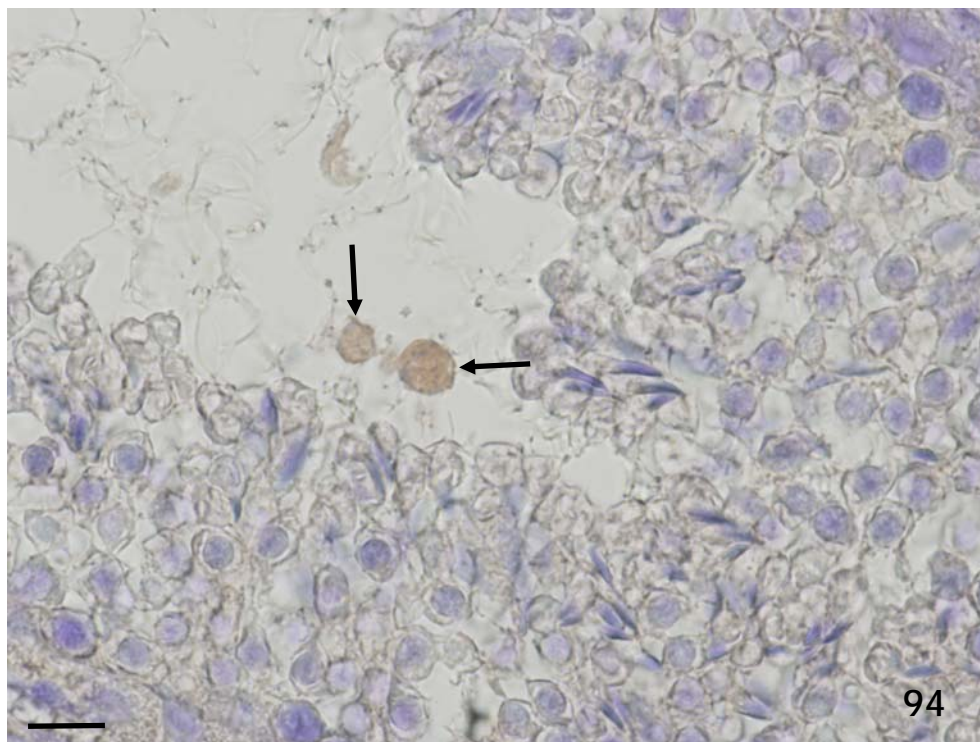
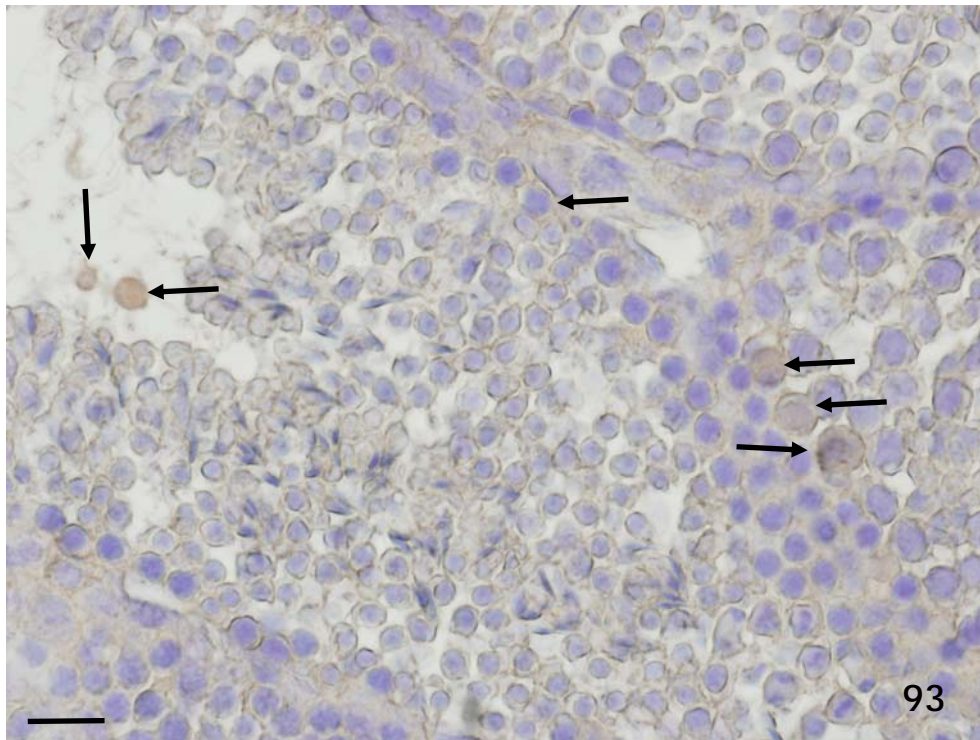














## Discusión





## **Comentarios sobre la Metodología empleada.**

Gran parte de los objetivos de esta Tesis Doctoral estaban dirigidos a comprobar si la deficiencia de la proteína de sustrato de receptor insulínico IRS2, dada la infertilidad de los animales, inducía cambios en la estructura del testículo.

En el estudio hemos utilizado técnicas inmunocitoquímicas para valorar la proliferación celular en el epitelio ductal, y morfométricas, para comprobar de manera objetiva los cambios habidos en los tubos seminí.

Por ello en esta discusión, comentaremos estas técnicas, para pasar a comentar después los resultados obtenidos.

### **Inmunocitoquímica.**

Mediante los métodos de la inmunocitoquímica in vivo o in vitro, se pueden caracterizar las células de la hipófisis anterior que contienen hormonas o péptidos.

Para nuestros estudios hemos utilizado el método de la Estrepto-Avidina Biotina Peroxidasa (Stav-Pox), considerada una técnica sándwich porque necesita de tres complejos de reacción para su realización.

La Stav-Pox es una variante del método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), más moderna y específica. Emplea un primer antisuero (procedente de ratón o conejo) contra el antígeno que se desea estudiar, semejante a la PAP pero normalmente de 5 a 10 veces más diluido; un segundo antisuero (obtenido generalmente de cabra o cerdo) anti-inmunoglobulina (fracción Fc) del primario y que lleva incorporado a su brazo largo varias moléculas de Biotina (proteína de alta afinidad por las inmunoglobulinas) y, finalmente, un complejo de Estrepto-Avidina conjugado con varias moléculas de peroxidasa, que se une a la Biotina (por la alta afinidad de la Estrepto-Avidina por la Biotina).

Para la conservación de la morfología y de la antigenicidad es fundamental el proceso de fijación. Las características de las reacciones inmunocitoquímicas después del empleo de fijadores diferentes han sido analizadas por muchos autores, como Nakane y col. (1989), Hall y col. (1990), Landerbg y Groos (1991), Golick y Rice (1992).

*En nuestro estudio hemos utilizado una solución fijadora ampliamente experimentada en nuestro laboratorio, el paraformaldehído al 4% en tampón fosfato, como demuestran gran número de publicaciones sobre el estudio inmunohistoquímico de la hipófisis, algunas de las cuales se recogen en este trabajo. Así comprobamos que, aún cuando la cantidad de hormona o péptido era pequeña, dicha solución se revelaba como un excelente fijador para el estudio inmunocitoquímico de las hormonas hipofisarias en el ratón.*

Los controles que hemos realizado están enmarcados dentro de los clásicamente descritos: test de dilución (Sternberger, 1979; Petrusz y col., 1976), test de sustitución de reactivos (Hutson y col., 1979; Forssmann y col., 1981) y, el más común de todos, el test de preabsorción (Hutson y col., 1979; Buffa y col., 1979; Forssmann y col., 1981).

*Al sustituir el suero anti-prolactina por tampón de ensayo y por suero normal de conejo, obtuvimos como resultado la abolición total del producto de reacción.*

*Realizamos controles de dilución tanto para obtener la concentración más adecuada del primer antisuero como para eliminar tinciones de fondo y otras reacciones; después de un meticuloso test de dilución comprobamos que la dilución óptima del suero específico fue de 1:300 para el anti-prolactina.*

*También hemos realizado preabsorción del suero primario con prolactina (Sigma®) a razón de 10nM/100 µl de suero diluido, y en todos los casos obtuvimos la abolición de la reacción.*

De esta manera, en nuestro laboratorio se han caracterizado, mediante su expresión inmunocitoquímica, las células productoras de varias hormonas hipofisarias (Carretero y col., 1989; 1990; 1992; Montero y col., 1990; Rubio y col., 1992; 1994; Sánchez y col., 1993) o productores de péptidos como GRF (Carretero y col., 1991), somatostatina (Gil, 1992) o VIP (Carretero y col., 1995b; 1997).

También se pueden detectar enzimas intracelulares mediante inmunohistoquímica, como hemos hecho en nuestro laboratorio con la aromatasa P450 (Carretero y col., 1999a, 1999b; 2003).

### **Empleo de PCNA como marcador de proliferación.**

En biología celular, es incuestionable que la proliferación celular constituye uno de los procesos biológicos más importante (Alberts y col., 1989); conforme a ella, las células pueden clasificarse en: estáticas, de renovación condicionada o de renovación continuada (Leblond, 1963).

Por ello, los estudios y métodos de valoración de la proliferación celular adquieren una gran importancia, al considerar los mecanismos reguladores de la actividad celular y los mecanismos histopatológicos involucrados, directa o indirectamente, en la génesis tumoral y fenómenos relacionados con la proliferación, fundamentalmente los de diferenciación funcional de la célula (Wright, 1984).

El proceso de proliferación celular y los fenómenos que acontecen en él, se conocen con el nombre de ciclo celular, en el que, a su vez, se diferencian desde los años cincuenta distintas fases (Howard y Pelc, 1951; 1953; Lajtha, 1963).

Dentro de un mismo tejido, las células no presentan un ciclo celular sincronizado, sino que unas células están fuera del ciclo celular y, otras que están dentro, se encuentran en distintas fases a lo largo del mismo. Por ello es fundamental considerar la fracción celular en proliferación (proliferation rate o growth fraction), que no es más que el cociente entre las células que están dentro y fuera del ciclo; dicho de otra manera, el cociente entre las células en proliferación y el total de células presentes en el tejido de una misma población celular (Mendelsohn, 1963).

El control molecular del proceso de la proliferación celular, se ha conservado de forma considerable a lo largo de la evolución para todos los eucariotes (Kacmarek, 1986; Dunphy y Newport, 1988; Lee y Nurse, 1988).

La expresión de distintos genes, reguladores del ciclo celular, trae como consecuencia la existencia o aparición a lo largo del ciclo de proteínas intranucleares, como la proteína cdc2, algunas histonas o las ciclinas (también conocidas como PCNA) (Schumperli, 1986; Lee y Nurse, 1987; Bravo y col., 1987; Prelich y col., 1987; Draetta y col., 1987; 1988; Draetta y Beach, 1988; Riabowol y col., 1989). Lo mismo ocurre para regular el

paro en el crecimiento de las células de mamíferos (Wang, 1985; Schneider y col., 1988).

Estas sustancias funcionalmente interrelacionadas que varían su cantidad o actividad a lo largo del ciclo, permitiendo o completando la división celular normal, pueden ser consideradas y empleadas como marcadores celulares, o mejor, como marcadores nucleares de la proliferación celular.

*En nuestro trabajo hemos optado por la determinación de la fracción celular en proliferación, mediante el marcador inmunocitoquímico del antígeno nuclear de proliferación celular, el PCNA.*

El PCNA es una ciclina, proteína auxiliar de las DNA polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$ , necesarias para la replicación del DNA. Se expresa a partir de la segunda mitad de la fase G1 del ciclo celular, su síntesis alcanza el máximo durante la fase S y comienza a declinar a partir de la fase G2, pudiéndose detectar durante la fase M o incluso después de la mitosis (Mathews y col., 1984; Tan y col., 1986; Prelich y Stillman, 1988). Estudios in vivo (Oishi y col., 1993) e in vitro (Carretero y col., 1995a) han demostrado que es un excelente marcador de la proliferación celular hipofisaria.

Los métodos basados en la incorporación de timidina o deoxiuridinas, bromo o yodo, son útiles para calcular las células que penetran en la fase S del ciclo, la duración de la misma o el efecto de inhibidores de la síntesis de DNA en tejidos normales o tumorales (Morstyn y col., 1986; Tanaka y col., 1990; Carbajo y Watanabe, 1990; Soriano y Del Rio, 1991; Carbajo y col., 1992; Arola y col., 1993).

Su principal inconveniente para la determinación de la fracción celular en proliferación consiste, en que dicha incorporación se mantiene en el DNA y, por tanto, persiste como marcador una vez que la célula ha abandonado el ciclo celular; además, no sirven para marcar las células que, dentro del ciclo, no alcanzan la fase S o ya la pasaron antes del periodo de incubación con el marcador, lo que hace que muchas células en proliferación no puedan ser detectadas y se detecten células que ya abandonaron el ciclo.

El empleo de algunos marcadores como la DNA polimerasa  $\alpha$  (Tanaka y col., 1982; Bensch y col., 1982; Namikawa y col., 1987; Wahl y col., 1989) o el antígeno KI 67, único de los hasta ahora empleados, que está presente en todas las fases del ciclo excepto la G0 (Gerdes y col., 1983; 1984; Sasaki y col., 1987; Veroni y col., 1988; Sahin y col., 1991), principalmente este último, suponen excelentes métodos para determinar la fracción celular en proliferación. Sin embargo, el KI 67 sólo es detectable en la especie humana y no en tejidos de roedores; además, presentan dificultades para su empleo en tejidos incluidos en parafina, como es el caso de parte de nuestro estudio (Kawakita y col., 1992).

El empleo del PCNA como marcador de la fracción celular en proliferación tiene algunos inconvenientes. La ciclina aparece en la segunda mitad de la fase G1, por lo que las células dentro del ciclo celular antes del punto de restricción no son detectables. Por el mismo motivo, tejidos con una cinética celular alterada, como la parada en fase S, son positivos de igual manera que si la cinética celular fuera normal (Wijsman y col., 1992).

Su larga vida media, de 20 horas in vitro (Bravo y col., 1987), puede ocasionar que todas las células de un tejido con alto turnover de crecimiento aparezcan positivas (Scott y col., 1991).

Aunque, aparentemente, esto sea una complicación del método. En la práctica, esta misma razón, permite diferenciar células que abandonaron el ciclo celular de aquellas que no lo hicieron: si tras la mitosis, al reconstituirse la membrana nuclear, la reacción a PCNA aparece de forma exclusiva en el citoplasma, se trata de un proceso de difusión tras la desintegración de dicha membrana en la mitosis. Este hecho es diferencial, ya que las células que no abandonaron el ciclo presentan reacción citoplásmica y nuclear. En la hipófisis de la rata, estos datos que fueron aportados in vivo por Oishi y col. (1993).

*En nuestro estudio, a excepción de alguna célula aislada, principalmente hemos encontrado reacción nuclear.*

El empleo de PCNA como marcador proliferativo, está avalado por numerosos estudios en tejidos normales o patológicos (Kurki y col., 1986; García y col., 1989; Levison y col., 1990; Hall y col., 1990; Landberg y Ross, 1991; Karamitopoulou y col., 1993).

El que la reacción a PCNA no sea homogénea y aparezcan núcleos intensamente reactivos frente a otros débilmente activos, está en consonancia con la dinámica y los niveles de la ciclina a lo largo de las distintas fases del ciclo celular (Mathews y col., 1984; Tan y col., 1986; Prelich y Stillman, 1988), coincidiendo plenamente con resultados obtenidos previamente en nuestro Departamento (Estevez, 1994; Vázquez-Perfecto, 1994; Carretero y col., 1995a).

Es obvio que para determinar la fracción celular en proliferación, es muy importante considerar el método para su cuantificación. Los métodos histológicos suelen manejar muchas menos células que la citometría de flujo. La cuantificación normal a través de microscopio, es un método seguro si analiza un número suficiente de células, aunque tiene el inconveniente de consumir mucho tiempo, tanto más cuanto mayor sea la población celular considerada (Barnard y col., 1987; Hall y col., 1988; Sheperd y col., 1988; Karamitopoulou y col., 1993). El mayor problema radica en dilucidar cuántas células es necesario contar. Distintos estudios tratan de valorar esta aproximación (Aherne y col., 1977, 1982; García y col., 1987); habiendo empleado métodos semi-cuantitativos (Gatter y col., 1986; García y col., 1989), así como el análisis de imagen (Shwartz y col., 1989).

*En nuestro caso, hemos optado por la cuantificación manual en campos de grandes aumentos para determinar la fracción proliferativa, estimando que 4000 células por animal tomadas aleatoriamente, fue un número suficiente para obtener resultados fiables estadísticamente.*

Como comprobaremos al comentar los efectos de los distintos tratamientos, el marcaje para PCNA ha permitido, claramente, comprobar los efectos que sobre la proliferación de las células del epitelio tubular tiene la carencia de la proteína de sustrato de receptor insulínico IRS2.

### **Empleo de la Caspasa 3 activa como marcador de apoptosis.**

El número de células en un organismo está determinado por los niveles de las inmigración celular, división celular y muerte celular (Raff, 1996). El fenómeno de la muerte celular se ha ido poniendo de manifiesto paulatina mente desde hace 165 años (Vogt, 1842; Kerr y col., 1972; Sulsto y Horvitz, 1997). La muerte celular en los organismos multicelulares está sujeta a control genético (Ellis y Horvitz, 1986; Vaux y col., 1988)

habiéndose demostrado que anomalías en la regulación de la muerte celular es causa de alteraciones como el cáncer (Strasser y col., 1990; McDonald y Korsmeyer, 1991) enfermedades autoinmunes (Strasser y col., 1991; Watanabe-Fukunaga y col., 1992) y posiblemente en alteraciones degenerativas (Barr y Tmei, 1994; Thompson, 1995).

La muerte celular programada o apoptosis es una propiedad común de todos los organismos multicelulares (Krammer, 2000; Daniel y Korsmeyer, 2004). El término fue acuñado por Currie y sus colaboradores (Kerr y col., 1972) para describir una determinada muerte celular observada en múltiples células y tejidos. Puede ser desencadenada por un gran número de factores, entre los que se incluyen, las radiaciones ultravioletas y radiaciones gamma, drogas utilizadas en la quimioterapia, factores de crecimiento o señales que provocan la muerte de receptores y sus ligandos (DRs), según Nagata, 1997; Ashkenazi y Dixit (1998) y Krammer (1998).

La apoptosis es un fenómeno fisiológico de muerte celular en el que se implican una gran variedad de rutas de señal intracelular, si bien estas rutas son tejido dependientes, variando de unas células a otras.

Básicamente hay cinco elementos clave en el proceso apoptótico.

Algunos receptores dispuestos en la superficie celular y cuya activación se asocia con la activación de las caspasas.

En los estadios tempranos de la apoptosis ocurren cambios en la superficie celular y la membrana plasmática.

Las caspasas constituyen una familia de proteasas intracelulares, formada por al menos 11 miembros en las células de los mamíferos, que juegan un papel clave en el inicio y el desarrollo de la apoptosis inducida por diferentes estímulos. Siempre, el papel central de la regulación y de la ejecución de la muerte celular por apoptosis pertenece a las caspasas (Cohen, 1997; Nicholson, 1999).

La muerte celular se acompaña siempre de alteraciones en la fisiología mitocondrial. Durante la apoptosis se altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial con lo que algunos activadores de proteasas específicas de la apoptosis se liberan al citosol desde la mitocondria. La liberación al citosol desde la mitocondria de citocromo C promueve la activación de las caspasas.

El cambio bioquímico intracelular más importante que acontece durante la apoptosis es la fragmentación de DNA genómico intranuclear, con carácter irreversible. En muchos casos es el resultado de la activación de una endonucleasa nuclear dependiente de  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ , que fragmenta el DNA actuando entre las unidades nucleosomales, lo que da lugar a fragmentos de DNA mono u oligonucleosomales.

Estos acontecimientos producen cambios celulares que son las dianas metodológicas usadas en el laboratorio para estudiar y detectar las células que entran en apoptosis.

Entre ellos está el análisis de la activación de la caspasa 3 mediante fluorimetría o inmunocitoquímica.

*Este último método es el que hemos utilizado en nuestro estudio y nos ha permitido detectar con éxito la existencia de fenómenos apoptóticos en el interior del tubo seminífero de los ratones knock out a IRS2.*

## **Morfometría y Planimetría.**

La segunda técnica empleada en este apartado, la aplicación de métodos cuantitativos morfométricos y estereológicos, intenta resolver el problema de la valoración morfológica subjetiva de la actividad celular. Estos métodos han evolucionado a lo largo de los años; en sus inicios, hace más de treinta años, se empleaban métodos manuales, pero en la actualidad, el empleo de los ordenadores y la digitalización de imágenes permite hacer análisis automáticos o semiautomáticos en los que el operador no interfiere en la medida.

Alrededor de 1850, el geólogo francés Delesse y el microscopista inglés Sorby enunciaron, independientemente, el principio de que el promedio de un área fraccional de un tipo particular de componente, en una sección tomada de un cuerpo sólido, es directamente proporcional a la fracción de volumen de ese componente dentro del cuerpo sólido original (Delesse, 1847; Sorby, 1856).

Estos autores llegaron a esta conclusión por un proceso intuitivo, pero los esfuerzos de expertos en geometría integral y probabilidad han demostrado en varias ocasiones la validez del principio de Delesse (Crofton, 1877; Delthiel, 1926; Bonnesen y Fenchel, 1934; Santalo, 1936; Blaschke, 1949).

Mayhew y Cruz (1973) transformaron el principio de Delesse mediante la consideración de un modelo de esfera concéntrica (toscamente similar a una célula) y consiguieron formulaciones bastante claras de esta relación.

Otros autores también han dejado claro que las ecuaciones usadas en estereología son mera manifestación de un área mucho más amplia de las matemáticas, que se ha denominado geometría multidimensional (Miles, 1972) o simplemente probabilidad geométrica (Little, 1974).

La estereología, término acuñado por la Sociedad Internacional de Estereología (ISA) en 1961, está basada en la probabilidad geométrica y permite la evaluación de estructuras tridimensionales por extrapolación de mediciones realizadas en secciones bidimensionales, tras la aplicación de medidas llevadas a cabo en secciones bidimensionales y axiomas estereológicos, consiguiendo la medida de volumen, superficie y número de tejidos y componentes celulares con microscopía óptica o electrónica (Rohr y col., 1978).

Los métodos estereológicos son aquéllos que se usan para derivar información tridimensional a partir de la consideración de imágenes bidimensionales. En sentido amplio, esto incluirá métodos de reconstrucción tridimensional usando secciones seriadas así como métodos cuantitativos extrapolables tratados con determinaciones numéricas. Este último concepto ha sido denominado estereología cuantitativa (Underwood, 1970).

Existen bastantes revisiones y artículos que han tratado más a fondo estos temas y, entre ellos, destacamos los de Loud y col. (1965), Weibel y col. (1966), Weibel (1969), Elias y col., (1971), Weibel y Bolender (1973) y Elias y Hide (1980).

Los parámetros abiertos a estudio por los métodos estereológicos incluyen: volúmenes y áreas de superficie de componentes fraccionarios, volúmenes medios, áreas de superficie medias y densidad numérica de diferentes partículas o células dentro de un tejido, así como el tamaño y número de las mismas. Estos volúmenes, áreas, números y

tamaños pueden ser estimados a partir de células o tejidos, o bien a partir de porciones de los mismos.

En estereología estricta, los valores para un componente dado son expresados como densidades que relacionan su volumen, superficie o número, con la unidad de volumen de una superficie de referencia dada. En morfometría simple, los valores se expresan como la media aritmética de una población de valores que resulta de tratar estadísticamente las áreas o números referidos a áreas o a poblaciones totales de un parámetro concreto.

Los efectos de tratamientos experimentales sobre la estructura celular y el curso a lo largo del tiempo de distintos eventos morfológicos, pueden ser constatados de forma precisa por medio del volumen, superficie o número de células o de sus organelas. Con ello se evitan en gran medida los aspectos subjetivos y se pueden obtener datos cuantitativos fiables y comparables. Por ello, los métodos estereológicos y morfométricos representan un avance importante en la microanatomía y en la investigación básica morfológica en neuroendocrinología.

*En nuestro laboratorio, han sido empleados en numerosas ocasiones técnicas y métodos estereológicos o morfométricos para el estudio de la hipófisis con gran eficacia y precisión, determinando el área celular y el área nuclear de forma semejante a como se ha realizado en este trabajo.*

Es obvio que, para determinar la fracción celular en un tejido (porcentaje de células inmunopositivas y densidad numérica, en nuestro caso) es muy importante considerar el método empleado para su cuantificación. Los métodos histológicos suelen manejar muchas menos células que la citometría de flujo.

La cuantificación normal a través de microscopio es un método seguro si analiza un número suficiente de células, aunque tiene el inconveniente de consumir mucho tiempo, tanto más cuanto mayor sea la población celular considerada (Barnard y col., 1987; Sheperd y col., 1988; Karamitopoulou y col., 1993).

El mayor problema radica en dilucidar cuántas células es necesario contar. Distintos estudios tratan de valorar esta aproximación (Aherne y col., 1977, 1982; García y col., 1987); habiendo empleado métodos semicuantitativos (Gatter y col., 1986; García y col., 1989), así como el análisis de imagen (Schwartz y col., 1989).

*En nuestro caso, hemos optado por la cuantificación manual en campos de grandes aumentos para determinar la fracción positiva a prolactina, estimando que 4000 células por región de las hipófisis, elegidas aleatoriamente, fue un número suficiente para obtener resultados fiables estadísticamente.*

*Como comprobaremos al comentar los efectos de los distintos grupos de estudio, el marcaje inmunocitoquímico ha permitido comprobar claramente los efectos sobre las células hipofisarias que tienen las situaciones experimentales en nuestro estudio.*

## **Los ratones knock out para la IRS2.**

Un detalle importante, dentro del diseño experimental, es el modelo animal que hemos empleado y su aceptación y validación internacional como animal de experimentación.

*Para entender la validación del modelo y su elección para la realización de este estudio, en este capítulo de discusión, incluimos los hallazgos bibliográficos que relacionan en la literatura a la aromatasa con la regulación de la prolactina y, por tanto, de las células hipofisarias que la producen.*

El empleo de animales transgénicos, principalmente ratones, han sido y están siendo empleados para el estudio de los cambios patológicos de la enfermedad de Alzheimer; sin embargo, hasta ahora, la mayoría de los animales empelados tienen modificada la expresión regulable de Tau (Mocaun y col., 2008) o son animales que hiperexpresan b-amiloide.

En nuestro estudio empleamos un modelo diferente en el que no se induce la aparición artificial de la enfermedad de Alzheimer, sino que ésta acontece como consecuencia de un proceso endocrino-metabólico, parcialmente ligado a la edad como es la diabetes tipo II.

*Los hallazgos que acabamos de detallar ponen de manifiesto que el modelo experimental empleado en nuestro estudio es un modelo aceptado y validado para el estudio de la hipófisis reproductora y, en particular, para el estudio de las células hipofisarias productoras LH.*

*Siendo éste el primer estudio realizado sobre los cambios que acontecen en este tipo celular hipofisario ante la ausencia total de estrógenos por no producirse la aromatasa P450. Lo que le da una gran importancia en la investigación traslacional y otorga el carácter de originalidad que debe aportar todo trabajo de Tesis Doctoral.*

## **Comentarios en relación con los resultados obtenidos**

### **IRS2 y testículo.**

Previo a cualquier comentario sobre los resultados obtenidos después de estudiar los testículos de ratones knock out a IRS2 y compararlos con los de los ratones wild type es preciso decir que mediante western blotting se ha demostrado la presencia de IRS2 en dicha glándula en humanos (Kokk y col., 2005) y en la rata (Kokk y col., 2007; D’Cruz y col., 2012) en la que se expresaba en las células de Sertoli, en las de Leydig, las espermatogonias y los espermatoцитos tempranos, y que IRS2 está implicada en el desarrollo normal del testículo (Griffeth y col., 2013).

### **Cambios morfológicos y morfométricos.**

La deficiencia de IRS2 provoca diabetes e infertilidad femenina, las evidencias clínicas sugieren que la diabetes y la obesidad disminuyen la fertilidad masculina; hasta hace



poco tiempo no se sabía que IRS2 podría ser un elemento clave en la reproducción masculina.

Grifeth y colaboradores (2013) demostraron que IRS2 juega un papel crítico en el desarrollo testicular, potencialmente mediado por IGF1 (Castilla-Cortazar y col., 2015), o por acción de la insulina sobre receptores IGF (Escott y col., 2014; revisado en Griffeth y col., 2014) implicando la ruta de la PI3K/Akt (Escott y col., 2013), durante el desarrollo embrionario y postnatal sin que dichas alteraciones estuvieran ligadas a hiperglucemias.

*Las variaciones observadas en nuestro estudio sugieren que en los ratones Knock out a IRS2 va aconteciendo un fenómeno de agotamiento en los túbulos seminíferos ya que las alteraciones de la morfología ductal a las seis semanas de edad son básicamente morfométricas y que en ese proceso parece tener gran relevancia la desaparición de la proliferación celular y un aumento de la muerte celular por apoptosis.*

*Más tarde, a las 12 semanas de edad esos cambios son ya muy manifiestos con imágenes que sugieren que acontece una atrofia testicular.*

La atrofia testicular puede deberse a múltiples causas, desde causas puramente mecánicas como la torsión testicular hasta causas de origen genético, pasando por la acción tóxica de iones o productos sintéticos.

*Recientemente se ha comprobado que la sobre-expresión de GH induce cambios testiculares, vacuolización en el epitelio seminífero previo a la atrofia testicular (Piotrowska y col., 2015), semejantes a los observados por nosotros en los ratones knock out para IRS2 a las 6 semanas de edad. Dado que IGF1 es un efector final de la actuación de la hormona GH, no es descabellado pensar que la ausencia de IRS2 efector intracelular de IGF1 pudiera afectar de alguna manera a la secreción de GH o a sus mecanismos de acción, por lo que el hecho de que los efectos de la ausencia de IRS2 sobre el testículo pudieran estar mediados en parte por un actuación mayor de GH no puede ser descartado.*

*En casi todos los casos de atrofia testicular descritos en la literatura, acontece un proceso secuencial cuyos sucesos se asemejan mucho a los observados por nosotros en los ratones knock out a IRS2 y que afectan de forma primordial a las células germinales y su progresión, con repercusión final en la cantidad de espermatozoides en la red testicular y el epidídimo proximal.*

La privación de vitamina A afecta a la progresión de la espermatogénesis y a la formación inicial de la barrera hemato-testicular derivando en una degeneración irreversible del testículo (Chihara y col., 2013).

Atrofias testiculares que recuerdan morfológicamente a las observadas por nosotros en los animales de 12 semanas de edad han sido descritas tras la vasectomía (Duru y col., 2013).

Agentes quimioterápicos (Hou y col., 2014) y productos químicos de uso industrial como derivados del falato, conocido como DBP (Bao y col., 2011), o el óxido de titanio (Orazizadeh y col., 2014) inducen toxicidad testicular y alteran proteínas implicadas en la espermatogénesis, probablemente por inducir un aumento de radicales libres oxidantes (Hefnawy y Ramadan, 2013).

Los vapores de formol también tienen efectos adversos sobre la fertilidad masculina del ratón. Los vapores de formol destruyen la estructura testicular induciendo la atrofia de los túbulos, aumento del espacio entre las células germinales con lo que se desfigura el aspecto columnar (Vosoughi y col., 2011).

*Estos signos son muy parecidos a los encontrados por nosotros en los ratones knock out de IRS2 a las 12 semanas de edad. Además, la degeneración tubular se acompaña de cambios morfométricos que afectan a los túbulos semejantes a los observados en nuestro estudio.*

*La atrofia testicular por toxicidad se ha relacionado principalmente con la producción de radicales libres. Aunque este podría ser un posible mecanismo implicado en la atrofia por ausencia de IRS2, no podemos confirmar o rechazar esta teoría dado que nuestro estudio no nos permite corroborar un aumento de radicales libres oxidantes.*

La hipoxia inducida por vasoconstricción produce atrofia testicular disminuyendo la proliferación celular, estos efectos son sólo parcialmente recuperables por la acción de IGF1 (Díez-Caballero y col., 2006).

Diversos genes como el gen NR5A1 codificador del factor esteroideogénico 1 están implicados en el funcionamiento normal del epitelio germinal de los túbulos seminíferos y su alteración produce atrofia testicular (Röpke y col., 2013).

Uno de los fallos genéticos que podrían estar implicados en la infertilidad masculina es la ausencia de Foxa3 que actúa como factor transcripcional en las células germinales (Behr y col., 2007).

*La ausencia de Fox3 da lugar a disminución de la proliferación, aumento de la apoptosis y degeneración testicular progresiva de manera que el proceso empieza en algunos túbulos y se va extendiendo hasta generalizarse. De igual manera que va aconteciendo en los ratones knock out a IRS2 de nuestro estudio.*

El primer hallazgo del proceso es un adelgazamiento del epitelio tubular que disminuye en su altura. El proceso concluye con la aparición de túbulos con una pérdida selectiva de células germinales, sin grandes alteraciones de las células de Sertoli (Behr y col., 2007).

*Como hemos descrito en el capítulo de resultados, en nuestro estudio los testículos de los ratones knock out para IRS2 presentaban túbulos con diferentes características predominando tres de ellas: túbulos de apariencia normal con una altura epitelial y un diámetro y superficie tubular disminuido, túbulos aberrantes y túbulos desprovistos de células germinales. En un proceso semejante al descrito para los knock out y heterocigotos de Foxa3.*

Foxa3 está relacionado con el metabolismo y regula la diferenciación de los adipocitos y el depósito selectivo de tejido graso (Xu y col. 2013) y se asocia con diferentes rasgos o fenotipos metabólicos (Adier-Wailes y col., 2015). Los foxa se relacionan con la dieta hipercalórica y quizás con la obesidad, la diabetes tipo 2 y las células pancreáticas y el glucagón (Plengvidhya y col., 1999; Liu y col., 2002; Ma y col., 2014, 2015).

Foxa2 puede ser inhibida por la insulina a través de las rutas de IRS1 e IRS2 y estar implicada en la actividad sobre los ácidos grasos, a la vez que la expresión de IRS2 y la re-

regulación de diversos genes entre los que se encuentra Foxa3 podría explicar los efectos de algunos antidiabéticos sobre la diabetes tipo 2 (Li y col., 2006).

*Aunque no se ha estudiado la relación íntima entre Foxa3 e IRS2 en el testículo, la coincidencia en los cambios testiculares observados en los knock out de IRS2 y en los de Foxa3 podría sugerir que ambas rutas estuvieran relacionadas en la espermatogénesis.*

Uno de los mecanismos por los que también puede aparecer hipotrofia de las células epiteliales del epidídimo proximal e incluso azoospermia obstructiva es la inactivación de los genes de receptor androgénico (Krutiskikh y col., 2011).

*Aunque hasta la fecha no hay estudios que correlacionen NF2 o Pin1 con IRS2 en el testículo, los datos recogidos en la literatura en relación con la regulación metabólica sugieren que cabe la posibilidad de que exista algún tipo de relación.*

Otra causa de atrofia testicular y vaciado epididimario es la ausencia de las dos isoformas de Merlin1 y 2, supresores tumorales relacionados con NF2 (Zoch y col., 2015), sin que hasta el momento se conozca ninguna relación entre NF2 o las isoformas 1 y 2 de merlin con las proteínas IRS.

Pin1 ha sido asociado al mantenimiento de la función testicular, entre otros órganos, de manera que su pérdida induce la aparición de atrofia testicular. Pin1 se ha asociado con las proteínas IRS en el tejido adiposo y la obesidad (Liou y col., 2002).

*La mayoría de los estudios que analizan proliferación en los túbulos seminíferos y que se contemplan a continuación se han realizado determinando PCNA como marcador de proliferación lo que valida de forma importante el empleo de este marcador para nuestro estudio.*

### **Insulina, receptor de insulina, IRS, proliferación y apoptosis.**

Un desarrollo correcto de la regulación de la muerte celular postnatal por apoptosis de las células germinales es un componente esencial en el desarrollo y homeostasis de la gónada. En la regulación de esta apoptosis se han implicado a importantes vías reguladoras y sistemas de señalización (Richbourg y Boekelheide, 1996; Richburg y col., 1999; Lee y col., 1999; Giammona y col., 2002; Chandrasekaran y Richburg, 2005; Rasoulpour y Boekelheide, 2005; Rasoulpour y col., 2006).

IGF1 o IGF2 a través de la activación de receptor juegan un importante papel como factores antiapoptóticos de las células de Leydig en el desarrollo postnatal de la rata (Colón y col., 2007), el caballo (Yoon y Roser, 2010) y en el humano (Berensztein y col., 2008). También podría estar implicados en la proliferación de las células de Sertoli y el tamaño testicular (Pitetti y col., 2013).

La insulina y los factores de crecimiento insulínico presentan efectos antiapoptóticos a través de una compleja red de vías de señal intracelulares (Virkamäki y col., 1999). Además están implicados en la actuación de las hormonas gonadotropas, así las vías de señal de insulina /IGF están implicadas en los efectos proliferativos sobre las células testiculares inmaduras de la FSH (Pitetti y col., 2013).

Los factores de crecimiento insulínicos, conocidos como IGF están implicados en el estímulo de la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis. Desde hace veinte

años se sabe que IGF1 es un factor de supervivencia para muchos tipos de células (Neuenschwander y col., 1996; Zhang y col., 1997; Ellouk-Achard y col., 1998; Hirschberg y Ding, 1998; Werther y col., 1998; Leri y col., 1999; Nickerson y Huynh, 1999; Farrell y col., 1999; Moorehead y col., 2001; Gilmore y col., 2002), inhibiendo la apoptosis. La unión de IGF1 a su receptor provoca alteraciones moleculares intracelulares entre las que se encuentran las proteínas de sustrato de receptor insulínico –IRS- (White, 1998). Los efectos antiapoptóticos de IGF2 se correlacionan con la fosforilación prolongada de Akt/PKB (Moorehead y col., 2001).

Los efectos biológicos de IGF1 y de insulina se desarrollan a través de la activación de sus receptores de superficie que resulta en la fosforilación de algunas IRSs que tras ello interactúan con proteínas que contienen el dominio SH2 como la PI3K, Grb2 o SHP2. Junto a efectos sobre la proliferación o la apoptosis, hay datos que sugieren que IGF1 podría facilitar la esteroidogénesis en las células de Leydig, involucrando a las ruta de señales ERK1/2 (Qu y col., 2012).

Como era de esperar, se ha descrito la presencia de receptores de insulina y/o IGF en espermatogonias, espermatoцитos y células de Leydig (Yoon y col., 2011).

Se han propuesto muchos mecanismos a través de los cuales IGF1 e insulina podrían proteger a las células de la apoptosis como son la vía PI3K/Akt (Minshall y col., 1999; Parrizas y col., 1997; Kulik y col., 1997), la ruta Ras/MAPK (Parrizas y col., 1997), o la participación de la quinasa Jun N-terminal (Krause y col., 2001) y p38MAPK (Heron-Milhavet y col., 2001).

En la literatura hay ciertas controversias sobre que IRS está implicada en la inhibición de la apoptosis, para algunos autores sería IRS1 (Tseng y col., 2002), otros autores han implicado a IRS2 (Valverde y col., 2004; Yi y col., 2005), implicando a IRS2 y excluyendo a IRS1 (Kim y Feldman, 2009) y implicando a ambos (Stör and col., 2011).

Siendo lo más probable que ambas IRS estén implicadas y quizás de una forma tejido-dependiente. Las proteínas IRS pueden jugar papeles diferentes en los efectos antiapoptóticos IGF1 e insulina, posiblemente a través de mecanismos dependientes de caspasa 3, CREB y FKHR (Tseng y col., 2002).

La activación de PI3K induce la activación de su efector Akt a través del que estimula respuestas que van desde el metabolismo de la glucosa a la proliferación o la inhibición de la apoptosis celular. La asociación de las proteínas IRS con Grb2 conduce al reclutamiento de SOS y Ras con lo que se activa la vía MAPK, un vía reguladora principal de la expresión génica (Virkamäki y col., 1999).

### **Señalización a través de PI3K / Akt.**

La activación de PI3K induce la activación de su efector Akt a través del que estimula respuestas que van desde el metabolismo de la glucosa a la proliferación o la inhibición de la apoptosis celular.

Akt1 es considerada como la isoforma de PKB más importante en la regulación del crecimiento y el desarrollo y está muy implicada en la regulación del ciclo celular, el crecimiento y la diferenciación celular, y la inhibición de la apoptosis (Dummler y Hemmings, 2007).

La participación de Akt en la regulación de la supervivencia celular ocasiona la inhibición directa por fosforilación de señales proapoptóticas como Bad y FoxO.

La ausencia de IRS2 favorece la rápida apoptosis con activación de caspasa 3 activa y fragmentación del DNA. En los ratones knock out para IRS2 la insulina es incapaz de fosforilar Bad, de aumentar la expresión de Clc-x<sub>L</sub>, y de traslocar Foxo 1 del núcleo al citosol, lo que demuestra que IRS2 es una señal clave para el eje PI3K/Akt/Foxo 1 y que la señalización a través de IRS2 se requiere de forma específica mediante la generación de PIP3 para mediar en los efectos de la insulina sobre la supervivencia celular (Valverde y col., 2004).

La unión de insulina o IGF1 a su receptor mediante la autofosforilación de tirosina aumenta la actividad tirosinquinasa del receptor y propaga la señal a través de vías comunes que incluyen a la vía IRS/PI3K (Taguchi y White, 2008).

Tras su activación, el receptor une a las IRS que son fosforiladas por acción de la tirosinquinasa intrínseca del receptor, las IRS fosforiladas se unen después a otras proteínas a través de sus dominios SH2, entre ellos está la p85, subunidad reguladora de PI3K. Ello activa la subunidad catalítica p110 de PI3K. Una vez activada, la PI3K actúa sobre su sustrato PIP2 para producir PIP3 que conducen a PDK1 (quinasa dependiente del fosfatidil inositol) y Akt hacia la membrana plasmática, donde PDK1 fosforila a Akt activándola. Akt actúa fosforilando FoxO que se acumula en el citosol como consecuencia de ello.

La cascada IRS/PI3K/Akt, inactivando FoxO, produce un descenso en la expresión de los reguladores inhibidores del ciclo celular y promueve la supervivencia celular puesto que FoxO regula a la proteína proapoptótica TRAIL, junto a la fosforilación directa de BAD por Akt, BAD es un componente del complejo BAD/BclxL, lo que ocasiona la disociación del complejo (Datta y col., 1997; Carey y col., 2007).

En definitiva la ruta de insulina resulta en la activación de Akt que acabará activando la expresión de genes prosupervivencia y antiapoptóticos (Zang y col., 2011).

#### **Señalización a través de MAPK.**

La asociación de las proteínas IRS con Grb2 conduce al reclutamiento de SOS y Ras con lo que se activa la vía MAPK, un vía reguladora principal de la expresión génica (Virkamäki y col., 1999).

En algunos epitelios, la aparición de apoptosis coincide con la retirada de IRS (Hadsell y col., 2001), en este mecanismo podría estar implicada la caspasa 10 y se realizaría a través de la inhibición de la ruta de la MAPK-1 (Green y col., 2004).

(Nota: ver algunos ejemplos de activación de p38MAPK en el apartado siguiente)

#### **Proliferación, Degeneración y Apoptosis en las células germinales del testículo.**

*En nuestro estudio hemos podido comprobar como las células germinales de los ratones knock out a IRS2 no se marcan con PCNA, sin embargo es posible observar morfológicamente imágenes típicas de división celular, e incluso como algunas de esas células aparecen marcadas con caspasa 3 activa, un marcador de apoptosis. Es deducible de esos hallazgos que en los ratones knock out a IRS2, ya a las 6 semanas,*

*se produce un arresto de las células germinales en su proceso meiótico, de ahí que haya imágenes sugerentes de células en división que no se marcan con PCNA.*

*En esta fase, se mantiene la diferenciación de las espermátides y, como consecuencia, se forman espermatozoides que aparecen en la luz de los conductos de la red testicular.*

Apoyando esta teoría que planteamos, se ha demostrado que el arresto de la espermatogénesis y el daño de DNA que se observa en el testículo de ratones mutantes a PTIP, una proteína implicada en la reparación del DNA y la metilación de las histonas, conduce a un arresto de los espermatoцитos seguido de atrofia testicular (Schwab y col., 2013).

*Los ratones knock out de 12 semanas de nuestro estudio presentan signos de degeneración intratubular caracterizada por células gigantes y multinucleadas, que unas veces fueron acromáticas, otras eosinófilas y otras basófilas, llegando incluso a parecer como células eosinófilas anucleadas.*

Analizando la atrofia testicular tras la administración de kisspeptina-54 se ha comprobado que la atrofia testicular, probablemente debida a la disrupción de la regulación por GnRH, presenta imágenes degenerativas semejantes a las observadas en nuestro estudio (Thompson y col., 2009).

*Estos autores asocian esas imágenes degenerativas a posibles necrosis intratubular de las células germinales. Sin embargo, nosotros hemos detectado que, al menos en pasos previos a la multinucleación y en las células anucleadas hay marcaje para caspasa 3 activa, de manera que sin rechazar la posibilidad de que exista necrosis o autofagia, también habría apoptosis.*

Tras la infección testicular por el virus del herpes simple acontece un fenómeno de atrofia testicular que va afectando a túbulos de forma secuencial. Primero aparece una desorganización del epitelio germinal que se va desprendiendo y se acompaña de un arresto de la espermatogénesis, posteriormente hay un claro adelgazamiento del epitelio germinal y aparecen células germinales multinucleadas y células picnóticas en el interior de la luz tubular (Malolina y col., 2014).

*Esta secuencia es casi idéntica a la observada en nuestro estudio en los ratones knock out a IRS2 y reafirma la idea de que las variaciones morfológicas observadas en los túbulos de nuestros knock out son diferentes estadios de un mismo proceso secuencial de degeneración y posterior atrofia testicular.*

Se admite que en el testículo existe fisiológicamente un grado de apoptosis que, al contrario de lo que ocurre en el ovario, afecta a las células germinales, siendo rara en las células somáticas. En esta apoptosis se ha implicado a un aumento en la expresión de p53 (Liu y col., 2010) sin que ello guarde relación con alteraciones en la telomerasa y la consecuente fusión de telómeros (Maser y col., 2007).

Las dos isoformas de p53 son capaces de actuar y, en cierto modo, modular la actuación de IGF1 sobre su receptor y la posterior activación de la ruta de Akt (Maier y col., 2003).

Se produce una pérdida de células germinales a lo largo del desarrollo normal del testículo (Huckins, 1978). La disminución del número de células se da principalmente du-

rante la división mitótica de las espermatogonias, durante la división meiótica de los espermatocitos y en la espermiogénesis (Russel y col., 1987) mediante un proceso de apoptosis y posterior fagocitosis por las células de Sertoli (Allan y col., 1992). La apoptosis en los túbulos seminíferos se da principalmente en etapas tempranas del desarrollo testicular postnatal, mientras que es rara tras la pubertad y en adultos (Billig y col., 1995). Generalmente al apoptosis se da de forma fisiológica en las células germinales, siendo rara en las células de Leydig y las de Sertoli (Shikone y col., 1994; Billig y col., 1995), en la rata la célula que presenta mayor apoptosis a las 5 semanas de edad y en el adulto es el espermatocito (Billig y col., 1995).

*En nuestro estudio, en los animales wild type, la aparición de células positivas a caspasa 3 activa ha sido tan esporádica que podría decirse que es inexistente. No ocurrió así en los ratones knock out en los que se comprobó que desde la hilera más basal de células, la que normalmente ocupan las espermatogonias y espermatocitos de primer orden hasta las espermátides redondeadas de la hilera adluminal aparecieron células positivas a caspasa 3 activa, si bien, no todas las células del epitelio eran positivas, semejante a los hallazgos descritos en algunas alteraciones génicas como las de los ratones knock out para PCD<sup>3j</sup> (Kim y col., 2011).*

La literatura recoge diversas causas capaces de inducir apoptosis en las células germinales del testículo, desde causas mecánicas a intoxicaciones. A continuación presentamos algunos casos en los que dicha apoptosis guardaba una cierta relación con los receptores de insulina o de IGF1 o bien de sus rutas de señalización intracelular. Como podrá apreciarse, casi todas ellas se relacionan con atrofia testicular que de una u otra manera hemos comentado ya anteriormente en esta discusión.

La apoptosis testicular relacionada con la diabetes puede derivar de efecto de radicales libres como sugiere el hecho de que dietas hídricas ricas en sodio hidrosulfuro tiene efectos antiapoptóticos (Sadik y col., 2011).

En la orquitis autoinmune aparece una atrofia testicular en la que el marcaje con caspasa 3 activa demuestra que la apoptosis está implicada en la progresión de la autopsia, la validez de caspasa 3 activa como marcador en este proceso se correlaciona con la observación por TUNEL de la fragmentación del DNA (Pérez y col., 2015).

En el testículo, se ha asociado la ausencia de Akt1 con un aumento de estrés oxidativo que aumenta la expresión de SMAC/DIABLO, una proteína mitocondrial proapoptótica, de donde se deduce que Akt1 juega un importante papel en la protección de las células germinales ante la apoptosis en relación con una sensibilidad aumentada al estrés oxidativo (Rogers y col., 2008). La atenuación de vía Kit-PI3K-Akt aumenta la apoptosis de las células germinales en el testículo (Dong y col., 2014).

La apoptosis de células germinales testiculares inducida por aumentos de la temperatura parece asociarse a la fosforilización de la p38MAPK inducida probablemente por la activación de calpain 2 (Lizama y col., 2009).

De igual manera, la apoptosis inducida por bisfenol A en las células de Sertoli (Iida y col., 2003) que afecta de forma notoria al desarrollo de las células germinales del testículo (Wang y col., 2014) y por lo tanto a la espermatogénesis y la producción de espermatozoos conlleva un aumento en la expresión de Fas, FasL y caspasa 3 activa que se

acompaña de un aumento en la fosforilación de JNKs/p38MAPK y de la traslocación de NF- $\kappa$ B (Qi y col., 2014).

El Zinc podría participar en la regulación por apoptosis del control de las células de Sertoli sobre las células germinales a través de la liberación de clusterina desde las células de Sertoli (Kaisman-Elbaz y col., 2009); siendo ésta la responsable de la apoptosis de células germinales. En la liberación de clusterina están implicadas las rutas de la PI3K y de las MAPK.

El selenio produce, junto a toxicidad testicular por aumento en la producción de radicales libres oxidantes, apoptosis en el testículo a través de p38 MAPK, la activación de caspasa 3 y caspasa 8 y el descenso de Bcl-2 (Ranawat y Bansal, 2009).

La torsión testicular se acompaña de apoptosis en las células germinales, el grado de apoptosis, principalmente en las espermátides, disminuye notablemente por efecto de IGF1 (Ozkurkcugil y col., 2004).

Aunque algunos autores mantienen que la insulina desarrolla sus efectos a través del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Schoeller y col., 2012) no cabe duda de que IRS2 está implicada en el desarrollo normal del testículo y en su funcionalidad como glándula reproductora y que lo más probable es que no sea la insulina sino el IGF1 y/o el IGF2 los que desarrollen sus efectos a través de dicha proteína.

*En conjunto, nuestros resultados sugieren que IRS2 es además un elemento clave en la espermatogénesis ya que su ausencia provoca atrofia testicular, con el arresto de las células germinales que dejan de proliferar, para posteriormente entrar en mitosis; la aparición de elementos aberrantes de células germinales polinucleadas que acompañan a un proceso degenerativo del epitelio germinal y la posterior destrucción con desaparición del epitelio, persistiendo tan solo células de Sertoli adosadas a la membrana basal sin que haya células germinales.*



## Conclusiones



Después de analizar los efectos que la ausencia de la proteína de sustrato de receptor insulínico IRS2 ejerce sobre la morfología de los túbulos seminíferos en ratones knock out para IRS2 de 6 y 12 semanas y compararlos con las características morfológicas de los ratones wild type, mediante un estudio histológico/histopatológico con hematoxilina eosina y su posterior análisis morfométrico; valorando las alteraciones en la proliferación celular empelando PCNA como marcador de proliferación y detectar la aparición de apoptosis mediante el marcaje inmunocitoquímico con caspasa 3 activa; contrastado los resultados obtenidos con la literatura existente, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- Este es el primer estudio que asocia el análisis histoquímico-morfométrico con las variaciones en proliferación y apoptosis en ratones adultos que carecen de la proteína IRS2. Dada la relevancia clínica que tiene la diabetes tipo 2 y puesto que este modelo animal desarrolla una resistencia periférica a la insulina acompañada de diabetes tipo 2, los resultados obtenidos tienen gran relevancia puesto que ofrecen alteraciones testiculares no ligadas a la hiperglucemia. Alcanzando los objetivos propuestos al inicio del estudio.
  - 2.- Los resultados obtenidos sugieren que la ausencia de IRS2 induce la aparición de una atrofia testicular que se desarrolla en un proceso secuencial y que afecta de forma principal a las células germinales presentes en el túbulo seminífero.
  - 3.- La secuencia puede ser caracterizada morfológicamente en los siguientes pasos
    - a.- Aparición de células germinales basales vacuoladas.
    - b.- Arresto de la proliferación de las células germinales desde las espermatogonias.
    - c.- Disminución de la altura del epitelio germinal junto a un inicio de desprendimiento del mismo.
    - d.- Aparición de apoptosis junto a la aparición de células germinales gigantes polinucleadas.
    - e.- Pérdida de espermátides y por ende de espermatozoides, con vaciamiento de la luz de los conductos de la red testicular.
    - f.- Desaparición de células germinales en los túbulos seminíferos.
- Este proceso secuencial no se da a la vez en todos los túbulos seminíferos, sino que en un mismo testículo coexisten túbulos en diferentes estadios del proceso.



## Referencias Bibliográficas



- Adier-Wailes DC, Alberobello AT, Ma X, Hugendubler L, Stern EA, Mou Z, Han JC, Kim PW, Summer AE, Yanovski JA, Mueller E (2015). Analysis of variants and mutations in the human winged helix FOXA3 gene and associations with metabolic traits. *Int J Obes*, 39: 888-892.
- Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, Lewis SE (2007). Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod*, 22: 1871-1877.
- Aherne WA, Camplejohn, R.S., Wright, N.A (1977). An introduction to cell population kinetics. London: Edward Arnold.
- Aherne WA, Dunnill MS (1982). Morphometry. London, Edward Arnold.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Robert K. and Watson J.D. (1989). Molecular biology of the cell. 2<sup>nd</sup>. Ed., New York: Garland Publishing Inc.
- Albrecht KH, Young M, Washburn LL, Eicher EM (2003). Sry expression level and protein isoform differences play a role in abnormal testis development in C57BL/6J mice carrying certain Sry alleles. *Genetics*, 164: 277-288.
- Allan DJ, Harmond BV, Roberts SA (1992). Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Proliferation*, 25: 241-250.
- Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, 372: 186-190.
- Arola J., Heikkila P, Kahri A.I. (1993). Biphasic effect of ACTH on growth of rat adrenocortical cells in primary culture. *Cell Tissue Res*. 271: 169-276.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signalling and modulation. *Science*. 281: 1305-1308. 1998.
- Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75: 73-82.
- Bao AM, Man XM, Guo XJ, Dong HB, Wang FQ, Sun H, Wang YB, Zhou ZM, Sha JH, (2011). Effects of di-n-butyl phthalate on male rat reproduction following pubertal exposure. *Asian Journal of Andrology*, 13: 702-709.
- Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR, Kadar NJ (1987). Proliferative index breast carcinoma determined in situ by KI 67 immunostaining and its relationship to pathological and clinical variables. *J. Pathol* 152: 287-295.
- Barr PJ, Tomei LD (1994). Apoptosis and its role in human disease. *BioTechnology*, 12: 487-493.
- Baynes JW, Marek H (2005). *Bioquímica médica*. Elsevier. pp. 279 -283.

- Behr R, Sackett SD, Bochkis IM, Le PP, Kaestner KH (2007). Impaired male fertility and atrophy of seminiferous tubules caused by haploinsufficiency for Foxa3. *Dev Biol*, 306: 636-645.
- Bensch, F.G., Tanaka, S., Hu, S.Z. Wang, T.S.F., Korn, D (1982). Intracellular localization of human DNA polimerase alpha with monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 257: 8391-8396.
- Berensztejn EB, Baquedano MS, Pepe CM, Costanzo M, Saraco NI, Ponzio R, Rivarola MA, Belgorosky A (2008). Role of IGFs and insulin in the human testis during postnatal activation: Differentiation of steroidogenic cells. *Pediatr Res*, 63: 662-666.
- Berg J., Tymoczko J., Stryer L. *Bioquímica* 2008. 6ª Edición. Reverté. P 1051.
- Bhattacharya S, Dey D, Roy SS. (2007). Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci* 32: 405-413.
- Bidinger SB, Kahn CR (2006). From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol*, 68: 123-158.
- Billig H, Chun SY Eisenhauer K, Hsueh AJW (1996) Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Human Reproduction Update*, 2: 103-117.
- Blaschke W (1949). *Vorlesungen über Integralgeometrie*. Chelsea Publishing Company.
- Bonnesen T, Fenchel W (1934). *Theorie der konvexen Körper*. *Ergebnisse der Mathematik und ihrer Grenzgebiete* 3, S. 1.
- Boura-Halfon S, Zick Y (2009). Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296: E581-591.
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A., McDonald-Bravo, H (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature*. 326: 515-517.
- Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289: 2122-2125.
- Buffa R, Solcia E, Fiocca R, Crivelli O, Pera A (1979). Complement-mediated binding of immunoglobulins to some endocrine cells of the pancreas and gut. *J Histochem Cytochem*, 27: 1279-1280.
- Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF (2000). IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature*, 407: 377-382.
- Carbajo S, González del Pozo F, Carbajo-Pérez E (1992). Quantification of the cellular proliferation on freshly dispersed cells from rat anterior pituitaries after in vivo and in vitro labelling with bromodeoxyuridine. *Histochem J*, 24: 137-143.
- Carbajo-Pérez E, Watanabe YG (1990). Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period. *Cell Tissue Res*, 261: 333-338.
- Carey GB, Semenova E, Qi X, Keegan AD (2007). IL-4 protects the B-cell lymphoma cell line CH31 from anti-IgM-induced growth arrest and apoptosis: contribution of the PI-3 kinase/AKT pathway. *Cell Research*, 17: 942-955.



- Carpentier JL, Hamer I, Foti M. (2002) Insulin receptor trafficking. En: *Insulin Signaling: from cultured cells to animal models*. Edit. : Gruenberg G, Zick Y. Taylor and Francis. New York, pp 243-258.
- Carrascal E. (2001) El Páncreas. En: *Histología Humana II. Órganos y Sistemas*. Graficas Cervantes. Salamanca. pp 151-155.
- Carretero J, Rubio M, Navarro N, Nieto P, Vázquez RJ, Sánchez F, Vázquez R (1995a). In vitro modifications in the proliferation rate of prolactin cells are accompanied by nuclear morphometric variations. *Histol Histopathol*, 10: 135-139.
- Carretero J, Rubio M, Sánchez F, Cabo JJ, Riesco JM, Angoso M, Vázquez R (1992). Immunocytochemical and morphometric study of the PRL-cell following chronic administration of TRH and methimazole. *An. Anat*, 38: 183-189.
- Carretero J, Rubio M, Sánchez F, Vázquez RJ, Santos M, Blanco E, Vázquez R (1995b). In vitro morphometric and proliferative variations in VIP-immunoreactive pituitary cells induced by estradiol. *Neuroendocrinology* 62: 277-282.
- Carretero J, Rubio M, Vázquez-Perfecto RJ, Sánchez F, Torres JL, Pérez RM, Vázquez R (1997). Decreases in the size and proliferation rate of VIP-immunoreactive cells induced in vitro by testosterone are associated with decreases in VIP release. *Neuroendocrinology*, 65: 173-178.
- Carretero J, Sánchez F, Montero M, Blanco E, Riesco JM, Carbajo E, González R, Vázquez R (1990). Morphological and functional study of the GH-immunoreactive adenohypophyseal cells in ovariectomized rats. *Histochem J*, 22: 683-687.
- Carretero J, Sánchez F, Torres JL, Blanco E, Riesco JM, Vázquez R (1989). Study of h-TSH immunoreactive adenohypophyseal cells following treatment with methimazole. *Histol Histopathol*, 4: 71-76,
- Carretero J, Sánchez F, Vázquez R, Cacicedo L, Sánchez-Franco F, Fernández G, Montero M (1991). In vivo and in vitro evidence of growth hormone-releasing factor-like produced locally in the adenohypophyseal cells of the rat. *Neuropeptides* 19: 223-229.
- Carretero J, Vázquez G, Blanco E, Rubio M, Santos M, Martín-Clavijo A, Torres JL, Vázquez R (1999a). Immunohistochemical evidence of the presence of aromatase P450 in the rat hypophysis. *Cell Tissue Res*, 295: 491-423.
- Carretero J, Vázquez G, Martín-Clavijo A, Rubio M, Hernández E, Moro JA, Gato A, Barbosa E, Vázquez R (1999b). In vivo studies on cytodifferentiation of pituitary aromatase-immunoreactive cells. *Eur J Anat*, 3: 79-85.
- Carretero J, Vázquez G, Rubio M, Blanco E, Juanes JA, Perez E, Burks DJ, Vazquez R (2003). Postnatal differentiation of the immunohistochemical expression of aromatase P450 in the rat pituitary gland. *Histol Histopathol*, 18: 419-423.
- Castilla-Cortazar I, Gago A, Muñoz U, Avila-Gallego E, Guerra-Menéndez L, SádabaMC, García-Magariño M, Olleros Santos-Ruiz M, Aguirre GA, Puche JE (2015). Mechanisms underlying testicular damage and dysfunction in mice with partial IGF-1 deficiency and the effectiveness of IGF-1 replacement therapy. *Urology*. Epub 2015 Sep 22.

- Clermont Y (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 52: 198-236.
- Cohen GM (1997). Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326: 1-16.
- Colón E, Zaman f, Axelson M, Larsson o, Carlsson-Skwirut C, Svechnikov K, Söder O (2007). Insulin-like growth factor-1 is an important antiapoptotic factor for rat Leydig cells during post natal development. *Endocrinology*, 148: 129-139.
- Crofton, MW (1877). Geometrical theorems related to mean values. *Proc.Lond. Math. Soc.* 8: 304.
- Cui X, Lazard Z, Zhang P, Hopp TA, Lee AV. (2003). Progesterone crosstalks with insulin-like growth factor signaling in breast cancer cells via induction of insulin receptor substrate-2. *Oncogene*, 22: 6937-6941.
- Chan, T. W., Pollak, M., & Huynh, H. (2001). Inhibition of insulin-like growth factor signaling pathways in mammary gland by pure antiestrogen ICI 182,780. *Clinical cancer research*, 7: 2545-2554.
- Chandrasekaran Y, Richburg JH (2005) The p53 protein influences the sensitivity of testicular germ cell to mono-(2-ethylhexyl) phthalate- induced apoptosis by increasing the membrane levels of Fas and DR5 and decreasing the intracellular amount of c-FLIP. *Biol Reprod*, 72: 206-213.
- Chandrashekar V, Zaczek D, Bartke A (2004). The consequences of altered somatotropic system on reproduction. *Biol Reprod*, 71: 17-27.
- Cheng A, Dube N, Gu F, Tremblay ML (2002). Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. *Eur J Biochem* 269: 1050-1059.
- Chihara M, Otsuka S, Ichii O, Kon Y (2013). Vitamin A deprivation affects the progression of the spermatogenic wave and inútil formation of the blood-testis barrier, resulting in irreversible testicular degeneration in mice. *J Reprod Dev*, 59: 525-535.
- Choudhury AI, Heffron H, Smith MA, Al-Qassab H, Xu AW, Selman C, Simmgen M, Clements M, Claret M, Maccoll G, Bedford DC, Hisadome K, Diakonov I, Moosajee V, Bell JD, Speakman JR, Batterham RL, Barsh GS, Ashford ML, Withers DJ (2005). The role of insulin receptor substrate 2 in hypothalamic and beta cell function. *J Clin Invest*, 115: 940-950.
- D’Cruz SC, Jubendradass R, Mathur PP (2012). Bisphenol A induces oxidative stress and decreases levels of insulin receptor substrate 2 and glucose transporter 8 in rat testis. *Reprod Sci*, 19: 163-172.
- Daniel NN, Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116: 205-219.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91: 231-241.
- DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature*, 345: 78-80.

- DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 64: 849-859.
- Delesse A (1847). Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *C R Acad Sci Paris*, 25: 544.
- Delthiel R (1926). Probabilités géométriques. Gauthier-Villars et Ge Eds. Ecole Polytechnique. Paris.
- Díez-Caballero F, Castilla-Cortázar I, Garcia-Fernandez M, Puche JE, Diaz-Sanchez M, Diaz Casares A, Aliaga-Montilla MA, Rodríguez-Borrajo C, Gonzalez-Baron S (2006). Little effects of Insulin-like Growth Factor-I on testicular atrophy induced by hypoxia. *BMC Urology* 6: 4.
- Dong Y, Zhang L, Bai Y, Zhou HM, Campbell AM, Chen H, Yong W, Zhang W, Zeng Q, Shou W, Zhang ZY (2014). Phosphatase of regenerating liver 2 (PRL2) deficiency impairs Kit signaling and spermatogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 289: 3799-3810.
- Draetta G, Brizuela L, Potashkin J, Beach D (1987). Identification of p34 and p13, human homologous of the cell cycle regulators of fission yeast encode by *cdc2+* and *suc1+*. *Cell*, 50: 319-325.
- Draetta G, Piwnicka-Worms H, Morrison D, Druker B, Roberts T, Beach D (1988). Human *cdc2* protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosin kinase substrate. *Nature*, 326: 738-744.
- Dufau ML (1988). Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Annu Rev Physiol*, 50: 483-508.
- Dummler B, Hemmings BA (2007). Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem Soc Trans*, 35: 231-235
- Dunphy WG, Newport JW (1988). Unravelling of mitotic control mechanisms. *Cell*, 55: 925-928.
- Duru FIO, Ajayi S, Azu OO (2013). The effect of unilateral vasectomy on testosterone and testicular parameters in the adult male African giant rat (*Cricetomys gambianus*). *African Health Sciences*, 13: 483-489.
- Ebbina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfinch ID (1985). The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signaling. *Cell*. 40: 747-758
- Eddy EM, O'Brien DA (1998). Gene expression during mammalian meiosis. *Curr Top Dev Biol*, 37: 141-200.
- Efstratiadis A (1998) Genetics of mouse growth. *Int J Dev Biol*, 42: 955-976.
- Elias H, Henning A, Schwartz DE (1971). Stereology: applications to biomedical research. *Physiol Rev*, 51: 158-200.
- Elias H, Hide DM (1980). An elementary introduction to stereology (quantitative microscopy). *Am J Anat*, 159: 411-446.
- Ellis HM, Horvitz HR (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44: 817- 829.

- Ellouk-Achard S, Djenabi S, De Oliveira GA, Desauty G, Duc HT, Zohair M, Trojan J, Claude JR, Sarasin A, Lafarge-Frayssinet C (1998). Introduction of apoptosis in rat hepatocarcinoma cells by expression of IGF-1 antisense c-DNA. *J Hepatol*, 29: 807-818.
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, 7: 606-619.
- Escott GM, Jacobus AP, Loss ES (2013). PI3K-dependent actions of insulin and IGF-1 on seminiferous tubules from immature rats. *Eur J Physiol*, 465: 1497-1505.
- Escott GM, de Castro AL, Jacobus AP, Loss ES (2014). Insulin and IGF-1 actions on IGF-1 receptor in seminiferous tubules from immature rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838: 1332-1337.
- Estévez J (1994). Valoración in vitro del efecto modulador de los esteroides gonadales sobre la acción de los opioides endógenos en la proliferación celular adenohipofisaria. Tesis Doctoral. Univ. de Salamanca.
- Eyzaguirre CF, Codner E (2006). Análogos de insulina: en búsqueda del reemplazo fisiológico. *Rev. Méd. Chile*. 134: 239-250.
- Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR (2000). Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278: E127-133.
- Farrelly N, Lee YJ, Oliver J, Dive C, Streuli C (1999). Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control of insulin signaling. *Journal of Cell Biology*, 144: 1337-1347.
- Favelyukis S, Till JH, Hubbard SR, Miller WT (2001) Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol*, 8: 1058-1063.
- Feng LX, Ravindranath N, Dym M (2000). Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3- kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia. *J Biol Chem*, 275: 25572-25576.
- Field AE, Coakley EH, Must A, Spadano JL, Laird N, Dietz WH, Rimm E, Colditz GA (2001) Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch Intern Med*, 161: 1581-1586.
- Forssmann WG, Pickel V, Reinecke M, Hock D, Metz J (1981). Immunohistochemistry and immunocytochemistry of nervous tissue. En: *Techniques in neuroanatomical research*. Heym C, Forssmann WG, eds. Springer-Verlag., Berlín, pp: 171-205.
- Fowden AL (1995). Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod Fertil Dev*, 7: 351-363.
- Franks S (1998). Growth hormone and ovarian function. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 12: 331-340.
- Friedman JE, Ishizuka T, Liu S, Farrell CJ, Bedol D, Koletsky RJ, Kaung HL, Ernsberg P (1997). Reduced insulin receptor signalling in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Am J Physiol*, 273: E1014-1023.

- García CF, Weiss LM, Lowder J (1987). Quantitation and estimation of lymphocyte subsets in tissue sections. Comparison with flow cytometry. *Am J Pathol*, 87: 470-477.
- García RL, Coltrera MD, Gown AM (1989). Analysis of proliferative grade using anti PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J Pathol*, 134: 733-739.
- García-Barrado MJ, Blanco EJ, Carretero-Hernández M, Iglesias-Osma MC, Carretero M, Herrero JJ, Burks DJ, Carretero J (2015). Dopamine modulates insulin release and is involved in the survival of rat pancreatic beta cells. *PlosOne*, 10.1371/journal.pone.0123197.
- Gatter KC, Dunnill MA, Gerdes J, Stein H, Mason DY (1986). New approach to assessing lung tumours in man. *J Clin Pathol*, 39: 590-593.
- Gerdes J, Lemke H, Baish H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody KI 67. *J Immunol*, 133: 1710-1716.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983). Production of monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31: 13-20.
- Giammona CJ, Sawhney P, Chandrasekaran Y, Richburg JH (2002). Death receptor response in rodent testis after mono-(2-ethylhexyl) phthalate exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*, 185: 119-127.
- Gil J (1992). Estudio inmunocitoquímico de las estirpes celulares productoras de neuropéptidos: péptido intestinal vasoactivo (VIP), hormona liberadora de GH (GRF) y somatostatina (SRIF), en la hipófisis de la rata. Tesis Doctoral. Univ. de Salamanca.
- Gilmore AP, Valentijn AJ, Wang P, Ranger AM, Bundred N, O'Hare MJ, Wakeling A, Korsmeyer SJ, Streuli CH (2002). Activation of BAD by therapeutic inhibition of epidermal growth factor receptor and transactivation by insulin-like growth factor receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 27643-27650
- Golick ML, Rice M (1992). Optimum staining of PCNA in paraffin sections is dependent of fixation, drying and intensification. *J Histotechnol*, 15: 39-41.
- Green KA, Naylor MJ, Lowe ET, Wang P, Marshman E, Streuli CH (2004). Caspase-mediated cleavage of insulin receptor substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 25149-25156.
- Griffeth RJ, Carretero J, Burks DJ (2013). Insulin receptor substrate 2 is required for testicular development. *PLoS One*, 8: e62103.
- Griffeth RJ, Bianda V, Nef S (2014). The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic and Clinical Andrology*, 24: 12.
- Griswold MD (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 9: 411-416.
- Gual P, Marchand-Brustel YL, Tanti JF (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, 87: 99-109.

- Hadsell DL, Alexeenko T, Klemintidis Y, Torres D, Lee AV (2001). Inability of overexpressed des(1-3)human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) to inhibit torced mammary gland involution is associated with decreased expresion of IGF signaling molecules. *Endocrinology*, 142: 1479-1488.
- Hall PA, Levison DA, Woods AL Yu CCW, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillet CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: a index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162: 285-294.
- Hall PA, Richard MA, Gregory WM, D'Adenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG (1988). The pronostic significance of KI 67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol*, 154: 223-235.
- Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT (2008). Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril*, 90: 897-904.
- Hanke S, Mann M (2009). The phosphotyrosine interactome of thr insulin receptor family and its substrates IRS-1 and IRS-2. *Mol Cell Proteomics*, 8: 519-534.
- Hech NB (1998). Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays*, 20: 555-561.
- Hefnawy TM, Ramadan MF (2013). Protective effects of *Lactuca sativa* ethanolic extract on carbon tetrachloridre induced oxidative damage in rats. *Asian Pac J Trop Dis*, 3: 277-285.
- Héron-Milhavet L, Karas M, Goldsmith CM, Baum BJ, Le Roith D (2001). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor activation rescues UV-damaged cells through a p38 signaling pathway. Potential role of the IGF-I receptor in DNA repair. *J Biol Chem*, 276: 18185-18192.
- Hickford DE, Frankenberg S, Pask AJ, Shaw G, Renfree MB (2011). DDX4 (VASA) is conserved in germ cell development in marsupials and monotremes. *Biol Reprod*, 85: 733-743.
- Hischberg R, Ding H (1998). Mechanisms of insulin-like growth factor-1-induced accelerated recovey in experimental ischemic acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab*, 24: 211-219.
- Holsberger DR, Kiesewetter SE, Cooke PS (2005). Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor alpha 1. *Biol Reprod* 73: 396-403.
- Holstein AF, Maekawa M, Nagano T, Davidoff MS (1996). Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Arch Histol Cytol*, 59: 109-125.
- Hou M, Ericsson E, Svechnikov K, Jahnukainen K, Söder O, Meinhardt A, Sävendahl L (2014). Bortezomib treatment cause long-term testicular dysfunction in young male mice. *Mol Cancer*, 13: 155.
- Howard A, Pelc SR (1951). Nuclear incorporation of P32 as demonstrated by autoradiographs. *Exp Cell Res*, 2: 178-187.

- Howard A, Pelc SR (1953). Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity, Supl.* 6: 173-271.
- Huang QX, Zhou HD, Liao EY, Hu PA (2005) Effects of estradiol and progesterone on the expression of insulin receptor substrate in human osteoblasts. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 85: 743-746.
- Huckins C (1978). The morphology and kinetics spermatogonial degeneration in normal adult rats. An analysis using a simplified classification of germinal epithelium. *Anat Rec*, 190: 905-926.
- Huhtaniemi I, Toppari J (1995). Endocrine, paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 377: 33-54.
- Hutson JC, Childs GV, Gardner PJ (1979). Considerations for establishing the validity of immunocytological studies. *J Histochem Cytochem*, 27: 1201-1202.
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev*, 20: 761-787.
- Iida H, Maehara K, Doiguchi M, Mori T, Yamada F, (2003). Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells. *Reprod Toxicol*, 17: 457-464.
- Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE (2004). Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril*, 82: 863-870.
- Kacmerek L (1986). Protooncogen expression during the cell cycle. *Lab Invest*, 54: 365-376.
- Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N. (2004). Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res*, 35: 103-108.
- Kaisman-Elbaz T, Sekler I, Fishman D, Karol N, Forberg M, Kahn N, Hershinkel M, Silverman WF (2009). Cell death induced by zinc and cadmium is mediated by clusterin in cultured mouse seminiferous tubules. *J Cell Physiol*. 220: 222-229.
- Kanzaki M, Pessin JE (2001). Signal integration and the specificity of insulin action. *Cell Biochem Biophys*, 35: 191-209.
- Karamitopoulou E, Perentes E, Melachrinou M, Maraziotis T (1993). Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity in human central nervous system neoplasms. *Acta Neurophatol* 85: 316-322.
- Kashimada K, Koopman P (2010). Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development*, 137: 3921-3930.
- Kawakita N, Seki S, Yanai A, Sakaguchi H, Kuroki T, Mizoguchi Y, Kenzo-Kobayashi K, Monna T (1992). Immunocytochemical identification of proliferative hepatocytes using monoclonal antibody to proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA/Cyclin). Comparison with immunocytochemical staining for DNA-polymerase- $\alpha$ . *Am J Clin Pathol*, 97 (supl. 1): 14-20.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257.

- Kim N, Xiao R, Choi H, Jo H, Kim JH, Uhm SJ, Park C (2011). Abnormal sperm development in *pcd 3J*<sup>-/-</sup> mice: the importance of *Agtppb1* in spermatogenesis. *Molecules and Cells*, 31: 39-48.
- Kim B, Feldman EL (2009). Insulin receptor substrate (IRS)-2, not IRS-1, protects human neuroblastoma cells against apoptosis. *Apoptosis*, 14: 665-673.
- Klamt J, Garten A, Barnikol-Oettler A, Beck-Sickinger AG, Kiess W (2005). Comparative analysis of the signalling capabilities of the insulin receptor-related receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 327: 557-564.
- Kokk K, Veräjänkorva E, Laato M, Wu XK, Tapfer H, Pöllänen P (2005). Expression of insulin receptor substrates 1-3, glucose transporters GLUT-1-4, signal regulatory protein 1 $\alpha$ , phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B at the protein level in the human testis. *Anatomical Science International*, 80: 91-96.
- Kokk K, Veräjänkorva E, Wu XK, Tapfer H, Pöldoja E, Simovart HE, Pöllänen P (2007). Expression of insulin signaling transmitters and glucose transporters at the protein level in the rat testis. *Ann NY Acad Sci*, 1095: 262-273.
- Kokk K, Veräjänkorva E, Laato M, Wu XK, Tapfer H, Pöllänen P (2005). Expression of insulin receptor substrates 1-3, glucose transporters GLUT-1-4, signal regulatory protein 1 $\alpha$ , phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B at the protein level in the human testis. *Anat Sci Int*, 80: 91-96.
- Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE (2006). Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl*, 27: 450-452.
- Krammer PH (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407: 789-795.
- Krammer PH (1998). The CD95(APO-1/Fas)/CD95L system (review). *Toxicol Lett*, 102-103: 131-137.
- Krause D, Lyons A, Fennelly C, O'Connor R (2001). Transient activation of Jun N-terminal kinases and protection from apoptosis by the insulin-like growth factor 1 receptor can be suppressed by dicumarol. *J Biol Chem*, 276: 19244-19252.
- Krutiskikh A, De Gendt K, Sharp V, Verhoeven G, Poutanen M, HuhTaniemi (2011). Targeted inactivation of the androgen receptor gene in murine proximal epididymis causes epithelial hypotrophy and obstructive azoospermia. *Endocrinology*, 152: 689-696.
- Kulik G, Klippel A, Weber MJ (1997). Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol*, 17: 1595-1606.
- [Kumar V](#), Abbas A, Fausto N (2005) Robbins & Cotran; Patología estructural y funcional, 7ª Edición, Elsevier, p 1195.
- Kurki P, Vanderlaan M, Dolbear F, Gray J, Tan EM (1986). Expression of proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA/Cyclin) during the cell cycle. *Exp Cell Res*, 166: 209-212.



- La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, D'Agata R, Salemi M, Calogero AE (2011). High levels of lipid peroxidation in semen of diabetic patients. *Andrologia*, 44: 565-570.
- Lajtha LG (1963). On the concept of the cell cycle. *J Cell Comp Physiol*, 62: 143-145.
- Landberg G, Gross G (1991). Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. *Cancer Res*, 51: 4570-4574.
- Lange CA, Yee D (2011). Killing the second messenger: targeting loss of cell cycle control in endocrine-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 18: C19-24.
- Laron Z (1999). Somatomedin-1 (recombinant insulin-like growth factor-1): clinical pharmacology and potential treatment of endocrine and metabolic disorders. *BioDrugs*, 11: 55-70.
- Laron Z (2001). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol*, 54: 311-316.
- Le Roith D, Quon MJ, Zick Y (2003). Molecular and cellular aspects of insulin resistance: Implications for diabetes. En: *Signal Transduction and Human Disease*. Edit: Finkel T, Gutkind JS. Hoboken, New Jersey. Wiley-Interscience, pp 171-200.
- Leblond CP (1963). Classification of cell populations in the basis of their proliferating behaviour. *NCI Monogr*, 14: 19-145.
- Lee MG, Nurse P (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle gene *cdc2*. *Nature*, 327: 31-35.
- Lee MG, Nurse P (1988). Cell cycle control genes in fission yeast and mammalian cells. *Trends in Genetics*, 4: 287-290.
- Lee AV, Jackson JG, Gooch JL (1999). Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol*, 13: 787-796.
- Leri A, Liu Y, Wang X, Kajustra J, Malhotra A, Me bggs LG, Anversa P (1999). Overexpression of insulin-like growth factor-1 attenuates the myocyte renin-angiotensin system in transgenic mice. *Circ Res*, 84: 752-762.
- Levinson DA, Hall PA, Woods AI, Yu C, Barnes DM, Wasseem N, Lane DP (1990). Evaluation of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) immunostaining as a marker of cell proliferation in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J Pathol*, 161.
- Li X, Hansen PA, Xi L, Chandraratna RAS, Burant CF (2006). Distinct mechanisms of glucose lowering by specific agonists for peroxisomal proliferator activated receptor  $\gamma$  and retinoic acid X receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 38317-38327.
- Liou YC, Ryo A, Huang HK, Lu PJ, Bronson R, Fujimori F, Uchida T, Hunter T, Lu KP (2002). Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling D1-null phenotypes. *Cell Biology*, 99: 1335-1340
- Little DV (1974). A third note on recent research in geometrical probability. *Advanc Appl Prob*, 6: 103.

- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf-1r). *Cell*, 75: 59-72.
- Liu SC, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR (1999) Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *J Biol Chem*, 274: 18093-18099.
- Liu Y, Shen W, Brubaker PL, Kaestner KH, Drucker DJ (2002). Foxa3 (HNF-3gamma) binds to and activates the rat glucagons gene promoter but is not essential for progucagon gene expression. *Biochem J*, 366: 633-341.
- Liu D, Ou L, Clemenson GD, Chao C, Lutske ME, Zambetti GP, Gage FH, Xu Y. (2010) Puma is required for p53-induced depletion of adult stem cells. *Nat Cell Biol*, 12: 993-998.
- Lizama C, Lagos CF, Lagos-Cabré R, Cantuarias L, Rivera F, Huenchuñir P, Pérez-Acle T, Carrion F, Moreno RD (2009). Calpain inhibitors Prevent p38 MAPK activation and germ cell apoptosis alter heat stress in pubertad rat testis. *J Cell Physiol* 221: 296-305.
- Lobie PE, Breipohl W, Aragon JG, Waters MJ (1990). Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. *Endocrinology*, 126: 2214-2221.
- Lobo MV, Arenas MI, Alonso F J, Gomez G, Bazan E, Paino CL, Fernandez E, Fraile B, Paniagua R, Moyano A, Caso E (2004). Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in Leydig cells of the human testis and in some specific cell types from human testicular tumours. *Cell Tissue Res*, 316: 369-376.
- Loud AV, Barany WC, Pack BA (1965). Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in electron micrographs. *Lab Invest*, 14: 996-1008.
- Ma X, Xu L, Gavrilova O, Mueller E (2014). Role of forkhead box protein A3 in age-associated metabolic decline. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111: 14289-14294.
- Ma X, Xu L, Mueller E (2015). Calorie hoarding and thriftig: Foxa3 finds a way. *Adipocyte*, 4: 325-328.
- Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B (2008). Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet*, 17: 2949-2955.
- Mackay S (2000). Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *Int Rev Cytol*, 200: 47-99.
- Maga G, Huhscher U (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci*, 116: 3051-3060.
- Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M, Olafsdottir K (2005). Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod*, 20: 208-215.
- Mah PM, Wittert GA (2010). Obesity and testicular function. *Mol Cell Endocrinol*, 316: 180-186.

- Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, Guise T, Sutherland A, Thorner M, Scoble H (2003). Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes & Development*, 18: 306-319.
- Malolina E, Kulibin AY, Naumenko VA, Gushchina EA, Zavalishina LE, Kushch AA (2014). Herpes simplex virus inoculation in murine rete testis results in irreversible testicular damage. *Int J Exp Pathol*, 95: 120-130.
- Maser RS, Wong KK, Sahin E, Xia H, Naylor M, Hedberg HM, Artandi SE, DePinho RA (2007). DNA-Dependent protein kinase catalytic subunit is not required for dysfunctional telomere fusion and checkpoint response in the telomerase-deficient mouse. *Mol Cell Biol*, 27: 2253-2265.
- Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JI (1984). Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, 303: 274-376.
- Mayhew TM, Cruz Orive LM (1973). Stereological correction procedures for estimating true volume proportions from biased samples. *J Microscopy*, 99: 287-299.
- McDonnell TJ, Korsmeyer SJ (1991). *Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18)*. *Nature* 349: 254-256. 1991.
- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM (2002). Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res*, 57: 149-179.
- Mendelsohn ML (1963). The growth fraction: A new concept applied to tumours. *Science*, 132: 1496-1497.
- Miles RE (1972). Multi-dimensional perspectives on stereology. *J Microscopy*, 95: 181.
- Minshall C, Arkins S, Dantzer R, Freund GG, Kelley KW (1999). Phosphatidylinositol 3'-kinase, but not S6-kinase, is required for insulin-like growth factor-1 and IL-4 to maintain expression of Bcl-2 and promote survival of myeloid progenitors. *J Immunol*, 162: 4542-4549.
- Mocanu MM, Nissen A, Eckermann K, Khlistunova I, Biernat J, Drexler D, Petrova O, Schönig K, Bujard H, Mandelkow E, Zhou L, Rune G, Mandelkow EM (2008). The potential for beta-structure in the repeat domain of tau protein determines aggregation, synaptic decay, neuronal loss, and coassembly with endogenous Tau in inducible mouse models of tauopathy. *J Neurosci*, 28: 737-748.
- Montero M, Sánchez F, Juanes JA, Blanco E, González R, Vázquez R, Carretero J (1990). Morphometric study of the ACTH-immunoreactive adenohypophyseal cells. *Anat*, 36: 47-54.
- Moorehead RA, Fata JE, Johnson MB, Khokha R (2001). Inhibition of mammary epithelial apoptosis and sustained phosphorylation of Akt/PKB in MMTV-IGF-II transgenic mice. *Cell Death and Differentiation*, 8: 19-29.
- Morelli C, Garofalo C, Bartucci M, Surmacz E (2003). Estrogen receptor- $\alpha$  regulates the degradation of insulin receptor substrates 1 and 2 in breast cancer cells. *Oncogene*, 22: 4007-4016.

- Mori H, Cristensen AK (1980). Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J Cell Biol*, 84: 340-354.
- Morstyn G, Pyke K, Gardner J, Ashcroft R, De Fazio A, Bhathal P (1986). Immunohistochemical identification of proliferating cells in organ culture using bromodeoxyuridine and monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem*, 34: 697-701.
- Myers MG, White MF (2002). The molecular Basis of Insulin Action. En: *Insulin Signaling: From cultured cells to Animal models*. Editor: Gruenberg G, Zick Y. Taylor and Francis, pp 55-87.
- Nagata, S (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365.
- Nakane PK, Moriuchi T, Koji T, Taniguchi Y, Izumi S, Hui L (1989). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin): review and some new findings. *Acta Histochem Cytochem*, 22: 105-116.
- Namikawa R, Ueda R, Suchi T, Itoh G, Ota K, Takahashi T (1987). Double immunoenzymatic detection of surface phenotype of proliferating lymphocytes in situ with monoclonal antibodies against DNA polymerase and lymphocyte membrane antigens. *Am J Clin Pathol*, 87: 725-731.
- Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli JD, Efstratiadis A, Accili D, Parada LF (2003). Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature*, 426: 291-295.
- Neganova I, Al-Qassab H, Heffron H, Selman C, Choudhury AI, Lingard SJ, Diakonov I, Patterson M, Ghatei M, Bloom SR, Franks S, Huhtaniemi I, Hardy K, Withers DJ (2007). Role of central nervous system and ovarian insulin receptor substrate 2 signaling in female reproductive function in the mouse. *Biol Reprod*, 76: 1045-1053.
- Neuenschwander S, Schwartz A, Wood TL, Roberts Jr CT, Henninghausen L (1996). Involution of the lactating mammary gland is inhibited by the IGF system in a transgenic mouse model. *J Clin Invest*, 97: 2225-2232.
- Nickerson T, Huynh H (1999). Vitamin D analogue EB1089-induced prostate regression is associated with increased gene expression of insulin-like growth factor binding proteins. *J Endocrinol*, 160: 223-229.
- Nicholson DW (1999). Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6: 1028-1042.
- Nielsen TL, Hagen C, Wraae K, Brixen K, Petersen PH, Haug E, Larsen R, Andersen M (2007). Visceral and subcutaneous adipose tissue assessed by magnetic resonance imaging in relation to circulating androgens, sex hormone-binding globulin, and luteinizing hormone in young men. *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 2696-2705.
- Nyberg F, Burman P (1996). Growth hormone and its receptors in the central nervous system location and functional significance. *Horm Res* 45: 18-22
- Oishi Y, Okuda M, Takahashi H, Fujii T, Morii S (1993). Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: influences of sex, estrous cycle, and circadian change. *Anat Rec*, 235: 111-120.

- Orazizadeh M, Khorsandi L, Absalan F, Hashemitabar M, Daneshi E (2014). Effect of beta-carotene on titanium oxide nanoparticles-induced testicular toxicity in mice. *J Assist Reprod Genet*, 31: 561-568.
- Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, 122: 787-794.
- Ozkurkcugil C, Yardimoglu M, Dalcik H, Erdogan S, Gokalp A (2004) Effect of insulin-like growth factor-1 on apoptosis of rat testicular germ cells induced by testicular torsion. *BJU international*, 93: 1094-1097.
- Pantaleon M, Whiteside EJ, Harvey MB, Barnard RT, Waters MJ, Kaye PL (1997). Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: a role for GH in early embryogenesis? *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5125-5130.
- Parrizas M, Saltiel AR, Le Roith D (1997). Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*, 272: 154-161.
- Payne AH HM, Russell LD (1996). *The Leydig cell*. Vienna, IL, USA. Cache River Press.
- Paz K, Zick Y (2002). Ser/Thr Phosphorylation of insulin receptor signaling molecules and insuline resistance. En: *Insulin signalling: from cultured cells to animal models*. Edit. Gruenberg G, Zick Y. Taylor & Francis. New York, pp259-280.
- Pérez CV, Gómez LG, Gualdoni GS, Lustig L, Rabinovich GA, Guazzone VA (2015). Dual roles of endogenous and exogenous galectin-1 in the control of testicular immunopathology. *Scientific reports*, 5.
- Pessin JE, Saltiel AR (2000). Signalin pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J clin Invest*, 106: 165-169.
- Petrusz P, Sar M, Ordroneau P, Dimeo P (1976). Specificity in immunocytochemical staining. *J Histochem Cytochem*, 24: 1110-1115.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365: 1663-1678.
- Piotrowska K, Sluczanska-Glabowska S, Kucia M, Bartke A, Laszczynska M, Ratajczak MZ (2015). Histological changes of testes in growth hormone transgenic mice with high plasma level of GH and insulin-like growth factor-1. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 53: 249-258.
- Pitetti JI, Calvel P, Zimmermann C, Conne B, Papaioannou MD, Aubry F, Cederroth CR, Urner F, Fumel B, Crausaz M, Docquier M, Herrera PL Pralong F, Germond M, Guillou F, Jégou B, Nef S (2013). An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating Sertoli cell proliferation, testis size and FSH action in mice. *Mol Endocrinol*, 27: 814-827.
- Plante G, Therien I, Manjunath P (2012). Characterization of recombinant murine binder of sperm Protein Homolog 1 and its role in capacitation. *Biol Reprod*, 87: 1-11.

- Plengvidhya N, Antonellis A, Wogan LT, Poleev A, Borgschulze M, Wrram JH, Ryffel GU, Krolewski AS, Doria A (1999). *Diabetes*, 48: 2099-2102.
- Prelich G, Stillman B (1988). Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA. *Cell*, 53: 117-126.
- Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase- $\delta$  auxiliary protein. *Nature*, 326: 517-520.
- Qi S, Fu W, Wang C, Liu C, Quan C, Kourouma A, Yan M, Yu T, Duan P, Yang K, (2014). BPA-induced apoptosis of rat Sertoli cells through Fas/FasL and JNKs/p38 MAPK pathways. *Reproductive Toxicology*, 50: 108-116.
- Qiu, H. Y., Chu, Y. L., Li, M., Sun, Y. Y., & Li, H. F. (2005). Tyrosine phosphorylation and protein expression of insulin receptor substrate-2 in the adipose tissue from patients with polycystic ovary syndrome. *Zhonghua fu chan ke za zhi*, 40: 116-119.
- Qu jh, Fei j, Hong X, Chen JF, Gu AH, Sun H, Xu XL, Song L, Wang SL, Wang XR (2012) Involvement of IGF-1 signaling pathway in the regulation of steroidogenesis in mouse Leydig cells treated with fenvalerate. *Toxicology*, 292: 151-155.
- Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS (1995) Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16: 271-321.
- Raff MC (1996). Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell*, 86: 173-175.
- Raman JD, Schlegel PN (2002). Aromatase inhibitors for male infertility. *J Urol* 167: 624-629.
- Ranawat P, Bansal MP (2009). Apoptosis induced by modulation in selenium involves p38 MAPK and ROS: implications in spermatogenesis. *Mol Cell Biochem*, 330: 83-95.
- Rasoulpour T, Di Palma K, Kolvet B, Hixon M (2006). Akt1 suppresses radiation induced germ cell apoptosis in vivo. *Endocrinology* 147: 4213-4221.
- Rasoulpour RJ, Boekelheide K (2005) NF-KappaB is activated in the rat testis following exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate. *Biol Reprod*, 72: 479-486.;
- Riabowol K, Draetta G, Brizuela L, Vandre D, Beach D (1989). The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell*, 57: 393-401.
- Richards RG, Walker MP, Sebastian J, DiAugustine RP (1998). Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) Receptor-Insulin Receptor Substrate Complexes in the Uterus altered signaling response to estradiol in the igf-1m/m mouse. *J Biol Chem*, 273: 11962-11969.
- Richburg J, Boekelheide K (1996). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 137: 42-45.;

- Richburg JH, Nañez A, Gao H (1999). Participation of the Fas signalling system in the initiation of germ cell apoptosis in young rat testes after exposure to Mono-(2-ethylhexil) phthalate. *Toxicol Appl Pharmacol*, 160: 271-278.
- Rinderknecht E, Humbel RE (1978). The aminoacid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253: 2769-2776.
- Rogers R, Ouellet G, Brown C, Moyer B, Rasoulpour T, Hixon M (2008). Cross-talk between the AKT and NF- $\kappa$ B signaling pathways inhibits MEHP-induced germ cell apoptosis. *Toxicological Sciences*, 16: 497-508.
- Rohr HP, Bartsch G, Oberholzer M, Reith A, Hollinger O (1978). Stereology. En: *Electron microscopy in human medicine. 1. Instrumentation and techniques*. Johannesen JV; Ed. McGraw-Hill International Book Company. London pp: 285-309.
- Röpke A, Tewes AC, Gromoll J, Kliesch S, Wieacker P, Tüttelmann (2013). Comprehensive sequence analysis of the NR5A1 in a large group of infertile males. *Eur J Hum Genet*, 21: 1012-1015.
- Rubio M, Carretero J, Sánchez F, Riesco JM, Vázquez RJ, Vázquez R (1992). Estradiol influences the LH response to met-enkephalin. *Acta Anat* 145: 382-386.
- Rubio M, Sánchez F, Carretero J, Riesco JM, Cabo L, Vázquez R (1994). Immunohistochemical-morphometric study of the LH-adenohypophyseal cells following chronic treatment with met-enkephalin. *Histol Histopathol*, 9: 221-226.
- Russel LD, Alger LE, Nequin LG (1987). Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinology*, 120: 1615-1632.
- Russell LD, Ettlín RA, Hikim APS, Clegg ED (1993). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *International Journal of Andrology*, 16: 83.
- Russell LD, Saxena NK, Turner TT (1989). Cytoskeletal involvement in spermiation and sperm transport. *Tissue Cell*, 21: 361-379.
- Sabatini ME, Guo L, Lynch MP, Doyle JO, Lee H, Rueda BR, Styer AK (2011). Metformin therapy in a hyperandrogenic anovulatory mutant murine model with polycystic ovarian syndrome characteristics improves oocyte maturity during superovulation. *J Ovarian Res*, 4: 8.
- Sadik NAH, El-Seweidy MM, Shaker OG (2011). The antiapoptotic effects of sulphurous mineral water and sodium hydrosulphide on diabetic rat testes. *Cell Physiol Biochem*, 28: 887-898.
- Sahin AA, Ro JY, El-Naggar AK, Wilson PL, Kim Teague HT, Blick M, Ayala AG (1991). Tumor proliferative fraction in solid malignant neoplasms. A comparative study of KI-67 immunostaining and flow cytometric determinations. *Am J Clin Pathol*, 96: 512-519.
- Sánchez F, Carretero J, Rubio M, Riesco JM, Vázquez R (1993). Morphometric analysis of the hypoactivity of FSH-immunoreactive cells in estrogen-primed male rats. *Acta Histochem*, 94: 125-130.
- Santalo LA (1936). *Geometría integral* 15. *Abhandlungen* 12.

- Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Shinozaki F, Takahashi M (1987). The cell cycle associated change of the KI 67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol*, 133: 579-584.
- Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, Van Moorden S, Price Y, Lane DP, Wright NA (1991). A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol*, 165: 173-178.
- Schneider C, King RM, Philipson L (1988). Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*, 54: 787-793.
- Schneider HJ, Pagotto U, Stalla GK (2003). Central effects of the somatotrophic system. *Eur J Endocrinol*, 149: 377-392.
- Schoeller EL, Albanna G, Forlova A, Moley KH (2012). Insulin rescues impaired spermatogenesis via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in akita diabetic mice and restores male fertility. *Diabetes*, 61: 1869-1878.
- Schumperli D (1986). A model for the regulation of ovulation in the rat. *Recent Prog. Horm Res*, 25: 1-55.
- Schwab KR, Smith GD, Dressler GR (2013). Arrested spermatogenesis and evidence for DNA damage in PTIP mutant testes. *Dev Biol*, 373: 64-71.
- Schwartz BR, Pinkus G, Bacus S, Toder M, Weinberg DS (1989). Cell proliferation in non-Hodgkin's lymphomas. Digital image analysis of KI 67 antibody staining. *Am J Pathol*, 134: 327-336.
- Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R (2001). Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *Faseb J*, 15: 2099-2111.
- Sesti G. (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 20: 665-679.
- Shafik A, Olfat S (1981). Scrotal lipomatosis. *Br J Urol*, 53: 50-54.
- Sharpe RM (2010). Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365: 1697-1712.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS (2003). Proliferation and functional maturation of sertoli cells, and their relevance to disorders of the testis function in adulthood. *Reproduction*, 125: 769-784.
- Sheperd NA, Richman PI, England J (1988). KI 67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol*, 155: 1213-1219.
- Shikone T, Billig H, Hsueh AJW (1994). Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol Reprod*, 51: 865-872.
- Shiraishi K, Ascoli M (2007). Lutropin/choriogonadotropin stimulate the proliferation of primary cultures of rat Leydig cells through a pathway that involves activation of the extracellular regulated kinase 1/2 cascade. *Endocrinology*, 148: 3214-3225.



- Soderlund D, Canto P, Carranza-Lira S, Mendez JP (2005). No evidence of mutations in the P450 aromatase gene in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*, 20: 965-969.
- Sorby H, (1856). On slaty cleavage as exhibited in the Devonian limestones of Devonshire. *Phil Mag*, 11: 20.
- Soriano E, Del Río JA (1991). Simultaneous immunocytochemical visualization of Bromodeoxyuridine and neural tissue antigens. *J Histochem Cytochem*, 39: 255-263.
- Spiteri-Grech J, Nieschlag E (1992). The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function. *Hum Res*, 38 Suppl 1: 22-27.
- Steiner DF, Oyer PE (1967). The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 57: 473-480.
- Sternberger L (1979). *Immunocytochemistry*. Wiley J, Sons, eds. New York 2<sup>a</sup> ed.
- Stör O, Hahn J, Moll L, Leiser U, Fraude S, Bernard C, Schilbach K, Markl A, Udelhoven M, Krone W, Schubert M (2011). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812: 573-580.
- Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348: 331-333.
- Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S, Harris AW (1991). Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 8661- 65.
- Sulston JE, Horvitz HR (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56: 110-156.
- Taguchi A, White MF (2008) Insulin-like signalling, nutrient omeostasis, and life span. *Ann Rev Physiol*, 70: 191-212.
- Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*, 372: 182-186.
- Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM (1986). An auxiliary protein for DNA polymerase delta from fetal calf thymus. *J Biol Chem*, 261: 1231-1236.
- Tanaka S, Hu SZ, Wang TSF, Korn D (1982). Preparation and preliminary characterization of monoclonal antibodies against DNA polymerase alfa. *J Biol Chem*, 257: 8386-8390.
- Tanaka Y, Mak KM, Lieber ChS (1990). Immunohistochemical detection of proliferating lipocytes in regenerating rat liver. *J Pathol*, 160: 129-134.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 85-96.
- Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, Orkin SH (2002). Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require di-

- rect interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development*, 129: 4627-4634.
- Thakur M, Chauhan NS, Sharma V, Dixit VK, Bhargava S (2012). Effect of Curculigo orchoides on hyperglycemia-induced oligospermia and sexual dysfunction in male rats. *Int J Impot Res*, 24: 31-37.
- Thompson EL, Amber V, Stamp GWH, Patterson M, Curtis AE, Cooke JH, Appleby GF, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR, Murphy KG (2009). Kisspeptin-54 at high doses acutely induces testicular degeneration in adult male rats via central mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 156: 609-625.
- Thompson, C.B (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Science*, 267: 1456-1462.
- Thordarson G, Lee AV, McCarty M, Van Horn K, Chu O, Chou YC, Talamantes F (2001). Growth and characterization of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumors in intact and ovariectomized rats. *Carcinogenesis*, 22: 2039-2047.
- Tseng YH, Ueki K, Kriauciunas KM, Kahn R (2002). Differential roles of insulin receptor substrates in the anti-apoptotic function of insulin-like growth factor-1 and insulin. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 31601-31611.
- Ullrich A, Schlessinger J (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61: 203-212.
- Underwood EE (1970). *Quantitative sterology*. Addison Wesley, Massachusetts.
- Vassen L, Wegrzyn W, Klein-Hitpass L (1999). Human insulin receptor substrate-2 (IRS-2) is a primary progesterone response gene. *Mol Endocrinol*, 13: 485-494.
- Valverde AM, Fabregat I, Burks DJ, White MF, Benito M (2004). IRS-2 mediates the antiapoptotic effect of insulin in neonatal hepatocytes. *Hepatology*, 40: 1285-1294.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335: 440-442.
- Vázquez-Perfecto RJ (1994). Estradiol, testosterona, corticosterona y dopamina como reguladores de la proliferación de las células VIPérgicas hipofisarias de la rata. Tesis Doctoral en Medicina. Universidad de Salamanca.
- Veroni JW, Costa A, Motta R, Giardini R, Rilke F, Silvestrini R (1988). Comparative analysis of (H3)-Thymidine labeling index and monoclonal antibody KI 67 in non-Hodking's lymphoma. *Haemathol Oncol*, 6: 21-28.
- Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR (1999). Protein-protein interaction in insulin signalling and the molecular mechanism of insulin resistance. *J Clin Invest*, 103: 931-934.
- Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 103: 931-943.
- Vogt C (1842). *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkrote*. Alytes obstetricians, JU Gassman. 130pp.

- Voliovitch H, Schindler DG, Hadari YR, Taylor SI, Accili D, Zick Y (1995). Tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in vivo depends upon the presence of its pleckstrin homology region. *J Biol Chem*, 270: 18083-18087.
- Vosoughi SH, Khavanin A, Salehnia M, Asilian Mahabadi H, Esmaeili V. (2013) Adverse effects of formaldehyde vapour on mouse sperm parameters and testicular tissue. *Int J Fertil, Steril* 6: 250-257.
- Wagner MS, Wajner SM, Maia AL (2008). The role of thyroid hormone in testicular development and function. *J Endocrinol*, 199: 351-365.
- Wahl AF, Geis AM, Spain BH, Wong SW, Korn D, Wang TSF (1989). Gene expression of human DNA polymerase during cell proliferation and the cell cycle. *Mol Cell Biol*, 8: 5016-5025.
- Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ (2012). Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome. *Biol Reprod*, 86: 1-12.
- Wang E (1985). Rapid disappearance of statin, a non proliferating and senescent cell specific protein, upon reentering the process of the cell cycling. *J Biol*, 101: 1696-1701.
- Wang P, Luo C, Li Q, Chen S, Hu Y (2014). Mitochondrion-mediated apoptosis is involved in reproductive damage caused by BPA in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38: 1025-1033.
- Wang ZX, Wreford NG, De Krester DM (1989). Determination of sertoli cell numbers in the developing rat testis by stereological methods. *Int J Androl*, 12: 58-64.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NO, Jenkins NA, Nagata S (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 356: 314-17.
- Weibel ER (1969). Stereological principles for morphometric in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*, 26: 235-302.
- Weibel ER, Bolander RP (1973). Stereological techniques for electron microscopy. En: Principle and techniques of electron microscopy (Hyatt M.A. ed.). Van Nostran-Reinhold. New York pp: 239-296.
- Weibel ER, Kistler GS, Tondury G (1966). A stereologic electron microscope study of "tubular myelin figures" in alveolar fluids of rat lungs. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 69: 418-427.
- Werther GA, Russo V, Baker N, Butler G (1998). The role of insulin-like growth factor system in developing brain. *Horm Res*. 49(suppl1): 37-40.
- White MF (1997). The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2:S2-17.
- White MF (1998). The IRS –signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem*, 182: 3-11.
- White M. F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Metab*, 283: E413-E422.

- Wijmsman J, Van Dierendonk J, Keijzer R, Van de Velde C, Cornelisse C (1992). Immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen compared with bromodeoxyuridine incorporation in normal and neoplastic rat tissue. *J Pathol*, 168: 75-83.
- Winters SJ, Wang C, Abdelrahman E, Hadeed V, Dyky MA, Brufsky A (2006) Inhibin-B levels in healthy young adult men and prepubertal boys: is obesity the cause for the contemporary decline in sperm count because of fewer Sertoli cells? *J Androl*, 27: 560-564.
- Withers DJ (2001). Insulin receptor substrate proteins and neuroendocrine function. *Biochem Soc Trans*, 29: 525-529.
- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391: 900-904.
- Wright NA (1984). Cell proliferation in health and disease. En: *Recent advances in histopathology* (Anthony PP, McSween RM eds.). Edinburgh: Churchill Livingstone, 12: 17-33.
- Wu JC, Gregory CW, DePhilip RM (1993) Expression of E-cadherin in immature rat and mouse testis and in rat Sertoli cell cultures. *Biol Reprod*, 49: 1353-1361.
- Wu XK, Risto E (2004). Ovarian insulin resistance and insulin sensitizer effect on polycystic ovary syndrome. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 39: 804-808.
- Xie P, Liu ML, Gu YP, Lu J, Xu X, Zeng WM, Song HP (2003). Oestrogen improves glucose metabolism and insulin signal transduction in HepG2 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30: 643-648.
- Xu L, Panel V, Ma X, Du C, Hegendubler L, Gavrilova O, Liu A McLaughlin T, Kaestner KH, Mueller E (2013). The winged helix transcription factor Foxa3 regulates adipocyte differentiation and depot-selective fat tissue expansion. *Mol Cell Biol*, 33: 3392-3399.
- Yan HH, Mruk DD, Cheng CY (2008) Junction restructuring and spermatogenesis: the biology, regulation, and implication in male contraceptive development. *Curr Top Dev Biol*, 80: 57-92.
- Yi X, Schubert M, Peschey NS, Suzuma K, Burks DJ, Kushner JA, Suzuma I, Cahill C, Flint CL, Dow MA, Leshan R, King GL, White MF (2005). Insulin receptor substrate 2 is essential for maturation and survival of photoreceptor cells. *The Journal of Neuroscience*, 25: 1240-1248.
- Yomogida K, Ohtani H, Harigae H, Ito E, Nishimune Y, Engel JD, Yamamoto M (1994) Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development*, 120: 1759-1766.
- Yoon MJ, Berger T, Roser JF (2011). Localization of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor (IGF-1R) in equine testes. *Reprod Domest Anim*, 46: 221-228
- Yoon MJ, Roser JF (2010). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) protects cultured equine Leydig cells from undergoing apoptosis. *Animal Reproduction Science*, 122: 353-358.

- Youngren J. (2007). Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 873-891.
- Zachmann M (1992) Interrelations between growth hormone and sex hormones: physiology and therapeutic consequences. *Horm Res* 38 Suppl 1:1-8.
- Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK (2011). Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813: 1978-1986.
- Zhang W, Ghetti B, Lee WB (1997) Decreased IGF-1 gene expression during the apoptosis of Purkinje cells in pcd mice. *Brain Res Dev Brain Res*, 98: 164-176.
- Zoch A, Mayerl S, Schulz A, Greither T, Farppart L, Rübsam J, Heuer H, Giovannini M, Morrison H (2015). Merlin isoforms 1 and 2 both act as Tumour suppressors and are required for optimal sperm maturation. *PLoS ONE* 10(8): e0129151.