



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00096

Matrícula: 2183806566

ALTERACIONES TESTICULARES EN LA DIFERENCIACIÓN DE GONOCITOS Y SUS EFECTOS EN LA ETAPA JUVENIL DE RATAS CON HIPOTIROIDISMO CONGENITO.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 16:00 horas del día 24 del mes de marzo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado por la Comisión del Posgrado:

DRA. KARLA BERENICE SANCHEZ HUERTA
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DE: ANDREA GOMEZ ZUÑIGA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DRA. KARLA BERENICE SANCHEZ HUERTA

VOCAL

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL

M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA

SECRETARIO

DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**“ALTERACIONES TESTICULARES EN LA DIFERENCIACIÓN DE
GONOCITOS Y SUS EFECTOS EN LA ETAPA JUVENIL DE
RATAS CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO”**

M T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA
DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

P R E S E N T A

BIÓL. EXP. ANDREA GÓMEZ ZÚÑIGA

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTORAS:

DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

ASESORA:

DRA. KARLA BERENICE SÁNCHEZ HUERTA

Ciudad de México, a 24 de marzo de 2021

COMITÉ DE TUTORES

Co-directora externa

Investigadora en Ciencias Biomédicas

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Laboratorio de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de Pediatría

Correo electrónico: rmviguera@yahoo.com.mx

Co-directora interna

Profesora-Investigadora. Titular "C" T.C

Dra. Marcela Arteaga Silva

Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva, División de Ciencias Biológicas y
de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: arteaga1967@hotmail.com

Asesora

Investigadora en Ciencias Biomédicas

Dra. Karla Berenice Sánchez Huerta

Laboratorio de Neurociencias. Instituto Nacional de Pediatría

Correo electrónico: karlasanchezhuerta@hotmail.com

JURADO DE EXAMEN

Presidenta

Dra. Karla Berenice Sánchez Huerta

Laboratorio de Neurociencias.

Instituto Nacional de Pediatría

Correo electrónico: karlasanchezhuerta@hotmail.com

Secretario

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

Laboratorio de Biología Molecular y toxicología de la gametogénesis

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: ivan.bahena@gmail.com

Vocal

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Laboratorio de Biología Celular

Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa

Correo electrónico: reynacarmen2@hotmail.com

Vocal

M. en C. Pedro Cuapio Padilla

Laboratorio de Andrología, Banco de Semen, Calidad e Investigación. Hisparep

Clínica de Reproducción Asistida, Hospital Español

Correo electrónico: cuapiopp@yahoo.com.mx

El programa de la **Maestría en Biología de la Reproducción Animal** de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el **Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC)** con número de registro 003797.

Este trabajo se llevó a cabo en el **Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría**. Contó con recursos **Fiscales** del programa E-022, del Instituto Nacional de Pediatría para el financiamiento del proyecto **INP-19/2018**.

Se recibió apoyo mediante una beca del **CONACyT** para estudios de posgrado con número de registro CVU: 944485.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**ALTERACIONES TESTICULARES EN LA DIFERENCIACIÓN DE GONOCITOS Y SUS EFECTOS EN LA ETAPA JUVENIL DE RATAS CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO**” con fecha 24 de marzo de 2021.

PRESIDENTA

Dra. Karla Berenice Sánchez Huerta

SECRETARIO

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

VOCAL

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

VOCAL

M. en C. Pedro Cuapio Padilla



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00095
Matrícula: 2183806566

ALTERACIONES TESTICULARES EN LA DIFERENCIACIÓN DE GONOCITOS Y SUS EFECTOS EN LA ETAPA JUVENIL DE RATAS CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 16:00 horas del día 24 del mes de marzo del año 2021 POR VIA REMOTA ELECTRONICA, los suscritos miembros del jurado por la Comisión del Posgrado:

DRA. KARLA BERENICE SANCHEZ HUERTA
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

Bajo la Presidencia del primero y con caracter de Secretario el ultimo, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ANDREA GOMEZ ZUÑIGA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

[Handwritten signature]
ANDREA GOMEZ ZUÑIGA
ALUMNA

REVISÓ
[Handwritten signature]
MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS
[Handwritten signature]
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE
[Handwritten signature]
DRA. KARLA BERENICE SANCHEZ HUERTA

VOCAL
[Handwritten signature]
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL
[Handwritten signature]
M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA

SECRETARIO
[Handwritten signature]
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella

Entonces entenderás justicia, juicio y equidad, y todo buen camino. Cuando la sabiduría entrare en tu corazón y la ciencia fuere grata a tu alma.

Pr. 2:9-10

DEDICATORIAS

A mi padre **Pascual Gómez Hernández** por ser mi ejemplo de dedicación, constancia, alegría, humildad, Fe y amor, porque no tengo con que pagar todo lo que has hecho por la familia. Te amo.

A mi madre **Nohemí Zúñiga Rodríguez** por darme el regalo máspreciado que es la vida, porque mientras haya vida hay esperanza.

A mis hermanos, **Sarai** por ser esa hermosa compañía, por ser mi brazo fuerte en toda ocasión, por tanto amor que das a todos los que te rodean. Gracias, y **Lino** por ser nuestro gran apoyo de casa y porque amo la hermandad que tenemos los tres.

A mis bichos:  *Bolita*, porque peleamos juntos hasta final, descansa en las nubes pequeño, *Katty*, *Matty*  *Peluche*, *Osa*, *Zury* y *Canela* porque estos seres me recuerdan que son la creación más perfecta del universo. 

A la familia **Maturano Carrera**, por haber sido una pieza importante en mi formación, gracias por tanto cariño, los llevo en mi corazón

A mi amiga **Julieta** gracias por 18 años de amistad y por siempre estar conmigo.

A los más grandiosos amigos que esta maestría me permitió conocer, **Edwin**, **Miguel**, **Luisa** y **Adyeni**, por su apoyo, sus risas, las aventuras y todo su cariño. LOS QUIERO.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor. Por abrirme las puertas, gracias por todo lo que aprendí de usted, por las charlas personales y académicas y por la confianza. Gracias por ser una excelente tutora y una lindísima persona, es una gran inspiración para seguir en esta carrera tan bonita.

Dra. Marcela Arteaga Silva, muchas gracias por la confianza y por el aprendizaje de cada una de sus clases, **Dra. Karla Sánchez Huerta,** infinitas gracias a todas sus observaciones tan acertadas, gracias por el apoyo y gracias por permitirme ser su alumna.

Al **Técnico Pedro Medina Granados,** muchas gracias por todo, todo su apoyo, gracias por todo el trabajo, siempre dispuesto, es un gran ejemplo de dedicación. **Edgar Cervantes,** gracias por apoyar a la realización de este proyecto.

A la **Dra. Margarita D. Chávez Saldaña** y al **Dr. Daniel A. Landero Huerta** gracias por sus comentarios tan precisos y muchas gracias por todas las pláticas. Al **Dr. Julio Rojas** muchas gracias por todas sus observaciones a este proyecto.

A mis compañeras del laboratorio de Biología de la Reproducción del INP, **M. en C. Fabiola García** y **M. en C. Norma Hernández,** muchas gracias por las pláticas y por todo su apoyo.

A los miembros del Jurado **Dra. Reyna Fierro,** **M. en C. Pedro Cuapio** y **Dr. Iván Bahena,** por sus observaciones tan acertadas y su amable atención al presente trabajo.

A cada profesor, a la coordinación y cada miembro de la **Maestría de Biología de la Reproducción Animal,** gracias por el tiempo.

ÍNDICE

RESUMEN -----	15
1. INTRODUCCIÓN -----	16
1.1. Glándula tiroides-----	16
1.1.1. Anatomía e histología-----	16
1.1.2. Desarrollo embrionario-----	17
1.1.3. Hormonas tiroideas-----	17
1.1.3.1. Regulación y producción hormonal -----	17
1.2. Hipotiroidismo congénito-----	22
1.2.1. Etiología -----	22
1.2.2. Incidencia-----	22
1.3. Hormonas tiroideas y la función reproductiva-----	23
1.4. Función reproductiva-----	25
1.4.1. Proliferación y diferenciación de células testiculares postnatales-----	25
1.4.1.1. Diferenciación de gonocitos testiculares-----	25
1.4.1.2. Proliferación de células de Sertoli-----	29
1.4.1.3. Diferenciación de células de Leydig-----	29
1.4.2. Espermatogénesis-----	30
1.4.2.1. Célula de Sertoli-----	32
1.4.2.2. Células de Leydig-----	34
1.4.3. Regulación endocrina de la espermatogénesis-----	35
2. ANTECEDENTES -----	37
2.1. El hipotiroidismo en la fertilidad-----	37
2.2. Hipotiroidismo congénito y células testiculares en modelos experimentales-----	38
2.3. Alteraciones de los parámetros espermáticos en el HC-----	39
2.4. Perfil endocrino reproductivo en el HC-----	40
3. JUSTIFICACIÓN -----	41
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN -----	42
5. HIPÓTESIS -----	42
6. OBJETIVOS -----	42

6.1. Objetivo particular-----	42
6.2. Objetivos particulares-----	42
7. DISEÑO EXPERIMENTAL-----	43
7.1. Población de estudio-----	43
7.1.1. Peso corporal y peso testicular -----	44
7.2. Valoración espermática-----	44
7.3. Procesamiento de material biológico-----	45
7.3.1. Procesamiento de material para inclusión en EPON-----	45
7.3.2. Análisis histológico-----	45
7.3.3. Procesamiento de material para inclusión en parafina-----	46
7.3.4. Inmunohistoquímica para el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)-----	47
7.4. Análisis estadístico-----	47
8. RESULTADOS-----	47
8.1. Peso corporal peso testicular -----	47
8.2. Glándula tiroides-----	48
8.3. Área del cordón/tubo seminífero-----	49
8.4. Número de gonocitos-----	50
8.5. Índice de diferenciación-----	51
8.6. Número de espermatoцитos-----	51
8.7. Número de células de Sertoli/área del cordón seminífero-----	52
8.8. Índice de maduración del epitelio seminífero (Johnsen)-----	53
8.9. Índice histopatológico-----	54
8.10. Inmunohistoquímica PCNA-----	56
8.11. Parámetros espermáticos-----	57
9. DISCUSIÓN-----	58
10. CONCLUSIÓN-----	66
11. BIBLIOGRAFÍA-----	66
ANEXOS-----	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la glándula tiroides

Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides

Figura 3. Síntesis de hormonas tiroideas

Figura 4. Unión a receptores tiroideos

Figura 5. Incidencia de HC por estado de la República Mexicana

Figura 6. Efectos de t3 en células de Sertoli y células germinales

Figura 7. Ciclo del epitelio seminífero de la rata

Figura 8. Estructura de la célula de Sertoli

Figura 9. Compartimento de gonocitos en el cordón seminífero fetal/neonatal

Figura 10. Diseño experimental

Figura 11. Fotomicrografías de cortes histológicos de la glándula tiroides

Figura 12. Graficas que muestran el área del cordón/tubo seminífero para los grupos con HC.

Figura 13. Graficas que muestran el número de gonocitos totales para los grupos con HC.

Figura 14. Graficas que muestran el índice de diferenciación para los grupos con HC.

Figura 15. Grafica que muestra el número de espermatocitos para el grupo de 16 dpn con HC.

Figura 16. Graficas que muestran el número de células de Sertoli/área del cordón seminífero en grupos con HC.

Figura 17. Graficas que muestran el índice de maduración del epitelio seminífero en grupos con HC. $\bar{x} \pm DE$.

Figura 18. Graficas que muestran el índice de histopatológico dentro de cordón/tubo seminífero en grupos con HC.

Figura 19. Cortes histologicos que muestran los daños generados por el HC en los grupos de 3, 5 y 8 dpn.

Figura 20. Cortes histologicos que muestran los daños generados por el HC en los grupos de 10,16 y 64 dpn.

Figura 21. Se muestra inmunoreactividad para PCNA en los cordones seminíferos de rata de 10 dpn con HC.

Figura 22. Esquema en donde se propone los posibles mecanismos del daño en la fertilidad generado por HC.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Peso corporal de ratas con HC

Tabla 2. Peso testicular en animales con HC

Tabla 3. Área del cordón/tubo seminífero para los grupos con HC.

Tabla 4. Índice de diferenciación de gonocitos

Tabla 5. Parámetros espermáticos de grupo control

ABREVIATURAS

HTs: Hormonas tiroideas

T₃: Triyodotironina

T₄: Tiroxina

DG: Días de gestación

DPC: Días postcoito

DPN: Días postnatal

TSH: Hormona estimulante de la tiroides

TRH: Hormona liberadora de tirotropina

NIS: Simportador sodio/yoduro

TPO: Tiroperoxidasa

MIT: Monoyodotironina

DIT: Diyodotironina

T₂: Diyodotironina

TGB: Globulina fijadora de tiroxina

TTR: Transtiretina

TR: Receptor de hormonas tiroideas

RXR: Receptor X retinoide

HC: Hipotiroidismo congénito

LH: Hormona luteinizante

NCAM: Molécula de adhesión de células neurales

AMH: Hormona antimülleriana

FSH: Hormona folículo estimulante

AR: Ácido retinoico

RA: Receptor de andrógenos

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

STRA8: Gen estimulado por el ácido retinoico 8

StAR: Proteína reguladora esteroideogénica aguda

MMI: Metimazol

IGS: Índice gonadosomático

RESUMEN

Introducción. La deficiencia de hormonas tiroideas al nacimiento es conocido como hipotiroidismo congénito (HC), esta patología puede alterar algunas funciones reproductivas interviniendo en el proceso de espermatogénesis desde etapas tempranas como lo es la diferenciación de gonocitos, lo que podría repercutir en la etapa juvenil y por lo tanto en la fertilidad futura. **Objetivo.** Determinar si la diferenciación de los gonocitos se ve afectada por el HC y si este hecho afecta la calidad del epitelio seminífero y algunos parámetros espermáticos en animales juveniles. **Material y métodos.** Se formaron dos grupos de ratas, control y con HC. El HC se desarrolló administrando Metimazol del día 16 de gestación hasta la eutanasia (días 3, 5, 8, 10, 16 y 64 postnatal). Se extrajeron testículos y se procesaron para su inclusión en EPON. Se obtuvieron cortes y se observó la diferenciación de gonocitos, el número de células de Sertoli, se determinó el área y el índice de maduración del epitelio seminífero, así como las alteraciones histológicas y la vitalidad, morfología y concentración espermática. Los resultados fueron analizados empleando una *t-student* ($p < 0.05$). **Resultados.** Las ratas con HC al compararse con el grupo control, los gonocitos no se diferenciaron correctamente y por consiguiente hubo una reducción en el número de células germinales y un aumento en el número de células de Sertoli. Se observó, reducción en la maduración y el área del epitelio seminífero con hipoplasia de células germinales. También se presentó aumento en las alteraciones histológicas ($P < 0.05$) y no se encontraron espermatozoides presentes. **Conclusiones.** La deficiencia de hormonas tiroideas durante el desarrollo intrauterino y la etapa neonatal altera proceso de diferenciación de los gonocitos. Esto repercute en la citoarquitectura, población de células germinales, así como en los parámetros espermáticos en la etapa juvenil.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Glándula tiroides

1.1.1. Anatomía e histología

La tiroides es una glándula endocrina en forma de mariposa situada en la parte inferior del cuello. Está presente al frente y a los lados de la tráquea. Su importancia radica en el papel que juega en la regulación de la tasa metabólica basal, además de estimular el crecimiento somático y neurológico (Khan y Farhana, 2019). Esta glándula de color óxido, consta de dos lóbulos conectados por un istmo estrecho, ubicado ventro-lateral a la tráquea justo debajo de la laringe. Las células de la glándula tiroides humana, está compuesta por folículos, muy distendidos y cubiertos por un epitelio aplanado, lleno de sustancia coloide, consistente con un bajo nivel de actividad tiroidea (Figura 1). En algunos pequeños mamíferos como la rata, los folículos de la glándula tiroides difieren en el tamaño, ya que son más pequeños, contienen menos coloide y están recubiertos por células epiteliales cubicas más gruesas consistente con un mayor nivel de actividad tiroidea (Choksi *et al.*, 2003). El coloide es un producto secretor que contiene tiroglobulina, el cual es el precursor de las hormonas tiroideas (HTs) activas llamadas 3.5.3'-triyodotironina o triyodotironina y 3.5.3', 5'-tetrayodotironina o tiroxina (T_3 y T_4 respectivamente) (Picut y Parker, 2017).

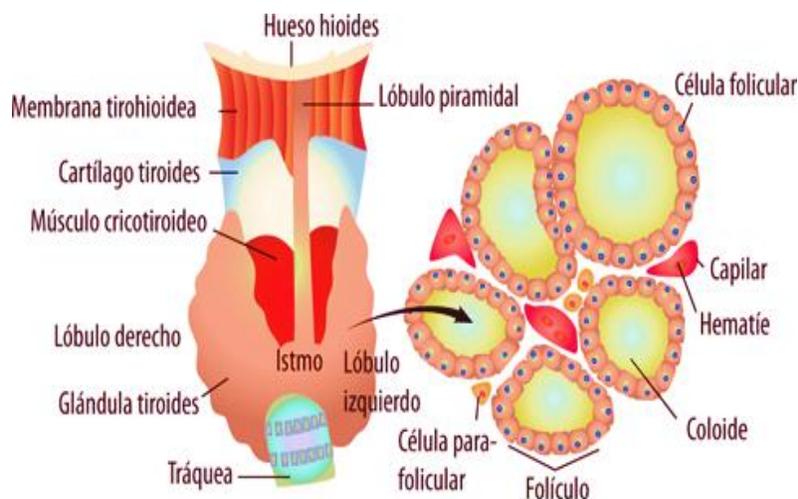


Figura 1. Anatomía de la glándula tiroides (Fernandez-Tresguerres *et al.*, 2010)

1.1.2. Desarrollo embrionario

La glándula tiroides se desarrolla a partir de la cresta neural y el piso de la faringe primitiva, entre las bolsas faríngeas cerca de la base de la lengua. En la tercera semana, alrededor del día 20 a 24 y en ratas a partir del día de gestación (DG) 11, las células endodérmicas de la faringe primitiva proliferan, creando el divertículo tiroideo. El divertículo tiroideo migra caudalmente a lo largo de la línea media, cruzando con anterioridad al hueso hioides y al cartílago laríngeo. Durante la migración, la tiroides permanece unida a la lengua a través del conducto tirogloso. La división de la tiroides en lóbulos derecho e izquierdo ocurre en los humanos en la quinta semana mientras que para ratas sucede en el 12.5 DG. Para la séptima semana en humanos y en ratas en el 14 DG, la tiroides ha alcanzado su destino final en el cuello. La diferenciación y maduración celular continúan hasta que la tiroides está funcionalmente madura en la duodécima semana de gestación en humanos y el 15.5 DG en ratas (Rosen y Sapra, 2019). La glándula tiroides se activa a las 24 semanas de gestación en humanos y en el DG 17 en ratas. En ratas, el desarrollo de la glándula tiroides se retrasa relativamente y este retraso es evidente desde la etapa fetal hasta la vida postnatal (Kawaoi, 1987; Choksi *et al.*, 2003). Por lo tanto, en la rata, gran parte del desarrollo de los órganos fetales depende de la fuente materna de hormona tiroidea.

1.1.3. Hormonas tiroideas

1.1.3.1. Regulación y producción hormonal

En mamíferos, la funcionalidad de la glándula tiroides se rige por la participación del eje hipotálamo-hipófisis, el cual regula la liberación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH). El hipotálamo secreta la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), que estimula a los tirotrópos en la hipófisis anterior para secretar TSH, esta, es liberada por la hipófisis anterior para estimular a las células foliculares de la tiroides.

Además, la TSH es inhibida por otras hormonas (somatostatina y la dopamina). TSH incrementa o disminuye por la actividad de las concentraciones séricas de T_3 y T_4 (Figura 2) (Stathatos, 2012).

En las células foliculares, el yoduro del plasma se concentra a través de un mecanismo de transporte ejecutado por el simportador de sodio/yoduro (NIS) ubicado en la membrana basolateral. Una vez que el yoduro alcanza el citoplasma de la célula folicular, éste tendrá que ser liberado al coloide que está enriquecido con tiroglobulina en la superficie apical del folículo. Esto parece ser una función de otra proteína llamada pendrina, que es un intercambiador de cloruro/yoduro, que promueve el flujo de yoduro en los coloides. Dentro del folículo tiroideo, la tiroperoxidasa (TPO) oxida al yoduro convirtiéndolo en yodo molecular en el citoplasma del folículo tiroideo. Por otro lado, la TPO cataliza la unión del yodo a los residuos de tirosina de la tiroglobulina en el coloide, es decir, fuera de la célula folicular. Los defectos en cualquiera de estos pasos pueden provocar hipotiroidismo congénito. Inicialmente, la TPO forma yodo por oxidación del ion yoduro. Cuando la TSH estimula el folículo tiroideo, la TPO une covalentemente el yodo a la tirosina de la molécula de tiroglobulina dentro del coloide.

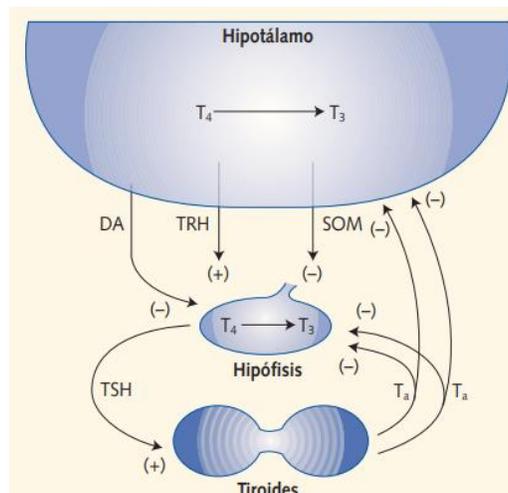


Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. El hipotálamo influye sobre la secreción de la hipófisis de forma positiva (a través de TRH) o negativa (por la secreción de dopamina: DA, o somatostatina: SOM). La TRH estimula la hipófisis para favorecer la secreción de TSH, ésta estimula a la tiroides para segregar T_4 y T_3 (T_a), las cuales también pueden participar negativamente en la secreción de TRH en el hipotálamo o TSH en la hipófisis (Ares-Segura, 2009).

Si un yodo se une covalentemente a la tirosina en la tiroglobulina, esto forma monoyodotirosina (MIT). Si dos yodos se unen covalentemente a la tiroglobulina, esto forma diyodotirosina (DIT). La TPO luego acopla un MIT con un DIT para formar T₃, o una molécula de DIT con otro DIT para formar T₄. Después de que se ha producido el acoplamiento, las HTs se almacenan y sólo se liberan cuando la molécula de tiroglobulina vuelve a las células foliculares. Estimulado por TSH, las células foliculares capturan las gotas de tiroglobulina mediante un proceso de pinocitosis. La fusión de las gotas con lisosomas da como resultado la hidrólisis de las moléculas de tiroglobulina y por lo tanto la liberación de T₄ y T₃ (Figura 3). Aproximadamente el 10% de T₄ se somete a monodesyodación para formar T₃ antes de que sea secretada y el yodo liberado sea reciclado (Nussey y Whitehead, 2001; Rousset *et al.*, 2015).

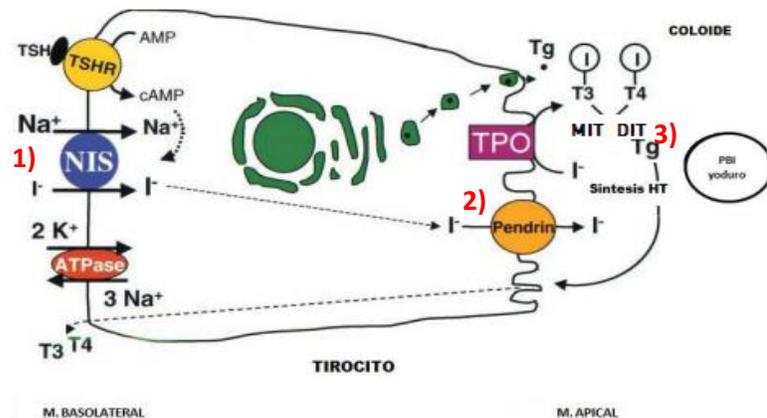


Figura 3. Síntesis de las hormonas tiroideas. Se muestra el proceso de síntesis de las hormonas tiroideas en las células foliculares y el coloide tiroideo de la glándula tiroidea, a través de los siguientes pasos: 1) Transporte de yoduros al interior de la célula folicular a través del transportador NIS, 2) Transporte de yoduros al coloide a través de la pendrina. 3) La incorporación del yoduro a la Tg es catalizada por la TPO resultando en la formación de yodotirosinas (MIT, DIT) sobre la Tg. ATPasa (bomba de Na⁺/K⁺+ATPasa), TSHR (receptor para tirotropina), AMP (adenosín monofosfato), cAMP (adenosín monofosfato cíclico). Modificado de Spitzweg y Morris, (2002).

Aproximadamente el 80% de la producción intracelular y el metabolismo de las hormonas tiroideas se produce mediante la eliminación enzimática secuencial de yodo

de las moléculas (Kelly, 2000). Las deiodasas tipo 1 y tipo 2, que eliminan el yodo de la posición 5' en las hormonas tiroideas, convierten T_4 en T_3 en los tejidos periféricos. Las HTs libres difunden a la sangre, donde forman complejos reversibles con proteínas de unión para su transporte a otros tejidos. Existen tres proteínas de unión diferentes y que son dependientes de especies: globulina fijadora de tiroxina (TBG), transtiretina (TTR); también llamada prealbúmina ligada a la tiroides y albúmina (serpina) (Flink *et al.*, 1986; Robbins, 2000). TBG es la principal proteína del plasma humano normal, (Kaneko, 1989; Robbins, 2000), mientras que, para roedores, es la albúmina (Choksi *et al.*, 2003).

Una vez en los tejidos, las HTs inician su actividad biológica por la unión a sus receptores tiroideos (TR), que tienen una afinidad preferencial por T_3 . Los receptores de T_3 son miembros de una familia de factores de transcripción nuclear que, en combinación con otros factores de transcripción, regulan la expresión génica en las células diana y su efecto ocurre en prácticamente todas las células del organismo. Los TR son codificados por dos genes *c-erb A α* en el cromosoma 17, el cual codifica para tres receptores de proteínas α_1 , α_2 and α_3 y *c-erb A β* en el cromosoma 3 que codifica para los receptores β_1 , β_2 y β_3 (Wrutniak-Cabello *et al.*, 2001). Las HTs son solubles en lípidos y cruzan fácilmente las membranas celulares, sin embargo, en los últimos años se sabe que necesitan transportadores de membrana plasmática para llegar a sus receptores. Varios transportadores de diferentes familias de genes median la captación de HTs en las células. El transportador monocarboxilato 8 es un ejemplo de transportador de HTs específico (Braun y Schweizer, 2018). Una vez dentro del núcleo, T_3 se une a su TR, este se dimeriza con otro TR de T_3 (para formar un homodímero) o con un receptor diferente, especialmente el receptor x retinoide (RXR), para formar un heterodímero. De esta forma, los dímeros interactúan con el ADN. Esto ocurre entre sitios de reconocimiento en los “dedos de zinc” de los dominios de unión al ADN de los receptores y secuencias de bases particulares en la hélice de ADN conocidas como elementos de respuesta hormonal (Figura 4) (Nussey y Whitehead, 2001).

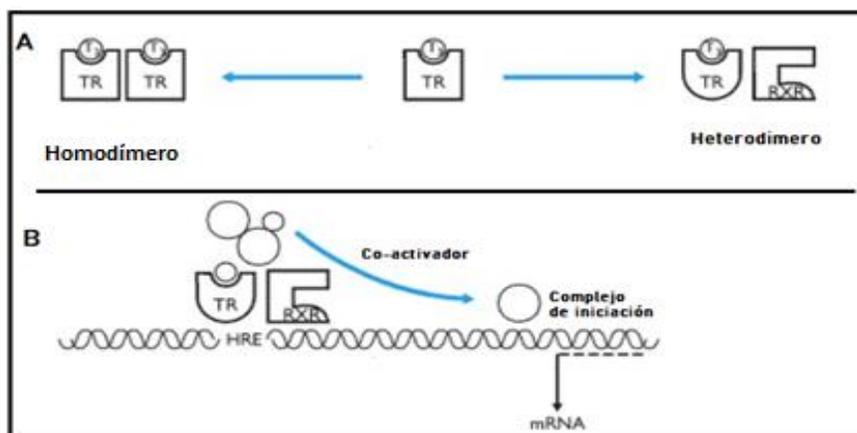


Figura 4. Unión a receptores tiroideos. **A:** La unión de T₃ a los TR provoca la formación de homo o heterodímeros. **B:** Los dedos de zinc del dominio de unión al ADN de los receptores se insertan en los HRE en la hélice del ADN. Junto con otros factores de transcripción (coactivadores/represores), que regulan la expresión génica (Modificado de Nussey y Whitehead, 2001).

Las HTs actúan generalmente aumentando su función y metabolismo:

- a) Corazón: Las HTs activan y aumentan el calcio intracelular del miocardio para aumentar la fuerza y la velocidad de contracción (Omidi *et al.*, 2020).
- b) La tasa metabólica basal: la producción de calor y el consumo de oxígeno se elevan. La absorción de glucosa y ácidos grasos aumentan, así como la oxidación. (Maradonna y Carnevali, 2018; Cioffi *et al.*, 2018; Khakisahneh *et al.*, 2019).
- c) La frecuencia respiratoria en reposo y la ventilación se estimulan con la T₃, para normalizar la concentración de oxígeno (Duran *et al.* 2019; Bano *et al.*, 2020).
- d) T₃ es responsable del desarrollo de centros de crecimiento fetal y crecimiento óseo lineal (Yasoda, 2018).
- e) T₃ estimula el sistema nervioso aumentando la vigilia y el estado de alerta (Duran *et al.*, 2019; Remaud y Demeneix, 2019)

- f) El aclaramiento renal de muchas sustancias puede aumentar debido a la estimulación de las HTs sobre el flujo sanguíneo renal (Choi *et al.*, 2020; Armstrong *et al.*, 2020).
- g) Las HTs también juegan un papel importante en la salud reproductiva. Permite la regulación de la función reproductiva normal en machos y hembras al regular tanto el ciclo ovulatorio (Krassas y Markou, 2019) como la espermatogénesis (Buzzard *et al.*, 2000; Krassas *et al.*, 2008; Krassas y Markou, 2019).

1.2. Hipotiroidismo congénito

1.2.1 Etiología

La deficiencia de HTs al nacimiento se denomina hipotiroidismo congénito (HC) y constituye una de las alteraciones endócrinas más frecuentes en los recién nacidos (Rastogi y LaFranchi, 2010; Rahmani *et al.*, 2016).

La causa más común del HC es la digénesis tiroidea, el cual es un defecto en el desarrollo de la glándula tiroidea. En la mayoría de estos casos, el tejido tiroideo no es funcional y está presente en la forma de un nódulo ubicado entre la base de la lengua y del cuello, luego de una falla en la migración durante la embriogénesis (ectopia). También puede existir una falta completa de tejido tiroideo (agenesia), aunque esto es poco frecuente (Gaudino *et al.*, 2005; Clerc, 2014, Léger, 2015). Por otro lado, también puede haber mutaciones que interfieren en el transporte de yodo afectando a NIS, Pendrina y la síntesis de tiroglobulina (Park, 2005; Grasberger y Krassas, 2011; Clerc, 2014). Cuando la tiroidea está presente, sin hipoplasia, el HC puede ser transitorio (en el 30% de los casos), debido a la deficiencia de yodo o la sobrecarga de yodo en la madre (Moreno, 2002; Thomas, 2009; LaFranchi, 2011) o puede ser permanente (Eugster *et al.*, 2004; Gaudino y *et al.*, 2005).

1.2.2 Incidencia del HC

Fue poco después del implemento del tamiz neonatal que se sabe que la prevalencia de dicha patología al nacimiento varía dependiendo de diversos factores tales como el

área geográfica, la suficiencia de yodo en la población, la metodología y punto de corte utilizados para el análisis bioquímico.

En el mundo, hasta el 2018, se reporta una incidencia de 6.5 por cada 10,000 recién nacidos (McGrath *et al.*, 2018). También se ha descrito que los grupos poblacionales que tienen mayor incidencia de HC son los asiáticos y los hispánicos, entre los que se encuentran clasificadas aquellas personas provenientes de América Latina (Kurinczuk *et al.*, 2002; Hinton *et al.*, 2010; Deladoëy *et al.*, 2011)

En México, en el año 2018, Hinojosa-Trejo *et al.*, del Instituto Nacional de Pediatría en conjunto con El Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva de la Secretaría de Salud, México, analizaron el aumento de los casos de HC en cada estado de la República Mexicana del 2004 al 2018 (Vela-Amieva, 2004; Rendón-Macías, 2008; Hinojosa-Trejo *et al.*, 2018), donde se observa un incremento de 1.8 veces durante este periodo (Figura 5).

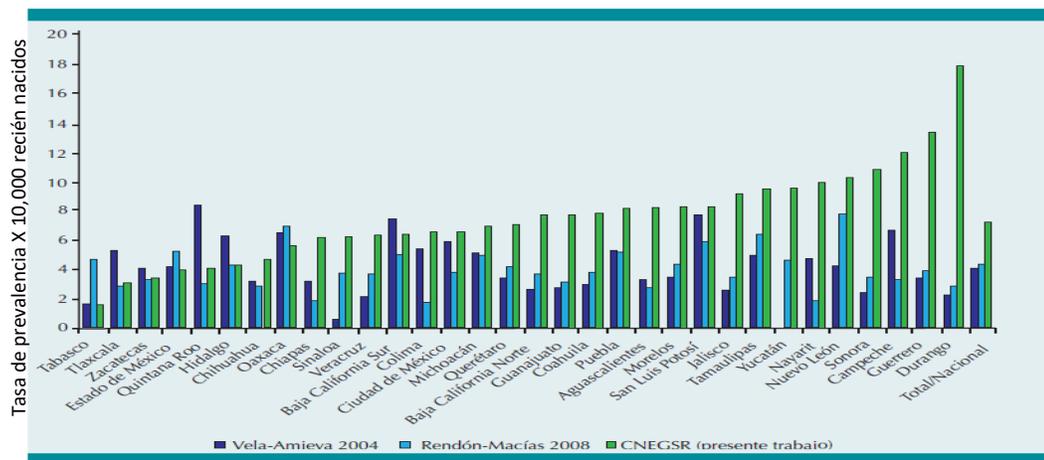


Figura 5. Incidencias de HC por estado de la República Mexicana. (Hinojosa-Trejo, *et al.*, 2018).

Por lo que hasta el 2018, la incidencia de HC en la población de recién nacidos es de 7.3 por cada 10,000 recién nacidos vivos tamizados (Hinojosa-Trejo, *et al.*, 2018).

Esta patología tiene gran trascendencia por los efectos que produce en el metabolismo, así como en diferentes órganos como en la piel, el corazón, los riñones etc. (Wassner, 2017). El HC también se asocia con problemas en la fertilidad, en donde se ha encontrado baja cuenta espermática y bajas concentraciones de testosterona

circulante, entre otras alteraciones (Jaya *et al.*, 1990; Donnelly y White 2000; Krassas *et al.*, 2002; Krassas *et al.*, 2008; Zamoner *et al.*, 2008; Gomez *et al.*, 2010).

1.3. Hormonas tiroideas y la función reproductiva

Los TR son distribuidos en diferentes compartimentos testiculares, lo que indica que las HTs ejercen acción sobre este tejido. En las células de Sertoli fetal y adultas sólo se expresan TR α 1 y TR α 2 (Jannini *et al.*, 2000). En la rata, la isoforma TR α 1 es la que predomina expresándose en células de Sertoli inmaduras en proliferación y adultas. El mRNAs de TR α 2, TR α 3 y TR β 1 son detectados en las células de Sertoli durante el desarrollo posnatal (Buzzard *et al.*, 2000).

Las células *stem* e inmaduras de la línea germinal, y las células de Leydig expresan la isoforma TR α , su expresión es máxima en la edad postnatal y disminuye a un nivel casi indetectable en la edad adulta (Jana y Bhattacharya 1994; Hardy *et al.*, 1996).

La presencia de TR en las células germinales sugiere un probable papel de las HTs durante la espermatogénesis, ya que estos son identificados en diferentes estados de desarrollo de las células germinales de la rata tales como, las espermatogonias, espermatoцитos en preleptoteno, leptoteno, paquiteno, zigoteno, espermátida redonda y elongada. Ambos TR α y TR β 1 son expresados durante los diferentes estados del desarrollo de las células germinales (Buzzard *et al.*, 2000).

Se sabe que la hormona T₃ actúa sobre las células somáticas testiculares al regular su proliferación y diferenciación (Figura 6). Particularmente, T₃ tiene una doble acción en la célula de Leydig, ya que en las ratas estimula la esteroidogénesis mediada por la hormona luteinizante (LH), pero también la inhibe crónicamente (La Vignera y Vita, 2018). Además, se ha demostrado que las HTs son importantes para la diferenciación de células mesenquimatosas en células de Leydig adultas en ratas (Ariyaratne *et al.*, 2000).

La T₃ detiene la proliferación de células de Sertoli, determinando su número en la pubertad, y altera la unión entre ellas y los gonocitos al inhibir la expresión de la molécula de adhesión de células neurales (NCAM) (Holsberger y Cooke, 2005). Las HTs también suprimen la expresión de otros marcadores de inmadurez en Sertoli,

como la Hormona Anti Mülleriana (AMH) y la aromatasa (Bunick *et al.*, 1994). T_3 mantiene las uniones inter-Sertoli por que regula los niveles de proteínas de unión gap. Esta hormona incrementa los niveles de conexin 43 (proteína más abundante en las uniones tipo gap) en cultivo de células de Sertoli (Gilleron *et al.*, 2006). En resumen, los estudios realizados hasta ahora han demostrado que las HTs tienen un papel central en el cese de la proliferación de células de Sertoli, promueven la maduración de las células somáticas testiculares a través de sus receptores para dicha hormona y mantienen la espermatogénesis.

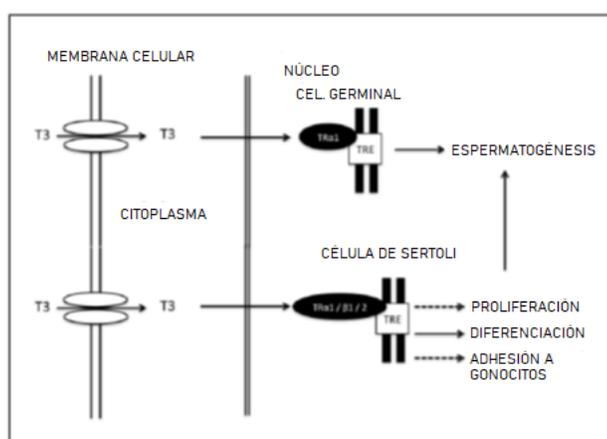


Figura 6. Efectos de T_3 en las células de Sertoli y las células germinales. Las líneas continuas indican que el proceso es favorecido por la hormona T_3 , en tanto que las líneas punteadas indican una reducción del proceso en presencia de esta hormona (Modificado de La Vignera y Vita, 2018).

1.4. Función reproductiva

1.4.1. Proliferación y diferenciación de células testiculares postnatales

Durante los primeros meses postnatales en el humano o los primeros días en la rata se presenta la proliferación de las células de Sertoli y la diferenciación de las células de Leydig y gonocitos. Estos procesos son indispensables para una fertilidad futura exitosa.

1.4.1.1. Diferenciación de gonocitos testiculares

Los gonocitos son células circulares grandes con un núcleo prominente que contiene uno o dos nucleolos (Baillie, 1964) rodeados por un citoplasma en forma de anillo,

estas células se encuentran en el centro de los cordones seminíferos. El gonocito surge de la célula germinal primordial que migra de la base del alantoides a la cresta gonadal, llega y se establece en la gónada en desarrollo para posteriormente diferenciarse a espermatogonias tipo A. Este periodo es crucial en el establecimiento de la espermatogénesis futura (Loveland y Schlatt, 1997).

En el periodo fetal y neonatal, los gonocitos están asociados con diferentes procesos que abarcan una sucesión de distintos tipos de células, en los que se incluyen un período de mitosis fetal, una fase de inactividad que comienza alrededor del día postcoito (dpc) 17.5 en ratas y termina en el día posnatal (dpn) 3, en el que los gonocitos vuelven a entrar en la mitosis y comienzan a migrar hacia la membrana basal de los cordones seminíferos, donde se diferencian a espermatogonias tipo A de la primera ola espermatogénica (Culty 2009) (Figura 7). Se ha demostrado que hay diferentes factores que participan en la proliferación de gonocitos como es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el 17β -estradiol inducen la proliferación de gonocitos neonatales mediante la activación de MAPK (Li *et al.*, 1997; Basciani *et al.*, 2008; Thuillier *et al.*, 2010), y la diferencia entre los gonocitos mitóticos de ratas fetales y neonatales fue claramente ilustrada por sus diferentes respuestas al ácido retinoico (AR) en estudios de cultivo de órganos. En gonocitos de 14.5 dpc se encontró que el AR aumenta la proliferación de gonocitos fetales, al tiempo que induce la apoptosis a un ritmo mayor, lo que lleva a una pérdida general de células (Livera *et al.*, 2000). Sin embargo, en el mismo estudio, se informó que el AR aumenta ligeramente el número de gonocitos en el dpn 3 y no tiene ningún efecto sobre la apoptosis. Además, se reportó que la activina A y los andrógenos son reguladores negativos de la proliferación de gonocitos fetales, mientras que no se ha encontrado ningún efecto de la testosterona en la proliferación de gonocitos a esta edad *in vitro* (Merlet *et al.*, 2007; Thuillier *et al.*, 2010; Mendis *et al.*, 2011).

Como se mencionó anteriormente y, tal como lo describió Clermont y Perey (1957), los gonocitos fetales y neonatales son células grandes y redondas con núcleos prominentes, ubicadas en el centro de los cordones seminíferos mientras que las espermatogonias tienen forma semicircular y se encuentran en la periferia de los

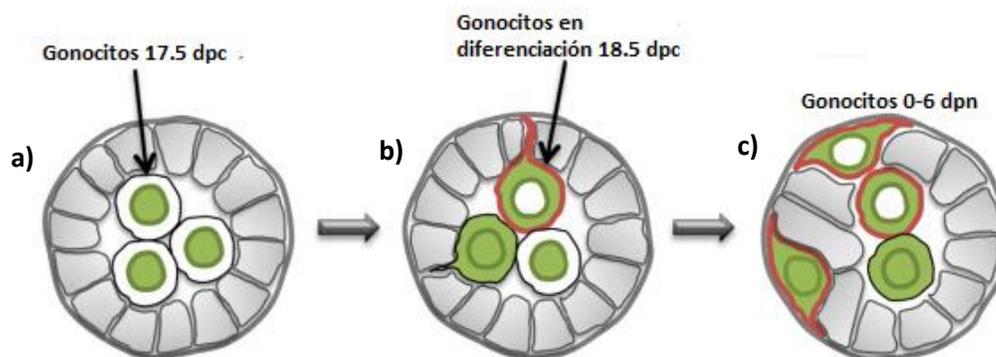


Figura 7. Comportamiento de gonocitos en el cordón seminífero fetal/neonatal de la rata. a) Edad fetal en que los gonocitos (núcleo verde/citoplasma blanco) migran de la cresta gonadal a los cordones seminíferos. **b)** Un día después los gonocitos emiten proyecciones citoplásmicas hacia la lámina basal **c)** En los primeros días después del nacimiento los gonocitos completan su migración a la lámina basal. dpc= días postcoito, dpn= días postnatal. (Modificado de Pin-Pui y Saga, 2017).

túbulos seminíferos, con el borde más plano en aposición a la membrana basal. Sin embargo, a pesar de estas diferencias, es durante la fase de transición, especialmente en el dpn 5 y 6 en ratas, cuando algunos gonocitos perfectamente redondos aún no han sufrido diferenciación, pero ya están ubicados en la membrana basal, lo cual puede producir incertidumbre con respecto a la identidad de la célula.

En esos momentos, la morfología y la ubicación dentro del cordón no son suficientes para caracterizar a las células como gonocitos (Culty, 2009). Debido a la falta de sincronización en el desarrollo de gonocitos, la ausencia de un marcador expresado exclusivamente en gonocitos y el período de transición de varios días en roedores (semanas a meses en humanos), es imposible determinar el día preciso en el que los gonocitos han finalizado su diferenciación y la autorrenovación espermatogonial ha comenzado (Manku y Culty, 2015), lo que hace que el estudio de la diferenciación de gonocitos sea un tema desafiante. Sin embargo, en los últimos años se han estudiado a fondo diferentes vías de señalización y genes que han predominado como indicadores de la transición de gonocito a espermatogonia, tal es el caso del gen estimulado por ácido retinoico 8 (STRA8), identificado como un gen objetivo del AR en

células de carcinoma embrionario de ratón, en espermatogonias indiferenciadas y células germinales premeióticas masculinas (Bouillet *et al.*, 1995; Oulad-Abdelghani *et al.*, 1996; Giuili *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2008). Desde entonces, el papel de STRA8 como un iniciador esencial de la meiosis en células germinales masculinas y femeninas se ha demostrado claramente en ratones *knockout* de STRA8 que eran estériles, debido a una meiosis interrumpida (Baltus *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2008). También se ha utilizado STRA8, junto con KIT (otro marcador de diferenciación de espermatogonias), como marcador para diferenciar gonocitos (Wang y Culty, 2007). La vía de señalización de PDGF y su receptor también juega un papel importante en la diferenciación de los gonocitos (Wang y culty, 2007; Manku *et al.* 2014). Se ha observado que la expresión del receptor para PDGF (PDGFR) comienza a los 18 dpc y continúa aumentando hasta el dpn 5, momento en el que esta expresión comienza a disminuir (Loveland *et al.* 1997). También se ha encontrado que la espermatogonia de rata en el dpn 7 tiene una expresión de PDGFR significativamente menor en comparación con los gonocitos de dpn 3, lo que indica un posible papel preferencial de estos receptores en el desarrollo de gonocitos (Li *et al.*, 1997). En estudios sobre gonocitos de rata aislados, se encontró que el AR indujo la formación de formas variantes de PDGFR α (v-PDGFR α) y PDGFR β (V1-PDGFR β), concomitante con los aumentos en la expresión de STRA8 (Wang y Culty 2007, Manku *et al.* 2014). Se ha estudiado ampliamente la importancia de la señalización NOTCH en la diferenciación de gonocitos. Se ha demostrado que esta vía está involucrada en una multitud de procesos, incluida la proliferación y diferenciación celular y la comunicación célula-célula. Además, varios componentes de la vía NOTCH se expresan en testículos neonatales y adultos tanto en roedores como en humanos (Dirami *et al.*, 2001). Estudios recientes han demostrado que la señalización de NOTCH en las células fetales de Sertoli es crítica para el mantenimiento de los gonocitos fetales en un estado de reposo y para frenar la capacidad de los gonocitos fetales de sufrir diferenciación (Garcia y Hofmann, 2013). También, hay factores específicos que se encuentran disminuidos, estos factores, generalmente ayudan a mantener las células germinales en un estado indiferenciado tal es el caso del factor neurotrópico derivado

de células gliales (GDNF) y de POU5F1/OCT4, que es un factor de transcripción utilizado como marcador de gonocitos indiferenciados. Simultáneamente con estas disminuciones, hay una mayor expresión de marcadores de espermatogonias diferenciadoras (García *et al.*, 2013).

En resumen, sabemos que varias vías de señalización, factores y genes como los que involucran ligandos de la superfamilia AR y variantes de PDGFR, entre muchos otros, se han sugerido como reguladores potenciales de la diferenciación de gonocitos. Sin embargo, se requiere más trabajo para determinar las moléculas objetivo de estas vías y cómo estas diferentes vías se comunican entre sí para afinar la diferenciación de gonocitos.

1.4.1.2. Proliferación de células de Sertoli

El número de células de Sertoli determina el potencial espermatogénico final de los testículos. En roedores, las células de Sertoli proliferan en la vida fetal y postnatal temprana e incluso en la edad adulta, mientras que en los humanos hay dos ondas de proliferación; durante el período fetal y neonatal temprano cuando la población aumenta 5 veces, y nuevamente antes de la pubertad cuando la población aumenta más de dos veces (Cortes *et al.*, 1987; Haverfield *et al.*, 2015). Los estudios en ratones muestran que la apoptosis de las células de Sertoli durante la vida fetal produce testículos más pequeños y un tamaño reducido del tubo seminífero (Bagheri-Fam *et al.*, 2011), lo que sugiere que la proliferación de células de Sertoli durante el período fetal es esencial para la formación del tubo seminífero.

1.4.1.3. Diferenciación de células de Leydig

Las células de Leydig adultas se desarrollan a partir de células madre mesenquimatosas no diferenciadas que están presentes en el compartimento intersticial del testículo postnatal temprano. Estudios recientes han identificado varios marcadores de proteínas para identificar estas células, incluyendo nestina y el PDGFR tipo α (Chen *et al.*, 2017). También se sabe que hay otros factores que intervienen en la diferenciación de dichas células como lo son las HTs (Ariyaratne *et al.*, 2000), ya

que las células *stem* e inmaduras de la línea germinal y las células de Leydig expresan la isoforma TR α y su expresión es máxima en la edad postnatal y disminuye siendo casi indetectable en la edad adulta (Jana y Bhattacharya, 1994; Hardy *et al.*, 1996).

1.4.2. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso en el cual las células germinales (espermatogonias, espermatocitos y espermátidas) experimentan una serie de procesos de división, diferenciación, meiosis y transformación, que termina en la producción de espermatozoides. Este proceso de espermatogénesis se lleva a cabo en el epitelio seminífero en los testículos, teniendo una duración, de 74-76 días para humanos y de 52-56 días en la rata (O'Donnell *et al.*, 2001).

Este proceso involucra una gran cantidad de factores, células somáticas y células germinales, cuyo fin es que estas últimas, lleguen a su estado final que es el espermatozoide. En general consta de dos divisiones meióticas, la espermiogénesis y la espermiación. En la rata, el proceso comienza con las espermatogonias de tipo A (ángulo inferior izquierdo de la Figura 8). Clermont *et al.*, (1959) demostraron que puede haber hasta seis generaciones sucesivas de espermatogonias. Las espermatogonias de tipo A1, empiezan el proceso de la diferenciación y continúan para dar origen a espermatogonias de tipo A2, A3 y A4. Las espermatogonias de tipo A, se caracterizan por tener un núcleo elongado y prominente, en el caso del tipo A1, presentan cromatina y se localizan junto a la membrana basal. Las espermatogonias más diferenciadas como el tipo A4, van acumulando más cromatina en la membrana nuclear y el núcleo va tomando la forma ovoide. Posteriormente continúa la diferenciación, para formar las espermatogonias intermedias (In) y después dar origen a las espermatogonias de tipo B. En promedio, la mitad de la población de las células hijas de tipo A en división mitótica, se diferencia hasta transformarse en células de tipo B y con ello pierden su potencialidad para producir más células A. La otra mitad de la población de células hijas no pierde sus características de progenitoras, conservando esta población (Hermo *et al.*, 2010; Clermont *et al.*, 1959). La proliferación de

Después se diferencian a espermátidas mediante la segunda división meiótica (Hermo *et al.*, 2010). La espermiogénesis, se muestra después en números arábigos del número 1 al 19, que es la transformación de las espermátidas en espermatozoides.

Los espermatozoides formados en la última etapa (etapa 19), se localizan en los estadios VII y VIII del ciclo. En consecuencia, si se examinan las asociaciones celulares en todos los segmentos de un túbulo seminífero, se comprobará una progresión ordenada desde un estadio del ciclo hacia el siguiente ciclo (Cobb y Handel, 1998), al final de la espermatogénesis, en la rata, se estima que se producirán de $14.5-19.5 \times 10^6$ espermatozoides/mL (Setchell y Breed, 2006).

En humanos, Clermont y Leblond (1955) describieron la espermatogénesis y el ciclo del epitelio seminífero como un proceso más complejo, observaron que las espermátidas se desarrollan en 12 pasos de espermiogénesis y que sólo hay seis etapas del ciclo del epitelio seminífero, con una duración de 16 días por cada ciclo (Clermont, 1963; Heller y Clermont, 1963). En los varones, la espermatogénesis produce alrededor de 15×10^6 espermatozoides/mL (OMS, 2010).

Todos los procesos descritos anteriormente requieren de dos tipos celulares indispensables para su correcto funcionamiento, las células de Sertoli y las células de Leydig.

1.4.2.1 Célula de Sertoli

Las células de Sertoli, también llamadas células sustentaculares, son células en forma de pirámide que se encuentran dentro del epitelio seminífero. Sus bases se encuentran contra la membrana basal de cada tubo seminífero y sus puntas apuntan hacia la cavidad de los tubos (Figura 9). Estas "células nodrizas" desempeñan un papel esencial en la nutrición y el suministro de soporte estructural para las células germinales durante su desarrollo.

La anatomía básica de las células de Sertoli comenzó con dibujos publicados en 1865 (Sertoli, 1865), donde se mostraban extensiones celulares que sostenían a las células germinales, publicaciones posteriores mostraron detalles más específicos sobre estas células (Elftman, 1963). El núcleo de la célula de Sertoli es de gran tamaño y adopta

numerosas formas, pero se coloca en paralelo o perpendicular a la membrana basal (Leblond y Clermont, 1952; Hess y Franca, 2005). En el núcleo de la célula de Sertoli se han descrito alrededor de 70 proteínas específicas (Griswold, 2015).

En el citoplasma de la célula de Sertoli se han localizado más de 150 proteínas específicas (Griswold, 2015), dentro de las cuales se destacan algunos marcadores clave como la AMH, vimentina, tubulina- α , β y zona ocludina-1.

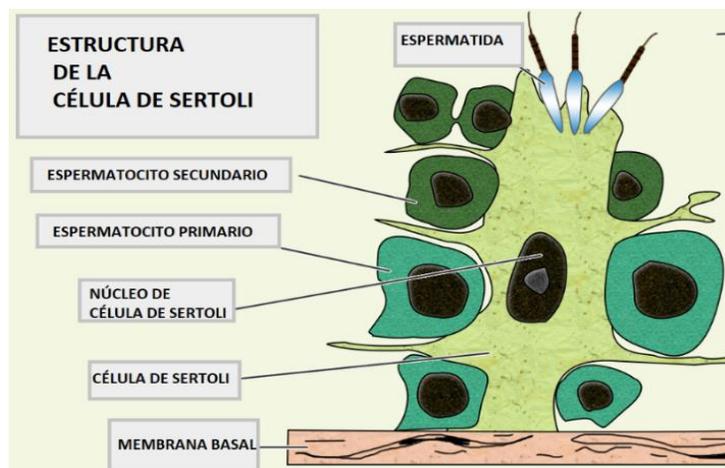


Figura 9. Estructura de la célula de Sertoli. La célula de Sertoli alberga distintos tipos de células germinales que dan lugar a la espermatogénesis (Modificado de Griswold, 2015).

Hay otros factores que participan en la proliferación y diferenciación de la célula de Sertoli, como, la Hormona Folículo Estimulante (FSH) que regula positivamente la proliferación de células de Sertoli activando las vías dependientes de cAMP / PKA / ERK1 / 2 y PI3K / Akt / mTORC1, y aumentando la actividad transcripcional de c-Myc y HIF2 y la expresión de ciclina D1. La caracterización de algunas de las vías de señalización reguladas por la FSH han sido un paso importante hacia la comprensión de cómo esta hormona promueve, por un lado, la proliferación de células de Sertoli durante la vida fetal y postnatal temprana y, por otro lado, la maduración después del cese de mitosis en la pubertad (Griswold *et al.*, 1975). Así también, la activina A estimula la proliferación de células de Sertoli durante el período fetal y postnatal y los niveles crecientes de inhibina B en la pubertad pueden contrarrestar los efectos de la activina A (Robertson *et al.*, 1989). Por el contrario, se ha demostrado que las HTs

tiene un papel central en el cese de la proliferación de células de Sertoli y promueven la maduración de estas células a través de sus receptores (Holsberger *et al.*, 2005; Meroni *et al.*, 2019).

Se necesitan células de Sertoli funcionales para el desarrollo de las células germinales y no germinales. Estudios recientes que utilizan un modelo de ratón de escisión específica de células de Sertoli revelan que estas células son esenciales para el mantenimiento y la función de las células mioideas peritubulares, y son necesarias para el desarrollo de células de Leydig y la esteroidogénesis (Rebourcet *et al.*, 2014). Por lo tanto, las células de Sertoli son necesarias para la producción de espermatozoides y andrógenos dentro de los testículos.

1.4.2.2. Células de Leydig

Las células de Leydig son células intersticiales que se encuentran adyacentes a los túbulos seminíferos del testículo, tienen forma poliédrica con un núcleo prominente, un citoplasma eosinofílico y numerosas vesículas lipídicas llenas. Las células fetales de Leydig producen los altos niveles de andrógenos (testosterona o androstenediona, dependiendo de la especie) requeridos para la diferenciación de los genitales masculinos y la masculinización cerebral. La producción de andrógenos disminuye con la pérdida de estas células, alcanzando un punto más bajo en el posparto (Zirkin y Papadopoulos, 2018). La testosterona luego aumenta gradualmente a niveles altos con el desarrollo de células de Leydig en adultos a partir de células madre. En el adulto, la unión de la hormona luteinizante (LH) a su receptor en las células de Leydig estimula la producción de AMPc, aumentando la tasa de translocación de colesterol en las mitocondrias. El colesterol se metaboliza a pregnenolona por la enzima CYP11A1 en la membrana mitocondrial interna, y a su vez la pregnenolona se transforma a testosterona por mitocondrias y enzimas del retículo endoplásmico liso. La translocación del colesterol a la membrana mitocondrial interna está mediada por un complejo proteico formado en los sitios de contacto mitocondrial, dicho complejo consiste en la proteína translocadora de unión al colesterol, el canal aniónico dependiente del voltaje y otras proteínas mitocondriales y citosólicas. La proteína

reguladora esteroideogénica aguda (StAR), actúa en este complejo para mejorar el movimiento del colesterol a través de las membranas y así aumentar la formación de testosterona (Chen *et al.*, 2017).

1.4.3. Regulación endocrina de la espermatogénesis

Los estudios sobre la regulación endocrina de la espermatogénesis se han centrado en las gonadotropinas LH y FSH que son necesarias para el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis normal. La LH actúa sobre las células de Leydig para estimular la biosíntesis de andrógenos, los cuales actúan sobre los receptores dentro del epitelio seminífero para estimular y apoyar la espermatogénesis. La FSH se une a sus receptores en las células de Sertoli para estimular la espermatogénesis. Aunque también participan otros factores endocrinos, como la vitamina A y su metabolito el AR (O'Donnell *et al.*, 2017). La FSH actúa como un mitógeno para la proliferación de células de Sertoli en la pubertad y en ausencia de FSH o su receptor, los testículos son más pequeños, las poblaciones de células de Sertoli se reducen, al igual que la producción de espermatozoides (O'Shaughnessy, 2014; Ruwanpura *et al.*, 2010). La FSH requiere las vías de señalización de insulina/IGF para mediar sus efectos sobre la proliferación de células de Sertoli. Por lo que la FSH apoya la proliferación de células de Sertoli postnatal para establecer una población cuantitativamente normal y, dado que el número de células de Sertoli determina la producción de espermatozoides, esta hormona también se requiere para la producción de cantidades normales de espermatozoides. Otro evento que ocurre durante el establecimiento de la espermatogénesis es una ola de apoptosis de células germinales que es importante para establecer la espermatogénesis futura, logrando así un equilibrio en la relación célula Sertoli-célula germinal (Rodríguez *et al.*, 1997).

Otros reguladores de la espermatogénesis son los andrógenos, incluida la testosterona y la dihidrotestosterona, que actúan sobre los receptores de andrógenos (RA) en los testículos para apoyar la función espermatogénica normal. Los andrógenos pueden actuar sobre los RA y producir la llamada vía de señalización clásica, mediante la cual los RA unidos al ligando se translocan al núcleo, se unen a los elementos de respuesta

a andrógenos en la región promotora de genes dependientes de andrógenos, y modulan la transcripción. Esta vía produce una respuesta horas después de la estimulación androgénica. Sin embargo, los andrógenos pueden tener efectos mucho más rápidos a través de vías no clásicas, que implican la entrada de calcio intracelular mediada por los RA o la activación de la vía de fosforilación ERK (Walker, 2010). Tanto las vías clásicas como las no clásicas son activas en las células de Sertoli y ambas son necesarias para la espermatogénesis (Toocheck *et al.*, 2016). En ausencia de los RA en las células de Sertoli, no podría haber producción de espermatozoides, ya que el paso a la formación de espermátida redonda no se completa (Chang *et al.*, 2004) lo que destaca el hecho de que la acción de andrógenos en las células de Sertoli es necesaria para completar la meiosis y la espermiogénesis.

También, los RA son requeridos para la síntesis de DNA de los espermatoцитos en preleptoteno (Griswold, 2015). Así como para la expresión de otras proteínas implicadas en la división meiótica, como la proteína de choque térmico (HSP 70-2) (Eddy, 1999).

La espermiogénesis y la espermiación parecen estar reguladas por la vía de señalización del AR (Hogarth, 2015). El AR derivado de células de Sertoli que actúa sobre los heterodímeros RAR α /RXR β en células de Sertoli es esencial para la espermiación, se documenta que la eliminación del gen que codifica RAR α , causa anomalías tanto en la espermiogénesis como en la espermiación (Hogarth, 2015). La regulación de la espermiación es muy compleja debido a que es un proceso multifacético que involucra una serie coordinada de procesos celulares, cascadas de señalización, vías endocíticas y complejos de adhesión (O'Donnell *et al.*, 2001). Es probable que la célula de Sertoli dirija la espermiación ya que la espermátida madura en este momento está transcripcionalmente inactiva y, por lo tanto, probablemente desempeña un papel bastante pasivo en el proceso (Russell, 1991). Hay un sin número de mecanismos que regulan la espermatogénesis los cuales no han sido descritos del todo, sin embargo, los estudios científicos realizados hasta hoy apuntan a que cualquier error en estos procesos, podrían desencadenar fallas que ponen en riesgo la fertilidad masculina.

2. ANTECEDENTES

2.1. El hipotiroidismo en la fertilidad

Los estudios de los efectos de las HTs en la fertilidad masculina en adultos han dado resultados contradictorios.

Como ya vimos las HTs son necesarias para el sistema reproductivo y cuando su acción falla se producen efectos negativos en el desarrollo de los testículos, afectando la espermatogénesis, la esteroidogénesis, el tamaño de los testículos, las hormonas reproductivas y por ende la fertilidad (La Vignera y Vita, 2018; Hernández y Martínez, 2020). El hipotiroidismo en el desarrollo reproductivo ha sido estudiado y se ha descrito que conduce a anormalidades consistentes en la fisiopatología hormonal del eje gonadal (Hernández, 2018). La aparición y la gravedad de estas anomalías pueden variar según el grado, el tipo y la duración del hipotiroidismo y la etapa de desarrollo afectada (desde la edad neonatal temprana hasta la edad adulta). Sin embargo, las observaciones muestran consistentemente un retraso en la maduración de las células de Sertoli, lo que lleva a un aumento en el número de estas células, ocasionando cambios en la fisiología testicular en la edad adulta (Bunick *et al.* 1994; Sakai *et al.*, 2004; Oluwole *et al.*, 2013). Así también se observan alteraciones en las concentraciones de testosterona, progesterona y prolactina (Kimura y Furudate 1996; Maran *et al.* 2000), lo que también podría estar alterando la fertilidad, sin embargo, aun hacen falta más estudios para determinar la causa.

El hipotiroidismo primario también afecta la espermatogénesis en diferentes etapas, sin embargo, los estudios se han centrado en el conteo espermático, la motilidad y vitalidad, concluyendo que este tipo de hipotiroidismo afecta la salud reproductiva masculina al disminuir el número de espermatozoides, bajar la motilidad y disminuir el número de espermatozoides vivos (Choksi *et al.*, 2003; La Vignera y Vita 2018; Hernández y Martínez, 2020). Esta patología es común en la población y afecta la fertilidad en al menos el 60% de quien lo padece y que no recibe atención oportuna (OMS, 2010).

2.2. Hipotiroidismo congénito y células testiculares en modelos experimentales

La célula de Sertoli se ha considerado una de las células testiculares objetivo de las HTs, ya que, como se había mencionado anteriormente, los TR se encuentran en esta célula y la unión de estos a las HTs promueven diferentes eventos, por lo que en el HC se han descrito algunas alteraciones en las células testiculares. Se sabe que esta patología conduce a una reducción en la maduración de las células de Sertoli (Palmero *et al.*, 1989; Bunick *et al.*, 1994; De Franca *et al.*, 1995) lo que lleva a la falta de formación del lumen tubular por ausencia del fluido producido por las células de Sertoli (Francavilla *et al.*, 1991; Simorangkir *et al.*, 1997) afectando a este tipo celular a nivel ultraestructural, bioquímico y molecular, lo que repercute en las células germinales (Simorangkir *et al.*, 1997).

La mayoría de los estudios realizados en modelos experimentales, han permitido describir que el HC no tiene efecto sobre el desarrollo testicular durante la vida fetal (Francavilla *et al.*, 1991; Hamouli-Said *et al.*, 2007), y se asocia, en la pubertad, con un desarrollo testicular deteriorado, incluido el crecimiento testicular, la maduración celular y formación de túbulos seminíferos (Palmero *et al.*, 1989; Francavilla *et al.*, 1991). Sin embargo, a medida que se permitió que los animales con HC se recuperaran al estado eutiroides, se observó un aumento significativo en el tamaño de los testículos y la producción diaria de espermatozoides (80% y 140%, respectivamente, en comparación con los animales control en la edad adulta) (Cooke y Meisami, 1991). De igual forma se ha demostrado que el hipotiroidismo neonatal/prepuberal transitorio extiende la duración de la proliferación de células de Sertoli al retrasar su maduración, lo que resulta en un mayor número de células de Sertoli en los testículos adultos (Francavilla *et al.*, 1991; Van Haaster *et al.*, 1992; Hess *et al.*, 1993; Joyce *et al.*, 1993; De Franca *et al.*, 1995).

En las células de Leydig también se ha demostrado que el HC produce la detención de la diferenciación y permite la proliferación de células mesenquimatosas precursoras que se acumulan en el intersticio, que estarán disponibles para la diferenciación más adelante cuando se restablece el eutiroidismo (Hardy *et al.*, 1996; Mendis-Handagama

et al., 1998; Teerds *et al.*, 1998). En ratas tratadas con propiltiouracil (PTU, fármaco inductor de hipotiroidismo) se observó un incremento significativo en el número de células de Leydig cuando se compararon con controles eutiroides, además de que las células de Leydig aisladas de estas ratas hipotiroideas tuvieron un bajo potencial de producción de esteroides. Hardy *et al.*, (1993) y Ariyaratne *et al.*, (2000). Estos resultados indican que la hormona tiroidea es crucial para desencadenar la diferenciación de las células mesenquimatosas en células de Leydig progenitora esteroidogénica en testículos de ratas prepúberes y adultas.

2.3. Alteraciones de los parámetros espermáticos en el HC

Se sabe que en los varones con HC se sabe que tienen baja proporción de espermatozoides morfológicamente normales (teratozoospermia), lo que reduce su potencial para fertilizar el ovocito maduro. Las deformidades morfológicas en la región del flagelo del espermatozoide resultan por defectos en diferentes partes de éste ya que las HTs ejercen sus efectos en el citoesqueleto celular (Krassas *et al.*, 2002; Krassas *et al.*, 2008). Los pacientes con HC muestran una disminución en la motilidad progresiva de los espermatozoides (astenozoospermia) (Corrales-Hernández *et al.*, 1990; Hudson y Edwards 1992; Abalovich *et al.*, 1999); el tiempo de tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo y la actividad secretora del epidídimo también se ven afectados (Romano *et al.*, 2017).

Por otro lado, en ratas cuya tiroides ha sido inhibida con fármacos antitiroideos muestran una disminución en el volumen seminal con una detención de la espermatogénesis y una disminución en el número y el diámetro de los tubos seminíferos. También se observa una reducción concomitante en el peso de los testículos y las glándulas accesorias en comparación con los controles eutiroides (Choudhury *et al.*, 2003).

La cantidad de espermatozoides vivos se reduce en ratas con HC. Esta reducción en la vitalidad de los espermatozoides puede resultar del desequilibrio entre el aumento del estrés oxidante, por ejemplo, por la peroxidación lipídica, y los sistemas

antioxidantes reducidos, como la catalasa y superóxido dismutasa (Choudhury *et al.*, 2003).

2.4 Perfil endocrino reproductivo en el HC

Se ha documentado que pacientes con HC, se reduce la concentración de testosterona (Jaya *et al.*, 1990; Donnelly y White 2000), sin embargo, Velázquez y Arata (1997) no reportan cambios en la concentración de testosterona libre en hombres con este padecimiento. Jaya *et al.*, (1990) describieron un aumento en las concentraciones de LH y FSH, sin embargo, Velázquez y Arata (1997) encontraron un aumento sólo en las concentraciones de FSH sin cambios en LH. Por otra parte, Donnelly y White, (2000) no mencionan cambios en LH y FSH sérica en hombres con HC. Así mismo se ha documentado que las HTs también alteran la respuesta hipofisiaria a la GnRH. La administración de GnRH a pacientes hipotiroideos resulta en una atenuación en la secreción de LH (Prasannakumar *et al.*, 1987).

Las ratas con HC muestran una reducida capacidad de preñez cuando se aparean con hembras normales lo que resulta en una reducción en la concentración de testosterona y estradiol (Anbalagan *et al.*, 2010).

En roedores con HC se ha encontrado que, los esteroides gonadales disminuyen significativamente, en particular progesterona y testosterona total (Morris *et al.*, 2004). Las fallas en la producción de testosterona pueden ser por diferentes razones: 1) baja toma de colesterol por las células de Leydig, 2) baja conversión de progesterona a testosterona, 3) alta conversión de estradiol a testosterona y 4) hiperprolactinemia. Alta prolactina suprime la enzima 17 α -hidroxilasa en el testículo de la rata, lo que cataliza la conversión de progesterona a 17 α -hidroxi progesterona (Welsh *et al.*, 1986). Se sabe que el mecanismo podría ser a través de las células de Leydig, ya que se ha informado que la administración de T₃ estimula y mejora directamente la secreción de andrógenos inducida por LH en estas células (Jana *et al.*, 1996). Además, también se aumentan los niveles del ARNm de la proteína StAR, así como la producción de esteroides (Manna *et al.*, 2001), mientras que el hipotiroidismo disminuye la producción

de testosterona y AMPc en respuesta a LH en los testículos de rata (Antony *et al.*, 1995).

También hay estudios que sugieren cambios en la concentración sérica de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). La SHBG es una proteína transportadora de andrógenos y estrógenos que también ha servido como un biomarcador para la función tiroidea, su síntesis y secreción están bajo el control de las HTs (Cavaliere *et al.*, 1988). Esto, sugiere que el HC se asocia con una disminución en los niveles plasmáticos de SHBG (Maran, 2003).

El HC afecta, claramente la función reproductiva en el varón y en los roedores, sin embargo, el mecanismo por el cual esta acción se lleva a cabo no se conoce. Hasta el momento se han estudiado los parámetros espermáticos y endocrinos presentes en el HC, los cuales representan la etapa tardía de la espermatogénesis. Sin embargo, considerando que los estudios indican que el HC afecta principalmente a las células de Sertoli, y éstas a su vez, regulan la diferenciación de los gonocitos, es posible que esta patología conlleve una falta en este proceso de diferenciación, el cual es indispensable para una espermatogénesis exitosa y una adecuada fertilidad futura. Por tanto, es necesario determinar si las alteraciones en la fertilidad reportadas en humanos y modelos animales con HC se debe a la falta de la diferenciación de los gonocitos a espermatogonias y si este hecho afecta la calidad del epitelio seminífero en la etapa juvenil.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad en México, el HC tiene una incidencia de 7.3 casos por cada 10,000 recién nacidos vivos, y se sabe que han aumentado 1,8 veces en los últimos 16 años. Esta patología genera múltiples problemas metabólicos y puede producir infertilidad masculina. Por otro lado, un proceso esencial temprano para una espermatogénesis futura exitosa es la diferenciación de los gonocitos a espermatogonias, el cual requiere de células de Sertoli funcionales, ya que este tipo celular envía factores al gonocito para su diferenciación. La deficiencia de HTs puede afectar la diferenciación y funcionalidad de las células de Sertoli evitando la formación de espermatogonias por

la falta de diferenciación de los gonocitos. Por lo tanto, este trabajo pretende determinar si las alteraciones en la fertilidad generadas por el HC se derivan de la falta de diferenciación de los gonocitos por la alteración en la función de las células de Sertoli, y si este hecho afecta la calidad del epitelio seminífero en la etapa juvenil. Este trabajo forma parte de las líneas prioritarias de salud de nuestro país (salud reproductiva) y los resultados que se generen podrán contribuir al conocimiento de la enfermedad y a la etiología de los problemas de fertilidad en este padecimiento. Posiblemente permitirán, determinar el momento preciso de administración de tratamientos que mejoren la fertilidad futura y así mismo la calidad de vida en pacientes con HC.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El HC genera fallas en la diferenciación de gonocitos y este hecho repercute en la calidad del epitelio y en los parámetros espermáticos en animales juveniles?

5. HIPÓTESIS

En ratas con HC se presentan fallas en la diferenciación de los gonocitos, lo que repercute en la calidad del epitelio seminífero en animales juveniles.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar si la diferenciación de los gonocitos se ve afectada por el HC y si este hecho afecta la calidad del epitelio seminífero y algunos parámetros espermáticos en animales juveniles.

6.2. Objetivos particulares

- ✓ Determinar la diferenciación de los gonocitos en ratas con HC.
- ✓ Caracterizar las alteraciones testiculares a lo largo del periodo posnatal hasta la edad juvenil.

- ✓ Confirmar el daño en la calidad espermática en ratas jóvenes con HC inducido.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

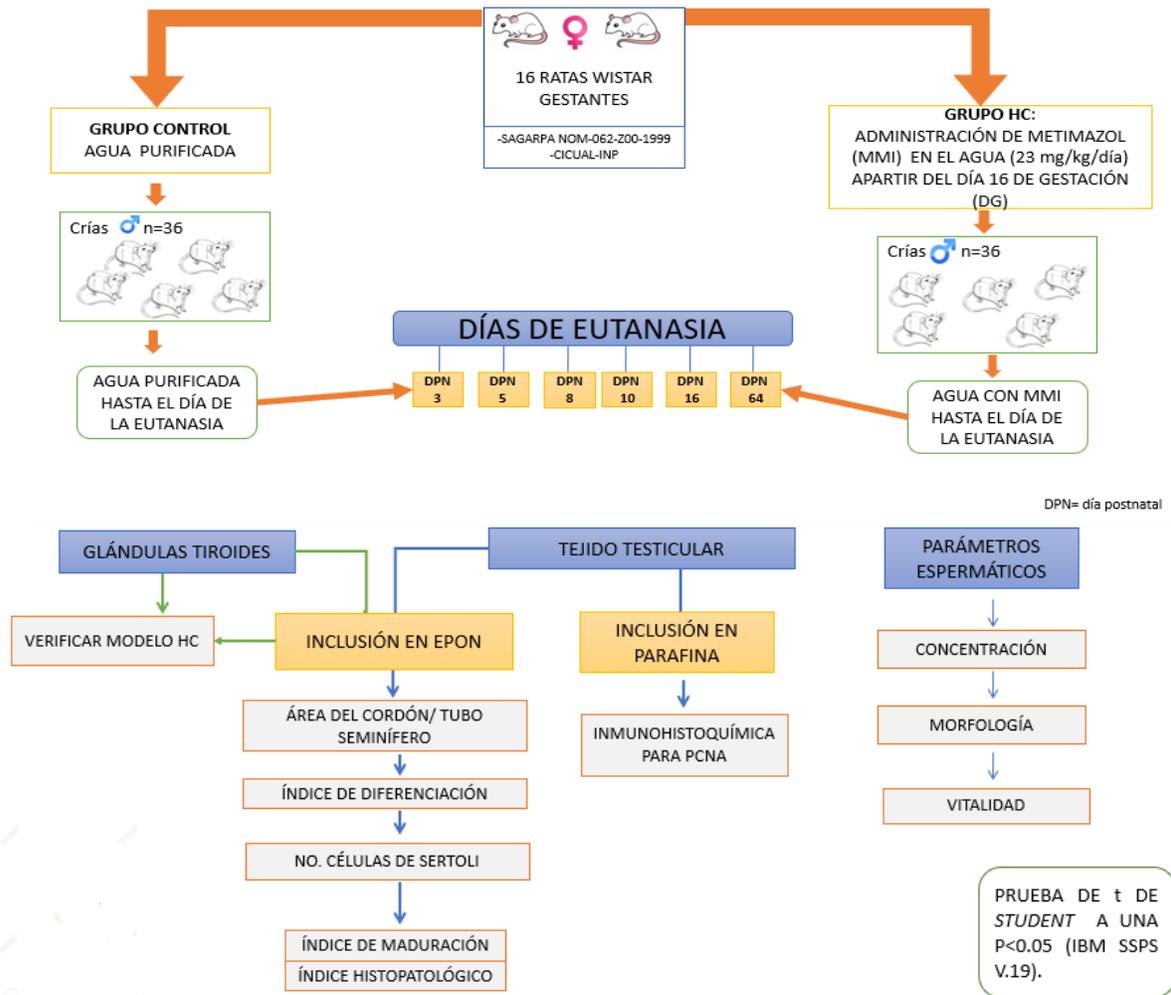


Figura 10. Diseño experimental

7.1. Población de estudio

Se emplearon 16 ratas hembra y 3 ratas macho de la cepa Wistar de 90 días de edad, las cuales fueron alojadas en el bioterio del Instituto Nacional de Pediatría. Estos animales fueron apareados en harén y se incluyeron 36 crías machos. Los animales se colocaron en jaulas de acrílico con cama de aserrín en un cuarto con temperatura regulada (23 ± 2 °C), humedad relativa del 50% y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas

cada uno. El agua y el alimento se proporcionó *ad libitum*, y fueron manejados conforme a la norma oficial mexicana (SAGARPA NOM-062-Z00-1999) publicada en 2001 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” y siguiendo los reglamentos internos de principios de ética y trato a los animales del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del INP.

Durante la fase de estro, las ratas hembra fueron colocadas con un macho durante toda la noche. El apareamiento fue confirmado por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal; este hecho indicó el DG0 y una vez confirmado, se realizó el seguimiento de la gestación a través de la medición del peso corporal de las hembras gestantes hasta DG21, lo cual se realizó cada tercer día. Las ratas gestantes fueron aleatoriamente asignadas a uno de los siguientes grupos: 1) Grupo control. Las hembras y sus crías no fueron manipuladas a lo largo del periodo gestacional y postnatal. 2) Grupo con HC. Las hembras fueron tratadas con el fármaco antitiroideo MMI (Sigma Aldrich). Dicho fármaco fue administrado en el agua de beber a una dosis de 23 mg/kg/día desde el DG16 hasta que se practicó la eutanasia. En ambos grupos se registró el día del parto como dpn 0 y la camada se ajustó a 6 crías macho por grupo.

La eutanasia de las crías se llevó a cabo a través de una sobredosis de pentobarbital sódico (120-150 mg/kg i.p.) previa sedación con xilacina (10 mg/kg ip) (Pfizer) en los dpn 3, 5, 8, 10, 16, 64 (Figura 11).

7.1.1. Peso corporal y peso testicular

Se tomo nota del peso corporal cada tercer día para todos los grupos, a la eutanasia se recuperaron los testículos y previa eliminación de grasa adyacente, se pesaron.

7.2. Valoración espermática

Del lavado de conducto deferente se obtuvo la cuenta espermática por recuento en cámara de Neubauer (normal $50\text{-}250 \times 10^6$ espermatozoides/ml). El conteo se realizó, utilizando un factor de dilución (25 μl de semen diluido en 500 μl de solución

balanceada de Hanks´) y aplicando la siguiente fórmula: no de células contadas x 21x 10,000 x 5 = concentración por mL. El conteo se repitió en ambos cuadros de la cámara y se verificó vaciando y volviendo a rellenar la cámara. El promedio de los cuatro conteos se ingresó en la formula y el resultado fue expresado como concentración espermática en millones por mililitro. Las anomalías en la morfología se determinaron en frotis teñidos con eosina-nigrosina, para valorar al mismo tiempo la vitalidad. Se contaron un mínimo de 200 células en diferentes campos y por duplicado.

7.3. Procesamiento del material biológico

Los testículos y la glándula tiroides recuperados en la disección se utilizaron para su procesamiento e inclusión en parafina para su análisis inmunohistoquímico (testículo derecho) e inclusión en EPON para el análisis morfológico (testículo izquierdo).

7.3.1. Procesamiento de material para inclusión en EPON

Los testículos de cada animal fueron fijados en Karnovsky modificado por 24 horas continuando con una post-fijación con Tetróxido de Osmio al 1% (Zelterquist), durante 1 hora. La deshidratación de las muestras consistió en pasos sucesivos de alcoholes: 70%, 80%, 90%, 96%, 100% y óxido de propileno, 10 minutos dos veces por cada alcohol, al igual que para el óxido de propileno. Para la inclusión, después de los lavados con óxido de propileno, las muestras se dejaron en diluciones de óxido de propileno:EPON (2:1 por 1 hora, 1:1 por 24 horas 1:2 por 24 horas) hasta llegar al EPON puro para su posterior polimerización en estufa a 60° C durante 24 horas. Se obtuvieron cortes semifinos de 1 µm de grosor; en un ultramicrotomo (Leica modelo Ultracut-UCT) y se tiñeron con azul de toluidina al 0.5% (SIGMA-ALDRICH, México), finalmente se montaron en portaobjetos.

7.3.2. Análisis histológico

Lo realizó un solo observador auxiliándose de un sistema de análisis de imágenes (Image-ProPlus 6.0). Por cada testículo se observaron 15 secciones transversales de tubos seminíferos en donde se determinó:

- a) El área del epitelio seminífero
- b) El número de gonocitos con y sin contacto con la lámina basal, número de células de Sertoli y espermatocitos.
- c) El índice de diferenciación, lo cual es el resultado de dividir el número de espermatogonias diferenciadas entre el número de gonocitos observados.
- d) El índice histopatológico (ANEXO I)
- e) El grado de maduración del epitelio seminífero o índice de Jonhsen (ANEXO II).
- f) De la glándula tiroides se obtuvieron cortes transversales para observar la atrofia de la glándula y así comprobar el modelo de HC.

7.3.3. Procesamiento de material para inclusión en parafina

Los testículos se fijaron en paraformaldéhidro al 4% (SIGMA-ALDRICH, México) durante 24 horas, posteriormente se lavaron con PBS 3 veces durante 15 minutos, las muestras se colocaron en el procesador de tejidos *Leica TP1020* para su deshidratación e inclusión en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 4 µm de grosor que se montaron en laminillas cubiertas con grenetina.

7.3.4. Inmunohistoquímica para el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)

Se realizaron cortes longitudinales de 4 µm de grosor, colocándolos en portaobjetos previamente cubiertos con poly-L-lisina (SIGMA, México). Las laminillas se rehidrataron para posteriormente incubarlas por 10 minutos en H₂O₂ al 3% para bloquear las peroxidases exógenas, inmediatamente se le realizó un lavado de 5 minutos con agua destilada seguido por un tratamiento de citrato de sodio al 0.01 M por 15 minutos para el desenmascaramiento del factor a analizar. Después de este tiempo se lavaron en PBS 0.01 M y se procedió a permeabilizar con solución PBS/tween 20 al 0.1% por 10 minutos, luego se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios (1:100 a 1:200) para cada una de las proteínas propuestas (una laminilla por marcador analizado). Se lavaron para retirar excedentes con PBS/tween 20 al 0.1%. El bloqueo inespecífico se efectuó con BSA/PBS/tween 20 al 5% por 2

horas. Posteriormente se incubó con un anticuerpo biotilado (1:200) durante 2 horas (Biotinylated, anti-goat IgG, Santa Cruz, Biotechnology, CA USA). Pasado este tiempo se lavó con PBS/tween 20 al 0.1% y se procedió a incubar por 1 hora en el Complejo Avidina-Biotina. Se lavó con PBS/tween 20 al 0.1%. El revelado de las muestras se llevó a cabo con diaminobencidina (DAB) de 15 a 30 segundos, y se contrastaron con hematoxilina durante 5 segundos. Posteriormente se aclararon, se pasaron por xilol durante 10 minutos e inmediatamente se montaron con entelan (MERCK). Se determinó la relación de células positivas a cada anticuerpo /1000 μ m² en al menos 30 tubos seminíferos cortados transversalmente determinado por el sistema de análisis de imágenes (Image-Pro-Plus 6.0).

7.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se diseñaron tablas para la captura de todos los datos de los grupos. Se empleó estadística descriptiva para presentar los datos agrupados de acuerdo con las variables estudiadas en cada instancia. Para determinar la diferencia en cada uno de los parámetros estudiados se empleó la prueba de t de *student*, previa comprobación de homogeneidad de varianzas. Se consideró en todos los casos como significativo a una $p < 0.05$. Los datos se procesaron mediante el programa estadístico SSPS V.19.

8. RESULTADOS

8.1. Peso corporal y peso testicular

Las ratas para el grupo control desarrollaron un peso adecuado a su edad, sin embargo, para el grupo con HC se detectó una reducción significativa a partir del día 16 ($p < 0.05$) (Tabla 1).

TABLA 1. Peso corporal en animales de los grupos estudiados con HC

EDAD (DPN)	CONTROL (G) ($\bar{x} \pm DE$)	HC (G) ($\bar{x} \pm DE$)
3	9.40 \pm 0.54	8.40 \pm 0.53
5	10.60 \pm 0.50	10 \pm 0.70
8	18.20 \pm 0.83	17.40 \pm 0.89
10	23.40 \pm 1.10	22.30 \pm 1.90
16	29.10 \pm 1.40	21.50 \pm 0.60*
64	140.60 \pm 9.56	60.98 \pm 20.90*

Se muestran los pesos corporales de los animales del grupo Control y con HC expresados en $\bar{x} \pm DE$.

* $p < 0.05$. dpn= días postnatal.

PESO TESTICULAR

De igual forma el peso testicular para el grupo con HC fue normal hasta el dpn 10, disminuyendo significativamente para el dpn 16 y 64 ($p < 0.05$) (Tabla 2).

TABLA 2. Peso testicular en animales de grupos estudiados con HC

EDAD (DPN)	CONTROL (G) ($\bar{x} \pm DE$) $\times 10^{-2}$	HC (G) ($\bar{x} \pm DE$) $\times 10^{-2}$
3	1.11 \pm 0.2	0.91 \pm 0.11
5	1.10 \pm 0.14	0.88 \pm 0.12
8	1.90 \pm 0.07	1.80 \pm 0.08
10	2.80 \pm 0.24	2.28 \pm 0.24
16	11.34 \pm 0.80	5.74 \pm 1.10*
64	163.76 \pm 3.40	93.4 \pm 0.70*

Se muestran los pesos testiculares de los animales del grupo Control y con HC expresados en $\bar{x} \pm DE$.

* $p < 0.05$. dpn= días postnatal.

8.2. Glándula tiroides

Se realizó una observación microscópica de las glándulas tiroides para confirmar el modelo de HC en ratas neonatas de 3 dpn y en ratas juveniles de 64 dpn. En la glándula tiroides de los grupos control en la figura 11 (a, c) se puede apreciar el coloide de gran tamaño, con un epitelio folicular tiroideo cúbico simple de morfología normal. Contrario al grupo con HC (b, d) en donde se pueden observar folículos atróficos con una reducción del tamaño del coloide.

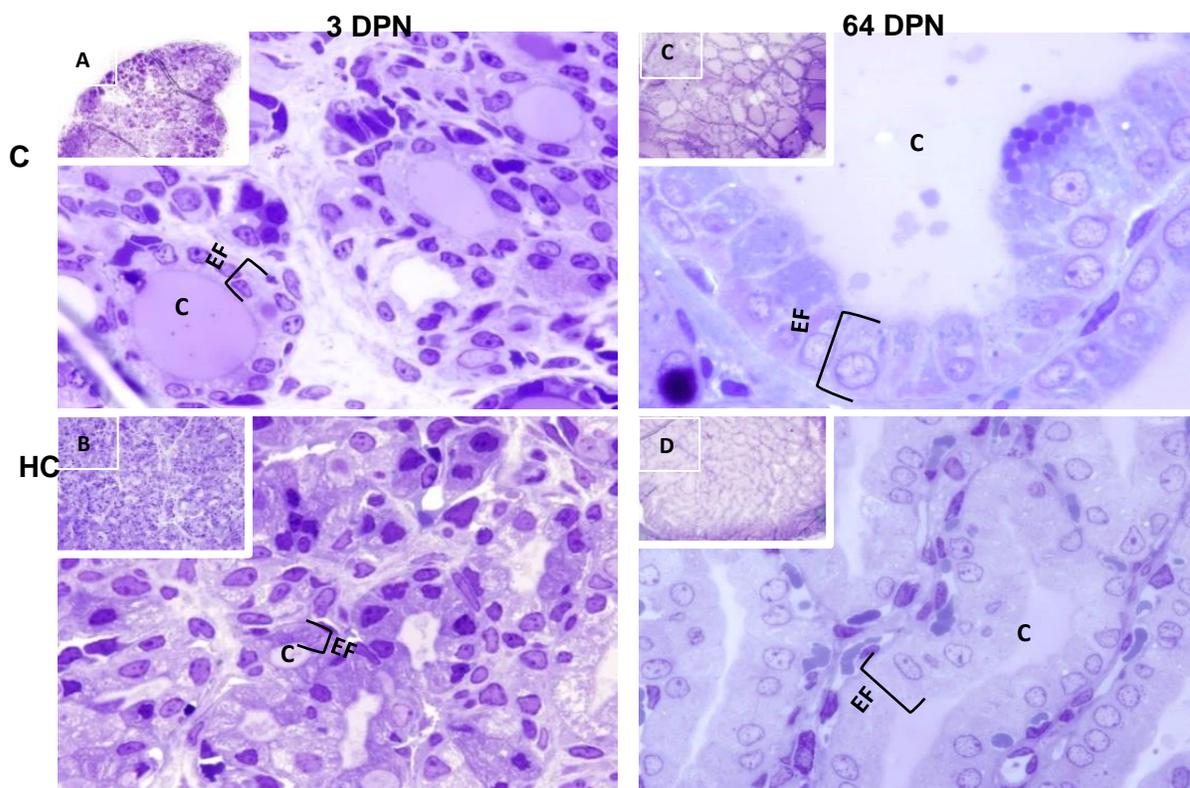


Figura 11. Fotomicrografías de cortes histológicos de la glándula tiroides de grupos controles y grupos con HC de 3 y 64 dpn. A y C: Tiroides de animales del grupo control de 3 y 64 dpn respectivamente, B y D: Tiroides de animales con HC 3 y 64 dpn respectivamente. Tinción azul de toluidina 60x insertos 10x

8.3. Área del cordón/tubo seminífero

El área del cordón/tubo seminífero mostró una reducción estadísticamente significativa (* $p < 0.05$) para los grupos de 5, 8, 10, 16 y 64 dpn con HC inducido, siendo el grupo de 3 dpn el único en no presentar esta alteración (Tabla 3, Figura 12).

DPN	3	5	8	10	16	64
C	21134.8±2300.37	22855.3±4049.83	31589.8±2182.13	52820.8±842.33	68879.8±1031.15	707613.5±747799.6
HC	24034.1±2374.61	13302.7±3036.03*	14929.4±8171.54*	35440.9 ±497.21*	49487.3±945.84*	391471.1±72942.4*

TABLA 3. Área del cordón/tubo seminífero para los grupos con HC expresados como $\bar{x} \pm DE$. * $p < 0.05$.

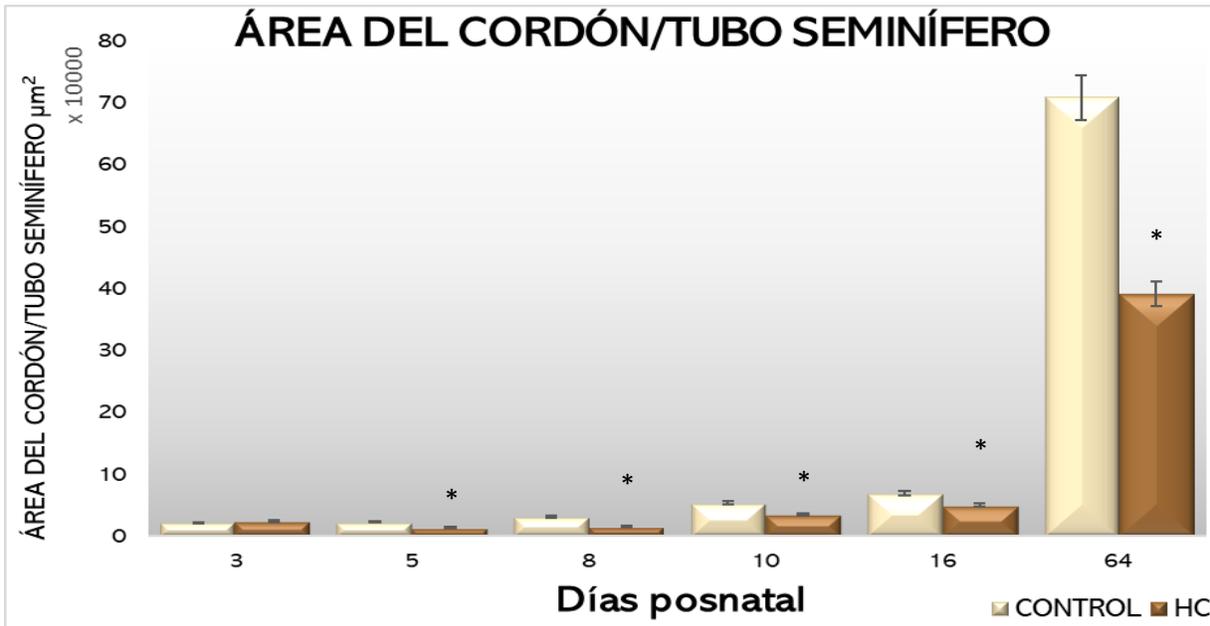


Figura 12. Área del cordón/tubo seminífero para los grupos con HC expresados como $\bar{x} \pm \text{DE}$. * $p < 0.05$.

8.4. Número de gonocitos

El número de gonocitos para los grupos de ratas con HC 5, 8, 10 y 16 fue estadísticamente mayor, sin embargo, el grupo de 3 dpn fue el único grupo con una reducción en el número de gonocitos (Figura 13).

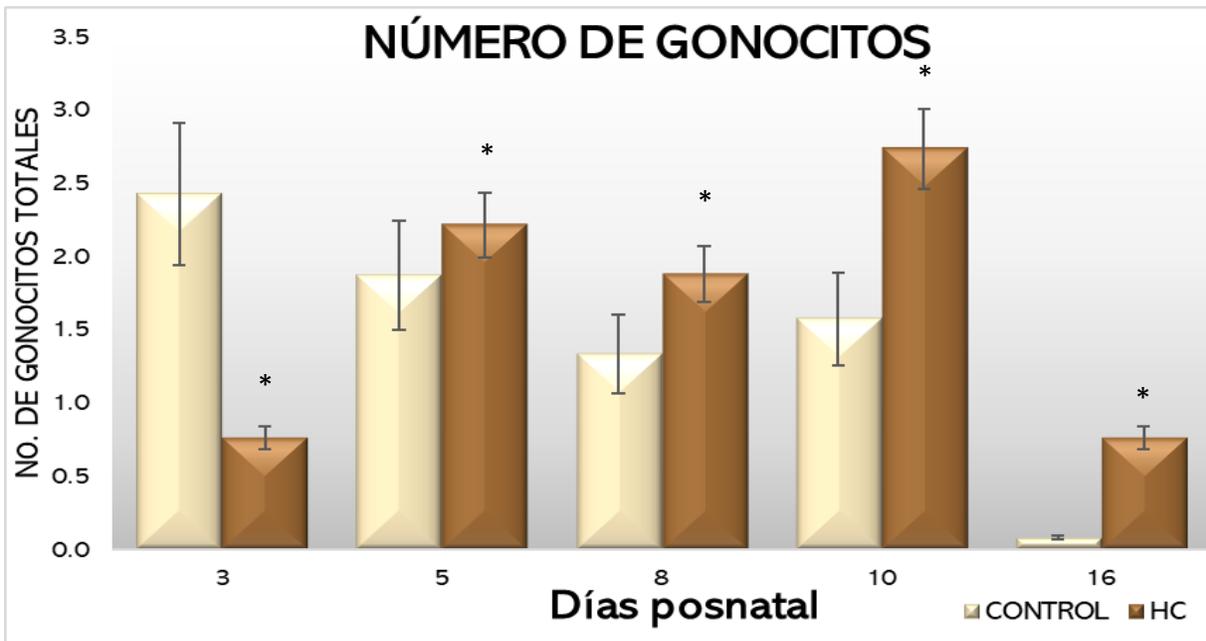


Figura 13. Número de gonocitos totales para los grupos con HC expresados como $\bar{x} \pm \text{DE}$. * $p < 0.05$.

8.5. Índice de diferenciación

Se tomaron en cuenta tres edades que abarcan el proceso de diferenciación de gonocitos a espermatogonias que son 8, 10 y 16 dpn, encontrando en los tres grupos, una reducción significativa en este proceso ($p < 0.05$). (Tabla 4, Figura 14).

<i>DPN</i>	<i>8</i>	<i>10</i>	<i>16</i>
<i>C</i>	1.84±.64	12.65±3.9	112.5±61
<i>HC</i>	0.36±.18	1.64±0.9*	12.38±1.5*

TABLA 4. Índice de diferenciación para los grupos con HC expresados como $\bar{x} \pm DE$. * $p < 0.05$



Figura 14. Índice de diferenciación para los grupos con HC expresados como $\bar{x} \pm DE$. * $p < 0.05$.

8.6. Número de espermatoцитos

También se realizó el conteo de espermatoцитos presentes para el grupo de 16 dpn, el número de estas células disminuyó significativamente en el grupo con HC (Figura 15).

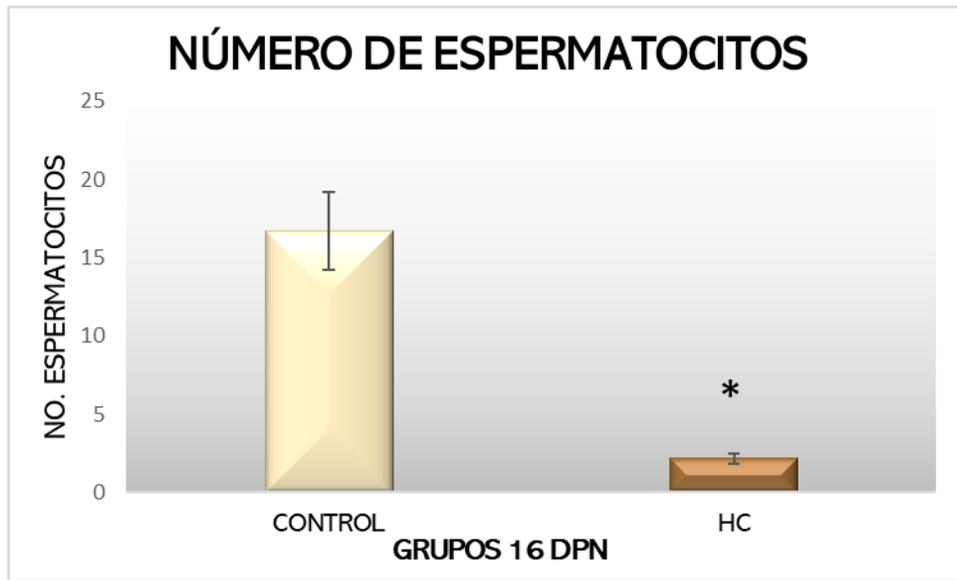


Figura 15. Número de espermatocitos para los grupos con HC expresados como $\bar{x} \pm DE$. * $p < 0.05$.

8.7. Número de células de Sertoli/área del cordón seminífero

El número de células de Sertoli/área del cordón seminífero mostró una reducción significativa ($p < 0.05$) para el grupo control de 3 dpn. Por el contrario, para las edades de 5, 8, 10, y 16 dpn, del grupo con HC, se presentó un aumento significativo de estas células. ($p < 0.05$) (Figura 16).

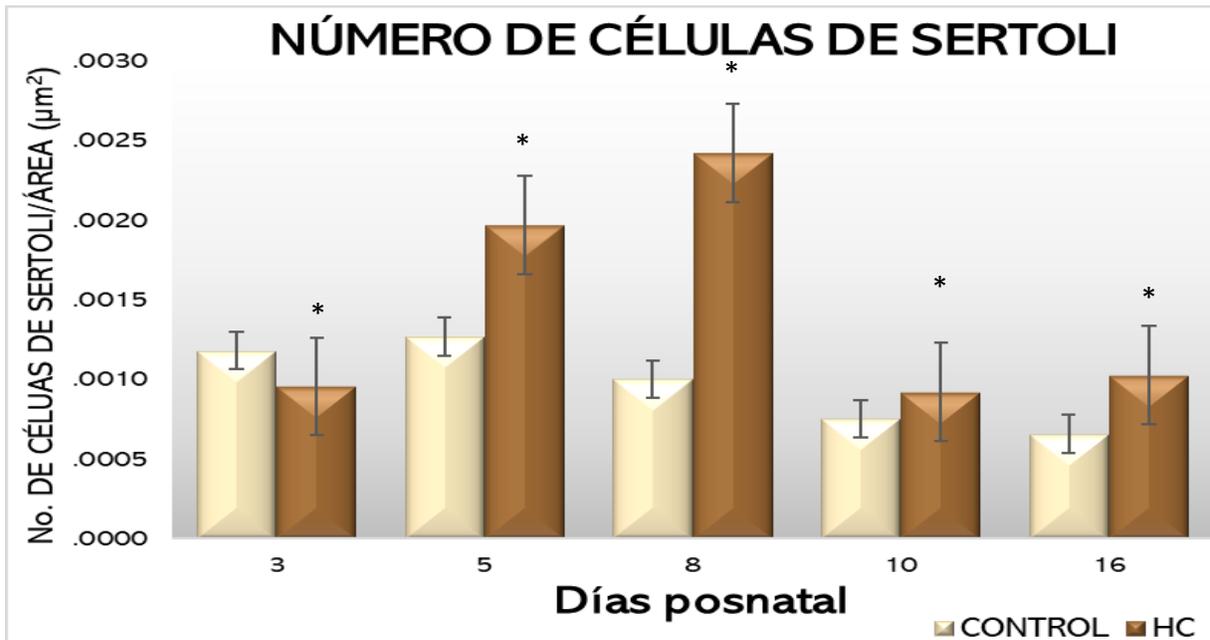


Figura 16. Número de células de Sertoli para los grupos con HC expresados como $\bar{x} \pm DE$. * $p < 0.05$.

8.8. Índice de maduración del epitelio seminífero (Johnsen)

La figura 17 muestra que los cordones/tubos seminíferos de los grupos control de 8, 10, 16 y 64 dpn presentan una maduración adecuada a su edad. En el caso del grupo de 64 dpn se observa una espermatogénesis completa con todos los tipos celulares germinales y somáticos que abarca un tubo seminífero sano.

Por el contrario, en los grupos con HC, se puede observar una reducción significativa en la maduración de estos epitelios ($p < 0.05$). Los grupos control de 3 y 5 dpn no pudieron ser comparados estadísticamente con los grupos con HC puesto que en ambos se cuenta con al menos un tipo celular germinal dentro de los cordones seminíferos, considerando que el puntaje más bajo en el índice de maduración es la ausencia total de células dentro del cordón o tubo seminífero.

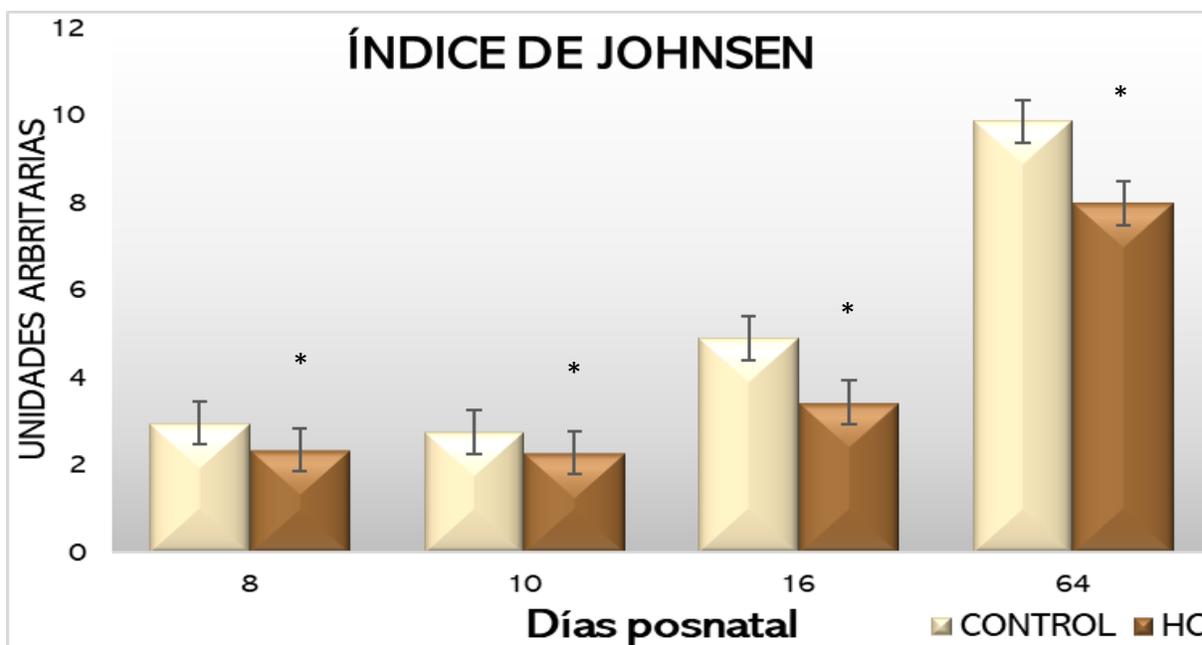


Figura 17. Índice de maduración del epitelio seminífero en grupos con HC. $\bar{x} \pm DE$ (* $p < 0.05$).

8.9. Índice histopatológico

El índice histopatológico mostró daños significativos ($p < 0.05$) para todos los grupos con HC con respecto al control, en donde se destaca la presencia de degeneración celular, vacuolización epitelial y picnosis (figura 18).

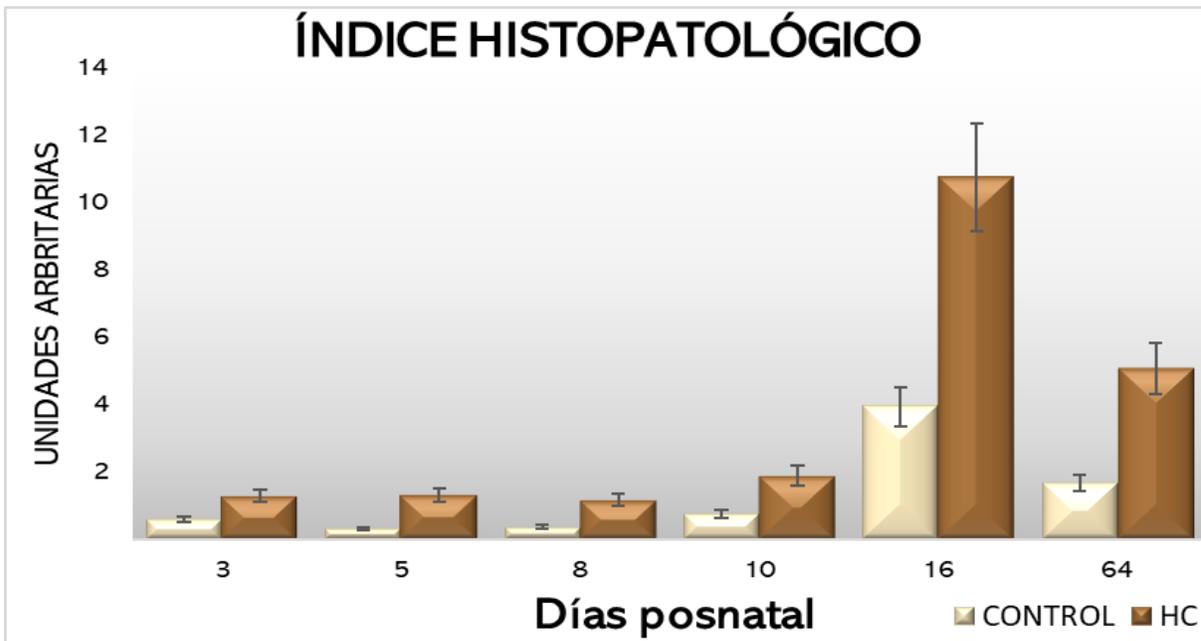


Figura 18. Índice de histopatológico dentro de cordón/tubo seminífero en grupos con HC. $\bar{x} \pm DE$ ($*p < 0.05$).

Las figuras 19 y 20 muestran cortes histológicos de los diferentes grupos, en donde se pueden observar las alteraciones que se han mencionado a lo largo del estudio, desde la reducción en los cordones/tubos seminíferos, la falta de maduración, así como los daños histopatológicos generados por el HC.

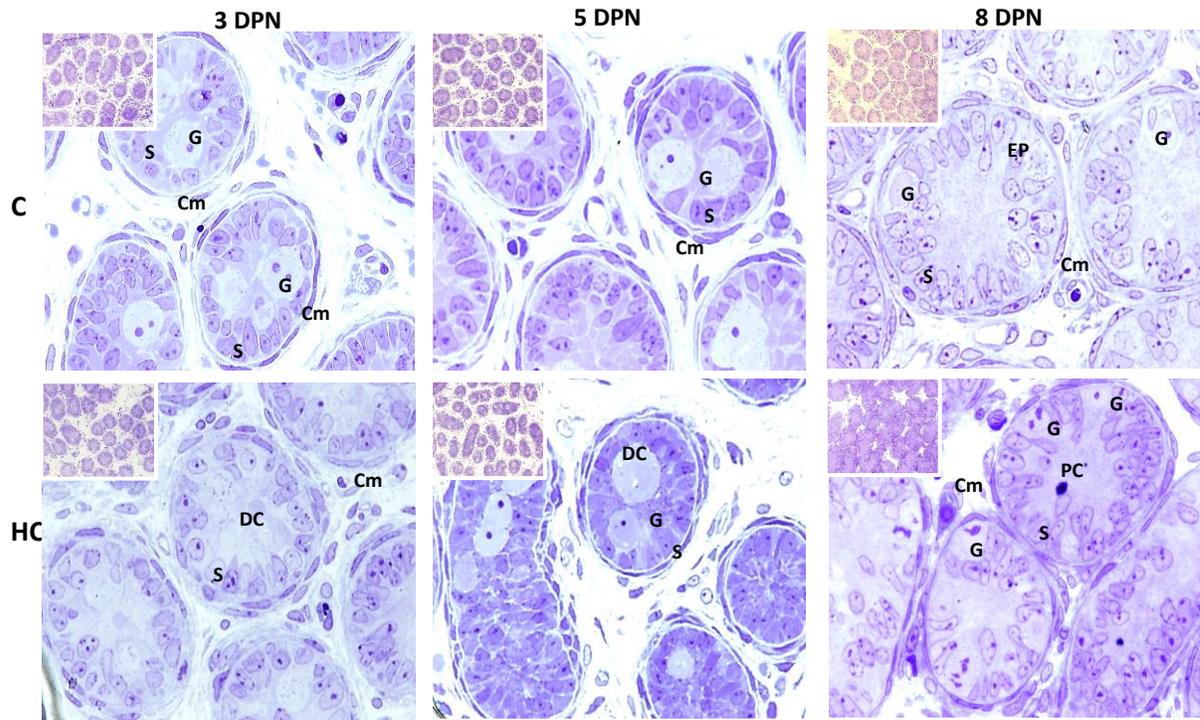


Figura 19. Cortes histológicos que muestran los daños generados por el HC en los grupos de 3, 5 y 8 dpn. La línea superior corresponde a controles (C) y la línea inferior a HC. En el grupo control de 3 dpn se observa gonocitos, mientras que en el grupo con HC de esa edad no se visualiza este tipo celular. En el grupo control de 5 dpn se observa un cordón seminífero morfológicamente normal, contrario al grupo HC 5 dpn el cual manifiesta más daños por descamación celular principalmente de los gonocitos. La principal característica del grupo control de 8 dpn es la poca cantidad de gonocitos puesto que se ha iniciado la diferenciación a espermatogonias, sin embargo, el grupo de HC 8 dpn muestra un número mayor de gonocitos que aún no inicia su transición a espermatogonia y un mayor daño por picnosis. G=Gonocitos, GT= Gonocitos en transición, S=Célula de Sertoli, Cm=Células mioides, PC=Picnosis, DC=Descamación celular. Azul de Toluidina 60x, insertos 20X.

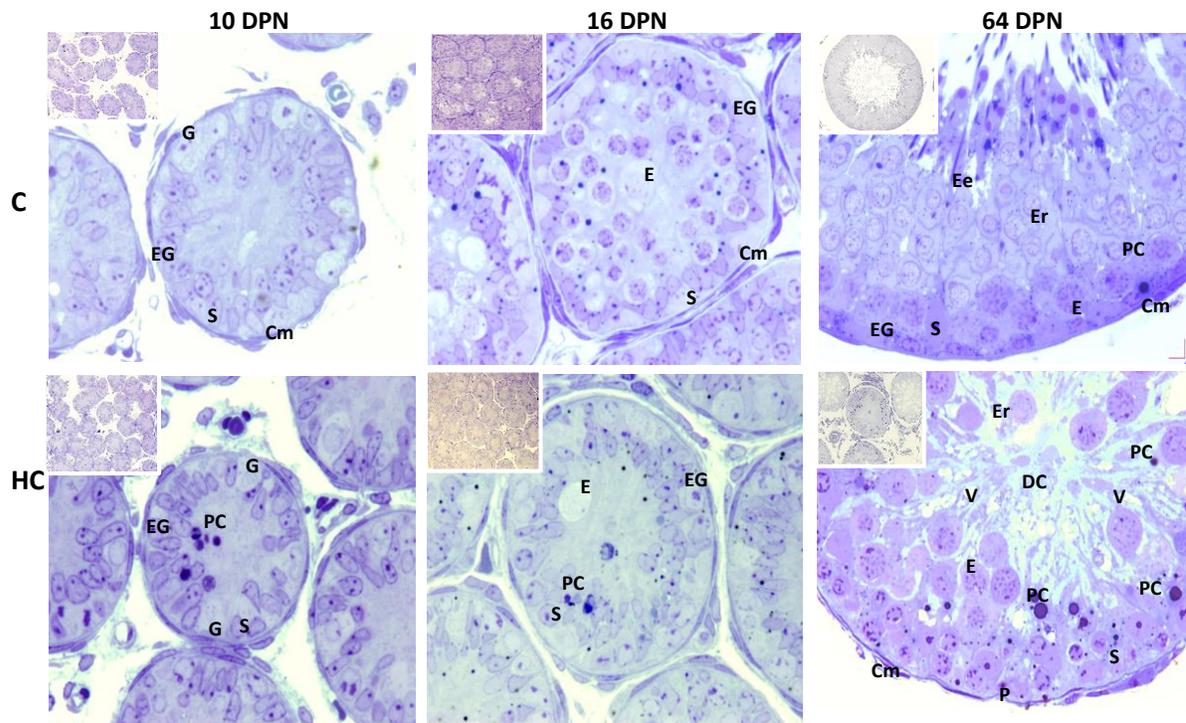


Figura 20. Cortes histológicos que muestran los daños generados por el HC en los grupos de 10,16 y 64 dpn. La línea superior corresponde a controles (C) y la línea inferior a HC. En el grupo control de 10 dpn se observa una cantidad considerable de espermatogonias, contrario al grupo de HC 10 dpn en donde se observa poca cantidad de estas células. Lo más relevante para el grupo control de 16 dpn es la gran cantidad de espermatocitos presentes, ya que en el grupo de 16 dpn con HC se observa una cantidad significativamente menor en comparación con este grupo. En el grupo control de 64 dpn se observan tubos seminíferos con citoarquitectura normal, espermatogénesis completa con luz al centro y pocos daños histopatológicos. Por otro lado, en el grupo con HC solo se observan células germinales hasta espermátida redonda, en este grupo se presentan diferentes daños por acción del HC. Los tres grupos presentan disminución del área del tubo seminífero, picnosis y daños por degeneración celular. G=Gonocito, EG=Espermatogonia, E=Espermatocitos, Er=Espermatida redonda, Ee=Espermatida elongada, S=Célula de Sertoli, Cm=Células mioides, PC=Picnosis,

8.10. Inmunohistoquímica PCNA

Se realizó inmunohistoquímica para para detectar a PCNA, dando como resultado visual una mayor inmunoreactividad para los núcleos de las células de Sertoli y células germinales en el grupo con HC inducido (Figura 21).

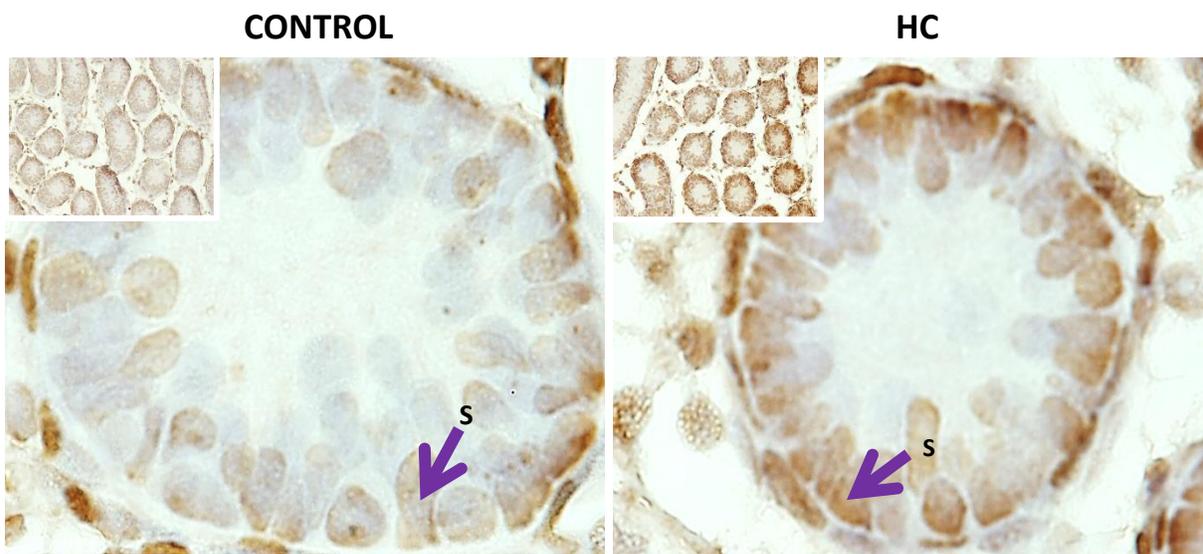


Figura 21. Se muestra inmunoreactividad para PCNA en los cordones seminíferos de rata de 10 dpn con HC. 60X insertos 20X. S= Cel. de Sertoli

8.11. Parámetros espermáticos

A los 64 dpn, se obtuvieron espermatozoides del epidídimo para analizar la concentración, vitalidad y morfología, como se observa en la tabla 3. El grupo control contó con una importante concentración espermática, número de espermatozoides vivos, así como espermatozoides morfológicamente normales. Para el grupo con HC, no se encontraron espermatozoides dentro del epidídimo.

PARÁMETROS ESPERMÁTICOS	CONTROL ($\bar{x} \pm DE$)
CONCENTRACION ESPERMÁTICA ($10^6/mL$)	14.7 \pm 4.3
MORFOLOGÍA (% NORMALES)	83.8 \pm 1.6
VITALIDAD (% VIVOS)	73.2 \pm 3.67

TABLA 5. Parámetros espermáticos de grupo control

9. DISCUSIÓN

La hormona tiroidea es un factor importante para el crecimiento y el desarrollo normal del organismo por lo que la falta de esta hormona desencadena una serie de cambios en el metabolismo y también se sabe que afecta la reproducción masculina.

El hipotiroidismo en la infancia genera deficiencia del peso corporal, la falta de tratamiento oportuno hace que no se alcance el peso y la talla adecuado tanto en humanos como en modelos experimentales (Wassner y Brown, 2015). Casey *et al.*, (2005) se atribuye esta deficiencia de peso, generadas por el HC, a que las HTs juegan un papel importante en el desarrollo y crecimiento fetal y al nacimiento se mantiene esta condición al permanecer baja la concentración de HTs (Abalovich *et al.*, 2007). Se ha observado en niños con HC tratados poco después del nacimiento, una estatura adulta normal, lo que indica que el HC puede ser revertido sobre la talla a largo plazo (Salerno *et al.*, 2001; Segni *et al.*, 2017).

Con respecto al peso testicular, el cual se encontró disminuido en las ratas con HC de 16 y 64 dpn. Existen estudios controversiales, por un lado, Rijntjes *et al.*, (2017) mencionan que, dado que las HTs promueven la diferenciación de las células de Sertoli e inhiben su proliferación, en las ratas afectadas por HC, el periodo proliferativo de este tipo celular se extiende, retrasando su diferenciación y resultando en un aumento del peso de los testículos. Sin embargo, Simorangkir *et al.*, (1997) encontraron que, a pesar de una mayor masa testicular en la vida adulta, el número de células germinales disminuye significativamente en ratas juveniles hipotiroideas. La razón de esta diferencia sigue siendo poco conocida. Algunos autores como Choudhury *et al.* (2003) sugieren que en ratas con bloqueo farmacológico del funcionamiento de la glándula tiroidea se puede encontrar bajo peso testicular. Y puede ser debido a que la deficiencia de HTs afecta el sistema de defensa antioxidante de los testículos de ratas adultas afectando la fisiología de los testículos a través del estrés oxidante.

La disminución observada en área del epitelio seminífero coincide con Choudhury *et al.*, (2003) donde se explica que el diámetro, el área y número de cordones o tubos seminíferos podrían verse disminuidos en el HC, aunque el mecanismo por el cual

sucede aún no es claro. Se cree que puede existir una relación entre el estrés oxidante y el número de células que entran en apoptosis en el testículo (Sedha *et al.*, 2015; Ghosh y Mukherjee, 2018). Un mayor daño causado por el estrés oxidante en el epitelio seminífero en animales con HC se podría relacionar con un mayor número de células apoptóticas influyendo así en una disminución del área del cordón/tubo seminífero y del peso testicular observado en el presente trabajo.

Dentro de los cordones seminíferos, el número total de gonocitos fue reducido al dpn 3 en el grupo con HC, probablemente se deba a que a esta edad los gonocitos son más susceptible a la condición tiroidea, lo que coincide con un mayor daño histopatológico a esta edad. Es probable que estén implicados altos niveles de especies reactivas de oxígeno en estas células (O'Flaherty *et al.*, 2019); dado que se ha documentado que, en este padecimiento los sistemas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa se ven reducidos ocasionando daños celulares (La Vignera y Vita, 2018).

En condiciones normales, el proceso de diferenciación del gonocito a espermatogonia comienza en el dpn 6, por lo que, a esta edad, comienza la disminución gradual en el número de gonocitos (Manku y Culty, 2015), en animales de 16 días aún se pueden visualizar el proceso de diferenciación a espermatogonia (Zogbi *et al.*, 2012). El aumento en el número de gonocitos a los 5, 8, 10 y 16 dpn en el grupo con HC, por la falta de diferenciación en este modelo de HC, sugiere un retraso en este proceso, puesto que al día 16 se encuentran presentes espermatocitos en menor cantidad en comparación con el grupo control.

La obtención del bajo índice de diferenciación en los grupos con HC de 8, 10 y 16 dpn, supone un aumento en el número de gonocitos y una reducción en el número de espermatogonias. La reducción en este índice podría deberse a la alteración de algunos factores que participan en este proceso, por ejemplo, el PDGF y su receptor (PDGFR), el cual ya se descrito su participación con las HTs. Anteriormente se ha descrito en estudios *in vitro* que la falta de HTs puede inhibir a PDGFR impidiendo así la unión a su ligando (Mousa *et al.*, 2014). El PDGFR es esencial para el desarrollo

testicular y la inhibición del gen de este factor produce poca o nula diferenciación de gonocitos a espermatogonias, lo que también podría explicar la reducción general del tamaño testicular (Basciani *et al.*, 2010). Además, PDGFR y STRA 8 se consideran indicadores confiables de la acción del AR en células germinales (Zhou *et al.*, 2008); el AR es un factor promotor en la espermatocitogénesis (mitosis) y en la meiosis I, primordial en la finalización de la meiosis II y la subsecuente espermiogénesis (Ramírez-López y Prada-Quiroga, 2015). PDGF se ha descrito como un potente regulador de la migración celular en el epitelio seminífero ya que su inhibición farmacológica conduce a un mayor número de gonocitos y de células apoptóticas (Basciani *et al.*, 2008). Por lo que en este modelo experimental se podría esperar que la falta de HTs este alterando la expresión de PDGF y PDGFR teniendo como resultado mayor cantidad de gonocitos, menor número de espermatogonias y por consiguiente un índice de diferenciación menor.

Otro efecto del HC fue relacionado al número de células de Sertoli en los cordones seminíferos. Se ha establecido que las olas proliferativas de estas células ocurren en la etapa fetal, neonatal y puberal (Griswold, 2015). Sin embargo, en la etapa fetal y neonatal, estas células son sensibles a presentar apoptosis, proceso que puede aumentar si hubiera algún daño en la célula de Sertoli (Murphy y Richburg, 2015). Esto coincide con la disminución de las células de Sertoli en el dpn 3. Por otro lado, se observó un aumento significativo en el número de células de Sertoli en el grupo con HC de 5, 8, 10 y 16 dpn comparado con el grupo control. Se sabe que las HTs marcan el cese de la proliferación de estas células (Holsberger y Cooke, 2005; Meroni *et al.*, 2019). Por lo que, ya ha sido documentado tanto en cultivos celulares como en modelos experimentales, que la falta de HTs aumenta el número de células de Sertoli (Holsberger *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2008; La Vignera y Vita, 2018; Hernández y Martínez, 2020).

La proliferación de las células de Sertoli y de las células germinales se ha asociado con distintos marcadores como DMRT1, Ki67 y PCNA, este último se encuentra en el núcleo de la célula de Sertoli (Griswold, 2015) y se sabe que se expresa con intensidad hasta el dpn 7 (Mital *et al.*, 2014). Los datos cualitativos de la inmunohistoquímica

sugieren una sobreexpresión a los 10 dpn en el grupo con HC. Por otro lado, se ha observado que algunos metabolitos de la hormona T₃ como lo es T₂, podrían estar inhibiendo esta molécula a través de sus sitios de unión al ADN en cultivos celulares tumorales (Punchihewa *et al.*, 2012). En células testiculares se ha reportado que la hormona T₃ podría estar inhibiendo la proliferación de células de Sertoli regulando negativamente la expresión de proteínas inhibitorias del ciclo celular p27Kip1 y p21Cip1 en ratas. Estas, son reguladoras negativas por cinasas dependientes de ciclinas como las Cdk2 y Cdk4 requeridas para la transición de la fase G1 a la S (Arambepola *et al.*, 1998; Buzzard *et al.*, 2003); y otras moléculas como PCNA a través de la vía de señalización PI3K/AKT en animales como el lechón (Buzzard *et al.*, 2003). Por lo tanto, se podría sugerir que, el cese de la proliferación de las células de Sertoli y de las células germinales como los gonocitos, aumenta debido a que no hay una correcta regulación de la expresión de proteínas que participan en el cese de la proliferación celular, como lo hace PCNA, esto debido a la falta de HTs.

El tipo y número de células germinales presentes en los cordones/tubos seminíferos permiten determinar su estado de madurez. Éste fue, significativamente menor en los grupos con HC a partir del día 8 y hasta el día 64 posnatal, este hecho, como ya se mencionó, podría deberse a los daños generados por el estrés oxidante, asociados a la condición hipotiroidea, (Sedha *et al.*, 2015; La Vignera y Vita, 2018; O'Flaherty *et al.*, 2019). Sin embargo, también es importante recalcar que la célula de Sertoli dañada tiene una capacidad de soporte reducida, lo que influye en la disminución en la producción de los factores de sobrevivencia y el aumento de los factores apoptóticos que indudablemente dan como resultado la muerte de las células germinales (Murphy y Richburg, 2015), lo que podría disminuir el número celular y por lo tanto la madurez en estos epitelios.

Sumado a esto, se observó un índice histopatológico significativamente mayor en todos los grupos con HC. Se presentó una gran cantidad de degeneración y descamación celular al centro de los cordones seminíferos lo que podría ser producto de una mayor cantidad de células apoptóticas causadas por estrés oxidante que se

genera en el testículo con HC (Zamoner *et al.*, 2008; La Vignera y Vita, 2018), como se ha mencionado.

También, estos daños, se podrían explicar a través del desprendimiento de los gonocitos de las células de Sertoli, lo que repercute en un mayor número de células descamadas o degeneradas que se observan en este grupo. Este proceso de adhesión gonocito-Sertoli es llevado a cabo por la participación de NCAM. Se sabe que esta molécula regulada por las HTs, ya que se ha reportado que a concentraciones bajas de T₃ en cultivos celulares parece regular a la baja la producción de NCAM lo que resulta en el desprendimiento significativo de gonocitos (Laslett *et al.*, 2000). Por tanto, en los grupos con HC de este estudio se esperaría encontrar una expresión baja de esta molécula, lo que podría resultar en un mayor desprendimiento de gonocitos y células de Sertoli, que pueden llevar a la apoptosis de dichas células.

En los animales de 64 días con HC se observaron diferentes daños histológicos, como el detenimiento en la espermatogénesis. Como lo indica Simorangkir *et al.*, (1997) la ausencia de espermátidas redondas durante el hipotiroidismo transitorio indica que las HTs juegan un papel crucial en la supervivencia y proliferación de las células germinales, lo cual constituye un posible mecanismo por la acción directa de estas hormonas sobre dichas células. Otros daños son: degeneración, descamación celular y plegamiento de la lámina basal. Las células mioideas peritubulares y las células de Sertoli sintetizan laminina, perlecan, colágeno IV y nidogen, algunos estudios de cocultivo *in vitro* han demostrado que el ensamblaje de una matriz de la lámina basal de los túbulos seminíferos requiere una interacción entre ambos tipos de células (Skinner *et al.*, 1985; Richardson *et al.*, 1995). Se ha sugerido que el tratamiento con PTU (fármaco antitiroideo), afecta la maduración de los tipos de células que sintetizan y ensamblan de manera coordinada la lámina basal y, por lo tanto, un retraso en la maduración de las células mioideas peritubulares (Loveland *et al.*, 1998), lo que posiblemente derive en el daño observado en estos tubos seminíferos.

Finalmente, observamos ausencia de espermatozoides en el grupo con HC. Con respecto a este dato, se ha descrito, que en animales mayores a 90 dpn, se encuentra baja concentración de espermatozoides, baja motilidad y vitalidad, así como un

incremento en las alteraciones de la morfología en modelos experimentales con HC (Corrales-Hernández *et al.*, 1990; Hudson y Edwards 1992; Abalovich *et al.*, 1999; Umezu *et al.*, 2004; Aiceles *et al.*, 2017).

Krassas *et al.*, (2002); Krassas *et al.*, (2008) y Zamoner *et al.*, (2008) reportaron que, en las células de Sertoli de ratas con hipotiroidismo, la fosforilación y la inmunoreactividad del citoesqueleto a la vimentina se incrementa lo que sugiere una alta proporción de anomalías en los espermatozoides, probablemente por alteraciones del citoesqueleto, lo que podría explicar las anomalías en la morfología. Por otro lado, la motilidad y la vitalidad bajas en este padecimiento también se han asociado con el aumento del estrés oxidante.

En un modelo de rata de 64 dpn con HC no se encuentran espermatozoides presentes en el epidídimo. Sin embargo, como lo indica la literatura, a una edad más avanzada podría haber espermatozoides en menor cantidad, lo que se sugiere un posible retraso en el proceso de espermatogénesis en este modelo de HC.

En humanos se sabe que los pacientes con hipotiroidismo primario adquirido presentan un conteo espermático normal y que la exposición del semen al aire revela un secado rápido del material y por lo tanto la pérdida de movilidad de los espermatozoides (Krassas, 2004). Al tratamiento de restitución de hormonas tiroideas, estos pacientes recuperan el volumen seminal y la motilidad espermática, por lo que se ha concluido en estos trabajos que el hipotiroidismo primario adquirido, a corto plazo, no causa alteraciones seminales permanentes que perjudiquen la fertilidad masculina, si se obtiene tratamiento oportuno (Corrales-Hernández *et al.*, 1990; Krassas *et al.*, 2008; Krassas *et al.*, 2010). En humanos con HC se ha establecido que se puede afectar la motilidad espermática y que este parámetro se puede recuperar con un tratamiento oportuno (Patel y Kashanian, 2016). Sin embargo, en el HC se afecta la morfología espermática y esta condición se mantiene durante toda la vida adulta (Krassas y Marcou, 2019).

Es importante resaltar que los TR se encuentran en diferentes estados de desarrollo de las células germinales y las HTs están involucradas en la regulación de sus receptores (Carreón-Rodríguez y Pérez-Martínez, 2013). Los TR son identificados en espermatogonias, espermátocitos en preleptoteno, leptoteno, paquiteno, zigoteno, espermátida redonda y elongada. (Buzzard *et al.*, 2000). La localización de los TR en etapas tempranas, podrían sugerir una acción directa de las HTs sobre algunas células germinales que llevan a la formación de espermatozoides, aunque se sabe muy poco sobre los efectos directos de las HTs en la espermatogénesis y por lo tanto en la fertilidad a largo plazo. Las HTs también podría tener una acción indirecta sobre la regulación endocrina, ya que LH y testosterona son indispensables para completar la espermatogénesis, en el proceso de espermiogénesis (Koskenniemi *et al.*, 2017). Proceso que posiblemente este afectado en el presente trabajo.

En la figura 22 se propone un posible mecanismo del daño generado por el HC sobre el proceso de diferenciación testicular temprana y que afecta la función reproductiva en la etapa juvenil de ratas, donde se incluyen alteraciones en los factores y proteínas que participan en la diferenciación del gonocito a espermatogonia y los daños generados por el estrés oxidante.

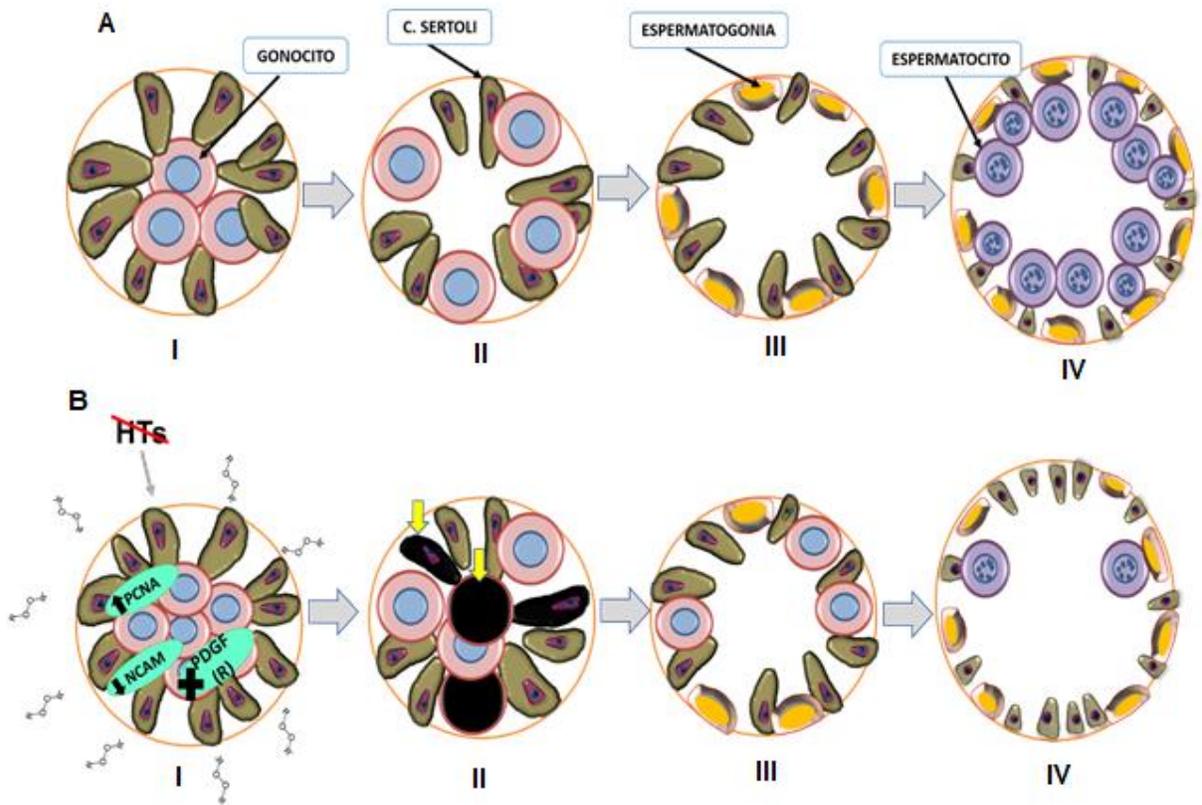


Figura 22. Esquema en donde se propone los posibles mecanismos del daño en la fertilidad generado por HC.

A) I. En el proceso temprano de la espermatogénesis se observa cierto número de gonocitos que se establecen en el centro de los cordones seminíferos. **II.** Posteriormente los gonocitos comienzan su migración a la lámina basal. **III.** A continuación inicia el proceso de diferenciación a espermatogonia. **IV.** Las espermatogonias se dividirán en un número considerable de espermatocitos, para así continuar el proceso de espermatogénesis.

B) I. Se observa un esquema de cordón seminífero donde se aprecia una elevada cantidad de gonocitos posiblemente por la inhibición de PDGF causada por la falta de HTs, en la periferia se observan las células de Sertoli que se adhieren a los gonocitos a través del factor NCAM. **II.** La baja regulación de NCAM sumada al estrés oxidante que se genera en el HC conduce a la descamación celular y apoptosis dentro del cordón seminífero, así como a un aumento en la proliferación de células de Sertoli medida por la sobreexpresión de PCNA, factor que interviene en la fase S del ciclo celular. **III.** Lo que ocasiona la falta de diferenciación a espermatogonia. **IV.** Finalmente se genera una baja cuenta de espermatocitos. La suma de estos factores repercute en la falta de diferenciación a espermatogonia afectando la espermatogénesis lo que podría ocasionar la infertilidad en ratas con HC.

Las flechas amarillas indican a las células en muerte o degeneración celular.

10. CONCLUSIÓN

En este modelo de rata con HC, el proceso de diferenciación de gonocitos a espermatogonias se ve afectado, lo que repercute en la calidad del epitelio seminífero y en los parámetros espermáticos en animales juveniles.

11. BIBLIOGRAFÍA

- **Abalovich M, Levalle O, Hermes R.** (1999). Hypothalamic-pituitary-testicular axis and seminal parameters in hyperthyroid males. *Thyroid*; 9:857-863.
- **Abalovich M, Mitelberg L, Allami C** (2007) Hipotiroidismo subclínico y autoinmunidad tiroidea en mujeres con infertilidad. *Gynecol Endocrinol* 23: 279–283
- **Aiceles V, Gombar F, da Fonte Ramos C.** (2017). Hormonal and testicular changes in rats submitted to congenital hypothyroidism in early life. *Mol Cell Endocrinol.* 439:65-73
- **Anbalagan J, Sashi A, Vengatesh G, Stanley J, Neelamohan R, Aruldas M.** (2010). Mechanism underlying transient gestational-onset hypothyroidism-induced impairment of posttesticular sperm maturation in adult rats. *Fertil Steril*; 93:2491-2497.
- **Anderson E, Baltus A, Roepers-Gajadien H, Hassold T, de Rooij D, van Pelt A, Page D.** (2008). Stra8 and its induced, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *PNAS*; 105:14976–14980.
- **Antony F, Aruldas M, Udhayakumar R, Maran R, Govindarajulu P.** (1995). Inhibition of Leydig cell activity in vivo and in vitro in hypothyroid rats. *J Endocrinol*; 144:293-300.
- **Arambepola N, Bunick D, Cooke P.** (1998). Thyroid hormone and follicle-stimulating hormone regulate Mullerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. *J Endocrinol*; 139:4489-95.

- **Ares-Segura S, Quero-Jiménez J, Morreale G.** (2009). Enfermedades frecuentes del tiroides en la infancia. *Rev Pediatr Aten Primaria*; 11 Supl 16:s173-s204.
- **Ariyaratne H, Mills N, Mason J, Mendis-Handagama S.** (2000). Effects of thyroid hormone on Leydig cell regeneration in the adult rat following ethane dimethane sulphonate treatment. *Biol Reprod*; 63(4):1115-23.
- **Armstrong M, Aziz N, Fingeret A.** Physiology, Thyroid Function. [Actualizado el 26 de marzo de 2020]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls.
- **Bagheri-Fam S, Argentaro A, Svingen T, Combes A, Sinclair A, Koopman P, Harley V.** (2011). Defective survival of proliferating Sertoli cells and androgen receptor function in a mouse model of the ATR-X syndrome. *Hum Mol Genet*. 20(11): 2213-24.
- **Baillie A.** (1964). The histochemistry and ultrastructure of the gonocyte. *J Anat*; 98:641–645.
- **Baltus A, Menke D, Hu Y, Goodheart M, Carpenter A, Ede Rooij D, Page D.** (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet*; 38:1430-1434.
- **Bano A, Chaker L, Muka T, Mattace-Raso, Bally L, Franco O, Peeters R, Razvi S.** (2020). Thyroid Function and the Risk of Fibrosis of the Liver, Heart, and Lung in Humans: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid* 0:145-157.
- **Basciani S, De Luca G, Dolci S, et al.** (2008). Platelet-derived growth factor receptor beta-subtype regulates proliferation and migration of gonocytes. *Endocrinol*; 149:6226–6235.
- **Basciani S, Mariani S, Spera G, Gnessi L.** (2010). Role of platelet-derived growth factors in the testis. *Endocr Rev*; 31(6):916-39.
- **Braun D, Schweizer U.** (2018). Thyroid Hormone Transport and Transporters. *Vitam Horm*,106:19-44.
- **Bouillet P, Oulad-Abdelghani M, Vicaire S.** (1995). Efficient cloning of cDNAs of retinoic acid-responsive genes in P19 embryonal carcinoma cells and characterization of a novel mouse gene, Stra1 (mouse LERK-2/Eplg2). *Dev Biol*; 170:420-433.
- **Bunick D, Cooke P y Yi-Dong Z.** (1994). Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible

mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol Reprod*; 51(5):1000-1005.

- **Buzzard J, Morrison J, O'Bryan M, Song Q, Wreford N.** (2000). Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod*; 62:664-669.
- **Buzzard J, Wreford N, Morrison J.** (2003). Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. *Endocrinology*; 144:3722-3731.
- **Carreón-Rodríguez A, Pérez-Martínez L.** (2013). El papel de los receptores de hormonas tiroideas en el desarrollo del sistema nervioso. *Rev eNeurobiol.* Vol 4. pp 36-40.
- **Casey B.** (2005). Environmental contaminants and maternal thyroid function. *Am J Obstet Gynecol.* 193(6):1889-1890.
- **Cavaliere H, Abelin N, Medeiros-Neto G.** (1988): Serum levels of total testosterone and sex hormone binding globulin in hypothyroid patients and normal subjects treated with incremental doses of L-T4 or L-T3; *J Androl* 9:215-219.
- **Chang C, Chen Y, Yeh S, Xu Q, Wang R, Guillou F, Lardy H, Yeh S.** (2004). Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101(18):6876-81.
- **Chen H, Wang Y, Ge R, Zirkin B.** (2017). Leydig cell stem cells: Identification, proliferation and differentiation [published correction appears in *Mol Cell Endocrinol.* 5;454-166
- **Choi J, Cho J, Kim J, Yoo E, Kim G, Yoo H.** (2020). Variable Clinical Characteristics and Molecular Spectrum of Patients with Syndromes of Reduced Sensitivity to Thyroid Hormone: Genetic Defects in the *THRB* and *SLC16A2* Genes. *Horm Res Paediatr*; 90(5):283-290.
- **Choksi N, Jahnke G, Hilaire C, Shelby M.** (2003). Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*; 68(6):479-91.
- **Choudhury S, Chainy GB, Mishro M.** (2003). Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis. *Andrologia*; 35:131-140.

- **Cioffi F, Gentile A, Silvestri E, Goglia F, Lombardi A.** (2018). Effect of Iodothyronines on Thermogenesis: Focus on Brown Adipose Tissue. *Front Endocrinol (Lausanne)*; 9:254.
- **Clerc J.** (2014). Imaging the thyroid in children. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*; 28:203-220.
- **Clermont Y, Leblond C, Messier B.** (1959). Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat. *Arch Anat Microsc Morphol Exp*; 48(Suppl):37-55.
- **Clermont Y, Leblond C.** (1955). Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the periodic acid-Schiff technique. *Am J Anat*; 96(2):229-53.
- **Clermont Y, Perey B.** (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat*; 100:241-267.
- **Clermont Y.** (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*; 112:35-51.
- **Cobb J, Handel M.** (1998) Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division. *Semin Cell Dev Biol*; 9(4):445-50.
- **Cooke P, Meisami E.** (1991). Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology*; 129:237-243.
- **Corrales-Hernández J, Miralles M, Garcia C.** (1990). Primary hypothyroidism and human spermatogenesis. *Arch Androl*; 25:21-7.
- **Cortes D, Muller J, Skakkebaek N.** (1987). Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl*; 10(4):589-96.
- **Culty M.** (2009). Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Defects Res C Embryo Today*; 87(1):1-26.
- **De Franca L, Hess R, Cooke P, Russell L.** (1995). Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *The Anatomical Record*; 242:57-69.
- **Deladoëy J, Ruel J, Giguère Y, Van Vliet G.** (2011). Is the incidence of congenital hypothyroidism really increasing? A 20-year retrospective population-based study in Québec. *J Clin Endocrinol Metab*; 96(8):2422-2429.

- **Dirami G, Ravindranath N, Achi M, Dym M.** (2001). Expression of Notch pathway components in spermatogonia and Sertoli cells of neonatal mice. *J of Androl*; 22:944–952.
- **Donnelly P, White C.** (2000). Testicular dysfunction in men with primary hypothyroidism; Reversal of hypogonadotropic hypogonadism with replacement thyroxine. *Clin Endocrinol*; 52:197-201.
- **Duran İ, Gülçelik N, Bulut B, Balcı Z, Berker D, Güler S.** (2019). Differences in Calcium Metabolism and Thyroid Physiology After Sleeve Gastrectomy and Roux-En-Y Gastric Bypass. *Obes Surg*; (2):705-712.
- **Eddy E.** (1999). Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod*; 4(1): 23-30.
- **Elftman H.** (1963). Sertoli cells and testis structure. *Am J Anat*; 113:25-33.
- **Eugster E, LeMay D, Zerlin J, Pescovitz O.** (2004). Definitive diagnosis in children with congenital hypothyroidism. *J Pediatr*; 144:643-647.
- **Fernández-Tresguerres J, Ariznavarreta C, Cachofeiro V, Cardinali D, Escrich E, Gil-Lozaga P, Juliá V, Mora F, Romano M, Tamargo J.** (2010). *Fisiología Humana*. (4ed). México, México: McGraw Hill
- **Flink G.** (1989). Homeostasis y regulación hormonal. (Imagen neuroendocrina del cerebro). En C. W. Coen (Ed). *Las funciones del cerebro*. Pp 181-2015.
- **Francavilla S, Cordeschi G, Properzi G, Di Cicco L, Jannini E, Palmero S, Fugassa E, Loras B, D'Armiento M.** (1991). Effect of thyroid hormone on the pre- and postnatal development of the rat testis. *J Endocrinol*; 129:35-42.
- **Garcia T, de Falco T, Cape I, Hofmann M.** (2013). Constitutive activation of NOTCH1 signaling in Sertoli cells causes gonocyte exit from quiescence. *Developmental Biology*; 377:188–201
- **Garcia T, Hofmann M.** (2013). NOTCH signaling in Sertoli cells regulates gonocyte fate. *Cell Cycle*; 12:2538–2545.
- **Gaudino R, Garel C, Czernichow P, Léger J.** (2005). Proportion of various types of thyroid disorders among newborns with congenital hypothyroidism and normally located gland: A regional cohort study. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 62:444-448.
- **Ghosh S, Mukherjee S.** (2018). Testicular germ cell apoptosis and sperm defects in mice upon long-term high fat diet feeding. *J Cell Physiol*; 233(10):6896-6909.

- **Gilleron J, Nebout M, Scarabelli L, Senegas-Balas F, Palmero S, Segretain D, Pointis G.** (2006). A potential novel mechanism involving connexion 43 gap junction for control of Sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *J Cell Physiol*; 209:153-161.
- **Giulli G, Tomljenovic A, Labrecque N, Oulad-Abdelghani M, Rassoulzadegan M, Cuzin F.** (2002). Murine spermatogonial stem cells: targeted transgene expression and purification in an active state. *EMBO Reports*; 3:753-759.
- **Gomez G, Ruiz R, Sanchez V, Segovia A, Mendoza H, Montano S.** (2010). Hipotiroidismo. *Med Int Mex*; 26(5):462-471.
- **Grasberger H, Krassas S.** (2011). Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dys hormonogenesis. *Curr Opin Pediatr*; 23:421-428.
- **Griswold M, Mably E, Fritz I.** (1975). Stimulation by follicle stimulating hormone and dibutyryl cyclic AMP of incorporation of 3H-thymidine into nuclear DNA of cultured Sertoli cell-enriched preparations from immature rats. *Curr Top Mol Endocrinol*; 2:413-20.
- **Griswold M.** (2015). Sertoli Cell Biology. 2 edition. Center for Reproductive Biology School of Molecular Biosciences, College of Veterinary Medicine, Washington State University, Pullman, WA, USA; pp 1-30.
- **Hamouli-Said Z, Tahari F, Hamoudi F, Hadj-Bekkouche F.** (2007). Comparative study of the effects of pre and post natal administration of a thyroid drug on testicular activity in adult rat. *Folia Histochem Cytobiol*; 45 Suppl 1:S51–S57.
- **Hardy M, Kirby J, Hess RA, Cooke P.** (1993). Leydig cells increase their numbers but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism. *Endocrinol*; 132:2417-2420.
- **Hardy M, Sharma R, Arambepola N, Sottas C, Russell L, Bunick D, Hess R, Cooke P.** (1996). Increased proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat. *J Androl*; 17:231-238.
- **Haverfield J, Stanton P, Meachem S.** (2015). Adult Sertoli cell differentiation status in humans., in Sertoli cell biology, Griswold, M.D., Editor Elsevier: Waltham, MA; p. 81-98
- **Heller C, Clermont Y.** (1963). Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science*;140(3563):184-6.

- **Hermo L, Pelletier R, Cyr D, Smith C.** (2010). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes *Microsc Res Tech*; (4):241-78.
- **Hernández A, Martínez M.** (2020). Thyroid hormone action in the developing testis: intergenerational epigenetics. *J Endocrinol*; 244:R33-R46.
- **Hernández A.** (2018) Thyroid hormone deiodination and action in the gonads. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*; 2:18-23.
- **Hess R, Cooke P, Bunick D, Kirby J.** (1993). Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology*; 132:2607-2613.
- **Hess R, Franca L.** (2005). Chapter 3-Structure of the Sertoli cell. In: Skinner MK, Griswold MD, editors. *Sertoli cell biology*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; pp 19-40.
- **Hinojosa-Trejo M, Vela-Amieva M, Ibarra-González I, Cosío-Farias A, Herrera-Pérez L, Caamal-Parra G, Bolaños-Córdova L, García-Flores E.** (2018). Prevalencia al nacimiento de hipotiroidismo congénito. *Acta Pediatr Mex; Supl I* (39):5S-13S.
- **Hogarth C.** (2015). Retinoic acid metabolism, signalling and function in the adult testis, in *Sertoli cell biology*, Griswold, M.D., Editor Elsevier: Waltham, MA; p. 247-272.
- **Holsberger D, Cooke P.** (2005). Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res*, 322(1):133-40.
- **Holsberger D, Buchold G, Leal M, Kieseewetter S, O'Brien D, Hess R, et al.** (2005). Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biol Reprod*; 72:1429-36.
- **Hoyt D.** (1971). The reproductive biology of the Silverjaw Minnow, *Ericymba buccata* Cope, in Kentucky. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 100 (3): 510-519
- **Hudson R, Edwards A.** (1992). Testicular function in hyperthyroidism. *J Androl*; 13:117-24.
- **Jana N, Bhattacharya S.** (1994). Binding of thyroid hormone to goat testicular cell induces generation of a proteinaceous factor which stimulates androgen release. *J Endocrinol*; 143:549-56.

- **Jana N, Halder S, Bhattacharya S.** (1996). Thyroid hormone induces a 52 kDa soluble protein in goat testis Leydig cell which stimulates androgen release. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1292:209-214.
- **Jannini E, Crescenzi A, Rucci N, Screponi E, Carosa E, de Matteis A, Macchia E, d'Amati G, D'Armiento M.** (2000). Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab*; 85:3453-3457.
- **Jaya B, Khurana M, Ammini A, Karmarkar M, Ahuja M.** (1990). Reproductive endocrine functions in men with primary hypothyroidism: effect of thyroxine replacement. *Horm Res*; 34:215-218.
- **Joyce K, Porcelli J, Cooke P.** (1993). Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *Journal of Andrology*; 14:448-455.
- **Kaneko J.** (1989). Thyroid function. In: JJ Kaneko, editor. *Clinical biochemistry of domestic animals*. New York: Academic Press, Inc; p 634-635.
- **Kawaoi A.** (1987). Early stages of synthesis of thyroglobulin (Tg), thyroxine (T4), and triiodothyronine (T3) in fetal rat thyroid. An immunoelectron microscopic study. *J Histochem Cytochem*; 35(10):1137-42.
- **Khakisahneh S, Zhang X, Nouri Z, Hao S, Chi Q, Wang D.** (2019). Thyroid hormones mediate metabolic rate and oxidative, anti-oxidative balance at different temperatures in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*; 216:101-109.
- **Khan Y y Farhana A.** Histology, Thyroid Gland. [Actualizado el 16 de diciembre de 2019]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls
- **Kimura T, Furudate S.** (1996). Pituitary GH and prolactin deficiency and testis enlargement in hypothyroid rats caused by goitrogen methimazole. *Experimental Animals*; 45:369-375.
- **Krassas G, Markou K.** (2019). The impact of thyroid diseases starting from birth on reproductive function. *Hormones (Athens)*; (4):365-381.
- **Krassas G, Papadopoulou F, Tziomalos K, Zeginiadou T, Pontikides N.** (2008). Hypothyroidism has an adverse effect on human spermatogenesis: A prospective, controlled study. *Thyroid*; 18:1255-1259.
- **Krassas G, Pontikides N, Deligianni V, Miras K.** (2002). A prospective controlled study of the impact of hyperthyroidism on reproductive function in males. *J Endocrinol Metab*; 87:3667-3671.

- **Koskenniemi J, Virtanen H, Toppari J.** (2017). Testicular growth and development in puberty. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obe*, 24(3):215-224.
- **Kurinczuk J, Bower C, Lewis B, Byrne G.** (2002). Congenital hypothyroidism in Western Australia 1981- 1998. *J Paediatr Child Health*;38(2):187-191.
- **La Vignera y Vita.** (2018). Thyroid dysfunction and semen quality. *Int J Immunopathol Pharmacol*; 32:1-5.
- **LaFranchi S.** (2011). Approach to the diagnosis and treatment of neonatal hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*; 96:2959-2967.
- **Laslett A, Li L, Jester Jr, Orth J.** (2000). Thyroid hormone down-regulates neural cell adhesion molecule expression and affects attachment of gonocytes in Sertoli cell-gonocyte cocultures. *Endocrinol*,141(5):1633-41.
- **Leblond C, Clermont Y.** (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci*; 55:548-73.
- **Léger J.** (2015). Congenital hypothyroidism: A clinical update of long-term outcome in young adults. *Eur J Endocrinol*; 172:R67-R77.
- **Li H, Papadopoulos V, Vidic B, et al.** (1997). Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. *Endocrinology*; 138:1289-1298.
- **Livera G, Rouiller-Fabre V, Durand P, Habert R.** (2000). Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. *Biol Reprod*; 62:1303-1314.
- **Loveland K, Schlatt S, Sasaki T, Chu M, Timpl R, Dziadek M.** (1998). Developmental Changes in the Basement Membrane of the Normal and Hypothyroid Postnatal Rat Testis: Segmental Localization of Fibulin-2 and Fibronectin. *Biol of Reproduc*; 58:1123-1130.
- **Loveland K, Schlatt S.** (1997). Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *Endocrinol*; 153(3):337-44.
- **Manku G, Culty M.** (2015). Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges in Reproduction. *ReprodFertil Dev*; 149: R139–R157.
- **Manku G, Wang Y, Merkbaoui V, Boisvert A, Ye X, Blonder J, Culty M.** (2014). Role of Retinoic Acid and Platelet-Derived Growth Factor Receptor crosstalk in the regulation of neonatal gonocyte and embryonal carcinoma cell differentiation. *Endocrinology*; 14:15-24.

- **Manna P, Roy P, Clark B, Stocco D, Huhtaniemi I.** (2001). Interaction of thyroid hormone and steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in the regulation of murine Leydig cell steroidogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; 76:167-177.
- **Maradonna F, Carnevali O.** (2018). Lipid Metabolism Alteration by Endocrine Disruptors in Animal Models: An Overview. *Front Endocrinol (Lausanne)*; 9:654.
- **Maran R, Arunakaran J, Aruldas M.** (2000): T3 directly stimulates basal and modulates LH induced testosterone and oestradiol production by rat Leydig cells in vitro. *Endocr J* 47:417-428.
- **Maran R.** (2003). Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. *Archives of Androl*; 49:375-388.
- **McGrath N, Hawkes C, McDonnell C, Cody D, O'Connell S, Mayne P.** (2018). Incidence of Congenital Hypothyroidism Over 37 Years in Ireland. *Pediatrics*. pii:e20181199.
- **Mendis S, Meachem S, Sarraj M, Loveland K.** (2011). Activin A balances Sertoli and germ cell proliferation in the fetal mouse testis. *Biology of Reproduction*; 84:379-391.
- **Mendis-Handagama S, Ariyaratne H, Teunissen van Manen K, Haupt R.** (1998). Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biology of Reproduction*; 59:351-357.
- **Merlet J, Racine C, Moreau E, et al.** (2007). Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 104:3615-3620.
- **Meroni S, Galardo M, Rindone G, Gorga A, Riera M, Cigorruga S.** (2019). Molecular Mechanisms and Signaling Pathways Involved in Sertoli Cell Proliferation. *Front. Endocrinol*; 224(10):1-22.
- **Mital P, Kaur G, Bowlin B, Paniagua N, Korbitt G, Dufour J.** (2014). Nondividing, postpubertal rat sertoli cells resumed proliferation after transplantation. *Biol Reprod*, 90(1):13.
- **Moreno J, Bikker H, Kempers M, van Trotsenburg A, Baas F, de Vijlder J, Vulsma T, Ris-Stalpers C.** (2002). Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med*; 347:95-102.
- **Morris P, Malkin C, Channer K, Jones T.** (2004). A mathematical comparison of techniques to predict biologically available testosterone in a cohort of 1072 men. *Euro J Endocrinol*; 151:241-249.

- **Murphy C, Richburg J.** (2015). Implications of Sertoli cell induced germ cell apoptosis to testicular pathology. *Spermat.* 4(2):e979110.
- **Mousa S, Lin H, Yuan Tang H, Hercbergs A, Luidens M, Davis P.** (2014). Modulation of angiogenesis by thyroid hormone and hormone analogues: implications for cancer management. *Angiog*,17(3):463-9.
- **Nussey S y Whitehead S.** (2001). *Endocrinology: An Integrated Approach.* Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- **O'Donnell L, Stanton P, de Kretser.** *Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis.* [11 de junio de 2017]. En: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, *et al.*, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com.
- **O'Donnell L, Robertson K, Jones M, Simpson E.** (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev.*;22(3):289-318.
- **O'Flaherty C, Boisvert A, Manku G, Culty M.** (2019). Protective Role of Peroxiredoxins against Reactive Oxygen Species in Neonatal Rat Testicular Gonocytes. *Antioxidants (Basel)*, 9(1):32.
- **Oluwole O, Bartlewski P, Hahnel A.** (2013). Relationships of serum thyroid hormones and follicle-stimulating hormone concentrations to Sertoli cell differentiation during the first wave of spermatogenesis in euthyroid ram lambs. *Reprod Biol*; 13:150-160.
- **Omidi N, Khorgami M, Tajrishi F, Seyedhoseinpour A, Pasbakhsh P.** (2020). The Role of Thyroid Diseases and their Medications in Cardiovascular Disorders: A Review of the Literature. *Curr. Cardiol. Rev*; 16(2):103-116.
- **Organización Mundial de la Salud. OMS.** (2010). *Laboratory manual for the examination and processing of human semen.* 5th Ed. Geneva: World Health Organization.
- **O'Shaughnessy P.** (2014) Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*; 29: 55-65.
- **Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Decimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dolle P, Bronner S, Lutz Y, Chambon P.** (1996). Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra8*, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol*; 135:469-477.
- **Palmero S, de Marchis M, Gallo G y Fugassa E.** (1989). Thyroid hormone affects the development of Sertoli cell function in the rat. *J Endocrinol*; 123:105-119.

- **Park S, Chatterjee V.** (2005). Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet*; 42:379-389.
- **Patel N, Kashanian J.** (2016). Thyroid Dysfunction and Male Reproductive Physiology. *Semin Reprod Med*.34(6):356-360.
- **Picut C, Parker G.** (2017). Postnatal Organ Development as a Complicating Factor in Juvenile Toxicity Studies in Rats. *Toxicol Pathol*; 45(1):248-252.
- **Pin-Pui H, Yumiko S.** (2017). Gonocytes-to-spermatogonia transition initiates prior to birth in murine testes and it requires FGF signaling. *Mech. Dev*; 144:125-139.
- **Prasannakumar K, Khurana M, Ammini A, Godbole M, Ahuja M.** (1987). Pituitary response to luteinizing hormone releasing hormone in hypothyroidism. In: Vichanrat A, Nitiyanant W, Eastmen C, editors. *Recent Progress in Thyroidology*. New Delhi: Crystal; pp. 511–5.
- **Punchihewa C, Inoue A, Hishiki A, Fujikawa Y, Connelly M, Evison B, Shao Y, Heath R, Kuraoka I, Rodrigues P, Hashimoto H, Kawanishi M, Sato M, Yagi T, Fujii N.** (2012). Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication. *J Biol Chem*, 287(17):14289-300
- **Rahmani K, Yarahmadi S, Etemad K, Koosha A, Mehrabi Y, Aghang N, Soori H.** (2016). Congenital Hypothyroidism: Optimal Initial Dosage and Time of Initiation of Treatment: A Systematic Review. *Int J Endocrinol Metab*;14(3):e36080.
- **Ramírez-López L y Prada-Quiroga C.** (2015). La vitamina A: reguladora de la espermatogénesis. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá*. Vol. 2 No. 1
- **Rastogi M, LaFranchi S.** (2010). Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis*; 5:17.
- **Rebourcet D, O'Shaughnessy P, Monteiro A, Milne L, Cruickshanks L, Jeffrey N, Guillou F, Freeman T, Mitchell R, Smith L.** (2014) Sertoli cells maintain Leydig cell number and peritubular myoid cell activity in the adult mouse testis. *PLoS One*. 9(8): e10568.
- **Remaud S, Demeneix B.** (2019). Thyroid hormones regulate neural stem cell fate. *Biol Aujourd'hui*; 213(1-2):7-16.

- **Rendón-Macías M, Morales-García I, Huerta-Hernández E, Silva-Batalla A, Villasís-Keever M.** (2008). Birth prevalence of congenital hypothyroidism in Mexico. *Paediatr Perinat Epidemiol*; (5):478-485.
- **Richardson L, Kleinman H, Dym M.** (1995). Basement membrane gene expression by Sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. *Biol Reprod*; 52:320-330.
- **Rijntjes E, Gomes M, Zupanič N, Swarts H, Keijer J, Teerds K.** (2017). Transient Hypothyroidism: Dual Effect on Adult-Type Leydig Cell and Sertoli Cell Development. *Front Physiol.* 8:323.
- **Robbins J.** (2000). Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. In: LE Braverman, RD Utiger, editors. *Werner and Ingbar's, the thyroid*, 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 105-120.
- **Robertson D, Giacometti M, Foulds L, Lahnstein J, Goss N, Hearn M, et al.** (1989). Isolation of inhibin α -subunit precursor proteins from bovine follicular fluid. *Endocrinology*; 125(4):2141-9.
- **Rodríguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli.** (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.* 16(9):2262-70.
- **Romano R, Gomes S, Cardoso N.** (2017). New insights for male infertility revealed by alterations in spermatic function and differential testicular expression of thyroid-related genes. *Endocrine*; 55(2):607-617.
- **Rosen R y Saprà A.** Embryology, Thyroid. [Actualizado el 11 de diciembre de 2019]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls.
- **Rousset B, Dupuy C, Miot F, et al.** Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion. [Actualizado el 2 de septiembre de 2015]. En: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com.
- **Russell L.** (1991). The perils of sperm release 'let my children go'. *Int J Androl*; 14(5):307-11.
- **Ruwanpura S, McLachlan R, Meachem S.** (2010). Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol*; 205(2): 117-3.
- **Sakai Y, Yamashina S, Furudate S.** (2004). Developmental delay and unstable state of the testes in the rdw rat with congenital hypothyroidism. *Development Growth and Differentiation* 46:327-334.

- **Salerno M, Micillo M, Di Maio S, Capalbo D, Ferri P, Lettierio T, Tenore A.** (2001) Longitudinal growth, sexual maturation and final height in patients with congenital hypothyroidism detected by neonatal screening. *Eur J Endocrinol* 145:377–383
- **Sedha S, Kumar S, Shukla S.** (2015). Role of Oxidative Stress in Male Reproductive Dysfunctions with Reference to Phthalate Compounds. *Urol J.*;12(5):2304-2316.
- **Segni M, Feingold G, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G.** (2017). Disorders of the Thyroid Gland in Infancy, Childhood and Adolescence. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., eds. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.
- **Sertoli E.** (1865). Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi delm testicolo umano. *Morgagni*; 7:31-40.
- **Setchell B, Breed W.** (2006). CHAPTER 17 - Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. *P of Reproduction (Third Edition)*; 1:771-825.
- **Simorangkir D, Wreford N, De Kretser D.** (1997). Impaired germ cell development in the testes of immature rats with neonatal hypothyroidism. *Journal of Andrology*; 18:186-193.
- **Skinner M, Tung P, Fritz I.** (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol*; 100:1941-1947.
- **Spitzweg C y Morris J.** (2002). The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*; 57:559-574.
- **Stathatos N.** (2012). Thyroid physiology. *Med Clin North Am*; 96(2):165-73.
- **Teerds K, de Rooij D, de Jong F, van Haaster L.** (1998). Development of the adult-type Leydig cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels. *Biology of Reproduction*; 59:344-350.
- **Thomas J, Collett-Solberg P.** (2009). Collett-Solberg Perinatal goiter with increased iodine uptake and hypothyroidism due to excess maternal iodine ingestión. *Horm Res*; 72:344-347.
- **Thuillier R, Mazer M, Manku G, Boisvert A, Wang Y, Culty M.** (2010). Interdependence of platelet-derived growth factor and estrogen-signaling

pathways in inducing neonatal rat testicular gonocytes proliferation. *Biol Reprod*; 82(5):82536.

- **Toocheck C, Clister T, Shupe J, Crum C, Ravindranathan P, Lee T, Ahn J, Raj G, Sukhwani M, Orwig K, Walker W.** (2016). Mouse Spermatogenesis Requires Classical and Nonclassical Testosterone Signaling. *Biol Reprod*. 94(1):11.
- **Umezumi M, Kagabu S, Jiang J, Niimura S, Sato E.** (2004). Developmental hormonal profiles in rdw rats with congenital hypothyroidism accompanying increased testicular size and infertility in adulthood. *J Reprod Dev*. 50(6):675-684.
- **Van Haaster L, De Jong F, Docter R, De Rooij D.** (1992). The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology*; 131:1574-1576.
- **Vazzoler A.** (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Universidade Estadual de Maringá. Maringá. 169 p
- **Vela-Amieva M, Gamboa-Cardiel S, Pérez-Andrade M, Ortiz-Cortés J, González-Contreras C, Ortega-Velázquez V.** (2004). Epidemiology of congenital hypothyroidism in Mexico. *Salud Publica Mex*; 46(2):141-8.
- **Velázquez E, Arata G.** (1997). Effects of thyroid status on pituitary gonadotropin and testicular reserve in men. *Arch Androl*; 38:85-92.
- **Wagner M, Wajner S, Maia A.** (2008). The role of thyroid hormone in testicular development and function. *J Endocrinol*,199(3):351-65.
- **Walker W.** (2010) Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 365(1546):1557-69.
- **Wang Y, Culty M.** (2007). Identification and distribution of a novel platelet-derived growth factor receptor beta variant: effect of retinoic acid and involvement in cell differentiation. *Endocrinology*; 148(5):2233-2250.
- **Wassner A.** (2017). *Pediatric Hypothyroidism: Diagnosis and Treatment*. *Paediatr Drugs*;19(4):291-301.
- **Wassner A, Brown R.** (2015). Congenital hypothyroidism: recent advances. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*.;22(5):407-412.
- **Welsh T, Kasson B, Hsueh A.** (1986). Direct biphasic modulation of gonadotropin-stimulated testicular androgen biosynthesis by prolactin. *Biol Reprod*; 34:796-804.

- **Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G.** (2001). Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol*; (1):67-77.
- **Yasoda A.** (2018). Secondary osteoporosis. Hyperthyroidism. *Clin Calcium*; 28(12):1619-1625.
- **Zamoner A, Barreto K, Filho D, Sell F, Woehl V, Guma F, Pessoa-Pureur R, Silva F.** (2008). Propylthiouracil-induced congenital hypothyroidism upregulates vimentin phosphorylation and depletes antioxidant defences in immature rat testis. *J Mol Endocrinol*; 40:125-35.
- **Zhou Q, Li Y, Nie R, Friel P, Mitchell D, Evanoff R, Pouchnik D, Banasik B, McCarrey J, Small C.** (2008). Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro. *Biol of Reprod*; 78:537-545.
- **Zirkin R, Papadopoulos V.** (2018). Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod*, 99(1):101-111.
- **Zogbi C, Tesser R, Encinas G, Miraglia S, Stumpp T.** (2012). Gonocyte development in rats: proliferation, distribution and death revisited. *Histochem Cell Biol*, 138(2):305-22.

ANEXO I

Índice de maduración o de Jonhsen

<i>Puntaje</i>	<i>Maduración</i>
10	Espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides.
9	Espermatogénesis completa con poca cantidad de espermatozoides (5 por tubo).
8	No hay espermatozoides maduros, presencia de espermátidas maduras en diferenciación.
7	Gran cantidad de espermátidas sin algún signo de diferenciación.
6	Presencia de pocas espermátidas (5 por tubo).
5	Gran cantidad de espermatoцитos presentes.
4	Pocos espermatoцитos presentes (5 por tubo).
3	Presencia únicamente de espermatogonias.
2	No hay células germinales, sólo están presentes las células de Sertoli.
1	No hay células en el tubo seminífero.

ANEXO II

Índice Histopatológico

<i>Alteraciones histológicas</i>	<i>Puntaje</i>
A) Plegamiento de lámina basal.	1
B) Descamación celular.	1
C) Vacuolización epitelial.	2
D) Cincisio celular.	2
E) Picnosis.	2
F) Tubos sin espermátides.	3
G) Tubos sin espermatoцитos.	4