



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Tesis
que presenta

Alejandro Padrón Santillán

Para obtener el grado de

Maestro en Biología de la Reproducción Animal

**Alteraciones en la histopatología del testículo de rata provocadas
por una dieta deficiente en donadores de grupos metilo.**

Comité Tutorial

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Codirectora Interna

Dra. Concepción Sánchez Gómez

Codirectora Externa

Dr. Humberto González Márquez

Asesor

Ciudad de México, a 16 de marzo de 2022.

Comité Tutorial

Codirectora Interna

Profesora-Investigadora. Titular "C" T.C.

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Laboratorio de Andrología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: reyna@xanum.uam.mx

Codirectora Externa

Dra. Concepción Sánchez Gómez

Jefa del Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo
y Teratogénesis Experimental.

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Correo electrónico: csgomez_2000@yahoo.com

Asesor

Profesor-Investigador. Titular "C" T.C.

Dr. Humberto González Márquez

Laboratorio de Andrología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: hgm@xanum.uam.mx

Jurado del examen

Presidenta

Dra. Irma Jiménez Morales
Laboratorio de Andrología
Departamento de Ciencias de la Salud, D.C.B.S. U.A.M.-Iztapalapa
Correo electrónico: jimi@xanum.uam.mx

Secretario

Dr. Humberto González Márquez
Laboratorio de Expresión Génica
Departamento de Ciencias de la Salud, D.C.B.S. U.A.M.-Iztapalapa
Correo electrónico: hgm@xanum.uam.mx

Vocal

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos
Laboratorio de Neurohistología Conductual
Departamento de Biología de la Reproducción, D.C.B.S. U.A.M.-Iztapalapa
Correo electrónico: mrtc@xanum.uam.mx

Vocal

Dr. Julio César Chávez Zamora
Consortio de Fisiología del espermatozoide
Instituto de Biotecnología, U.N.A.M.
Correo electrónico: julio.chavez@ibt.unam.mx

Datos de la maestría y leyendas obligatorias

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 **Hospital Infantil de México Federico Gómez** y en la **Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa**.

Se recibió apoyo mediante una beca del **CONACyT** para estudios de posgrado con número de registro CVU: 1031151

Miembros de Jurado

Los miembros del jurado designado por la Comisión Académica de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**Alteraciones en la histopatología del testículo de rata provocadas por una dieta deficiente en donadores de grupos metilo**” con fecha 16 de marzo de 2022.

Presidenta

Dra. Irma Jiménez Morales

Secretario

Dr. Humberto González Márquez

Vocal

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos

Vocal

Dr. Julio César Chávez Zamora

Dedicatorias

A mi familia por ser el mejor ejemplo para mí, por otorgarme valores y por todo su amor

A mis amigos por los años de estar juntos compartiendo momentos que hacen la vida mejor.

A mis alumnos por motivarme, y por enseñarme que el que se atreve a enseñar, nunca debe dejar de aprender.

Agradecimientos

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana. Por ser más que una maestra, por enseñarme más allá de lo académico, además del comportamiento y la actitud laboral, por su apoyo y comprensión y por ser un ejemplo en muchos aspectos de mi vida.

Dra. Concepción Sánchez Gómez. Por haberme permitido trabajar a su lado y compartir laboratorio para seguir aprendiendo las técnicas que quería desarrollar.

Dr. Humberto González Márquez. Por todos los comentarios que siempre tenía hacia mí, por todas sus correcciones y comentarios que siempre tuvo hacia mí con la mejor actitud, siempre con respeto y siendo también un gran ejemplo.

A todos mis profesores, a los más importantes a lo largo de mi vida. Pero sobre todo a mis profesores de la licenciatura y maestría, que se comprometieron con esta profesión, porque fueron mi motivación, mi ejemplo y porque gracias a ellos logré estar más cerca de alcanzar los sueños que siempre imaginé.

A los miembros del Jurado **Dra. Irma Jiménez Morales, Dr. Humberto González Márquez, Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos y Dr. Julio César Chávez Zamora** por sus observaciones tan acertadas y su amable atención al presente trabajo.

Resumen

La metilación del ADN afecta a las interacciones ADN-proteína, la estructura y replicación del ADN, la expresión de genes y la diferenciación celular. La vitamina B12 es fundamental para la metilación biológica y es un paso esencial en el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, de ácidos grasos de cadena impar y de la cadena lateral del colesterol. La falta de grupos metilo disminuye la expresión de ER α y ER β y genera alteraciones en el testículo. El objetivo de este trabajo fue determinar el daño ocasionado por la carencia de donadores de grupos metilo en testículos de rata Wistar. Se utilizaron ratas Wistar macho de 300 g que fueron divididas en 2 grupos: el control y el grupo alimentado con dieta deficiente en metionina y colina (MCD). A los animales se les mantuvo con comida y agua *ad libitum*, con un ciclo de luz/obscuridad de 12X12 horas. Después de 6 semanas de tratamiento, se sacrificaron mediante eutanasia en una cámara de dióxido de carbono, seguida de decapitación. Se obtuvieron los testículos, se fijaron con formalina amortiguada y se tiñeron con H&E, MT y Direct red 80. Los receptores de estrógenos (ER α , ER β) y andrógenos (AR) se inmunolocalizaron usando anticuerpos monoclonales de conejo. Por cada testículo se observaron 5 secciones transversales de túbulos seminíferos en donde se determinó el área del túbulo seminífero, el número de espermatocitos, el índice de diferenciación y el grado de maduración del epitelio seminífero o índice de Jonhsen. La histología mostró daño en los grupos de dieta, comparados con los controles, principalmente en la integridad de las espermatogonias y los espermatocitos. En los análisis cuantitativos se observaron diferencias, pero éstas no fueron estadísticamente significativas. La expresión de los receptores mostró una diferencia variada en los dos grupos dependiendo del receptor estudiado. Se concluyó que la carencia de donadores de metilo, provocada por la dieta, generó alteraciones a nivel histológico y de expresión de receptores de hormonas esteroideas en el testículo de rata Wistar.

Abstract

DNA methylation affects DNA-protein interactions, DNA structure and replication, gene expression, and cell differentiation. Vitamin B12 is essential for biological methylation and is an essential step in the catabolism of branched-chain amino acids, odd-chain fatty acids, and the side chain of cholesterol. The lack of methyl groups decreases the expression of ER α and ER β and generates alterations in the testis. The main of this study was to determine the damage caused by the lack of methyl group donors in Wistar rat testes. Male 300 g Wistar rats were used, which were divided into two groups: the control and the group fed a diet deficient in methionine and choline (MCD). The animals were kept with food and water ad libitum, with a light / dark cycle of 12X12 hours. After six weeks of treatment, they were euthanized by passing out a carbon dioxide chamber, followed by decapitation. Testes were obtained, fixed with buffered formalin and stained with H&E, MT, and Sirius red. Rabbit Monoclonal antibodies were used to immunolocalize estrogen (ER α , ER β) and androgen (AR) receptors. Five cross-sections of seminiferous tubules were observed. Seminiferous tubule area, the number of spermatocytes, differentiation index, and degree of maturation of the seminiferous epithelium (Jonhsen index) were determined. The histological procedures showed damage in the diet groups, mainly in the integrity of the spermatogonia and the spermatocytes. In the quantitative analyzes, there were differences, but these were not statistically significant. The expression of the receptors showed a varied difference in the two groups depending on the receptor studied. We concluded that the lack of methyl donors, caused by diet, generates alterations at the histological level and in the expression of steroid hormone receptors in the testis of Wistar rat.

Índice

Página de datos de la Maestría y leyendas obligatorias.....	i
Firmas.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Dedicatorias	iv
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
Índice.....	vii
Lista de Figuras.....	iix
Introducción.....	1
Metilación biológica	1
Modelos de enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH)	5
Antecedentes	8
Toxicología de células germinales.....	8
Receptores a estrógenos en testículo	10
Vitamina B12 y receptores a estrógenos en aparato reproductor masculino.....	11
Justificación.....	13
Pregunta de investigación	14
Hipótesis.....	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
Materiales y métodos	15
Tratamiento de rata Wistar.....	15
Histología.....	15

Evaluación histopatológica	17
Inmunofluorescencia.....	17
Análisis estadístico	19
Resultados.....	20
Testículo de rata Wistar	20
Histología.....	20
Área del túbulo seminífero	24
Número de espermatoцитos.....	24
Índice de diferenciación del epitelio seminífero	25
Índice de madurez del epitelio seminífero de Jonhsen	26
Inmunofluorescencia.....	27
Discusión.....	34
Conclusión.....	40
Perspectivas.....	40
Bibliografía.....	41
Anexos.....	45
Anexo 1. Hematoxilina de Harris	45
Anexo 2. Hematoxilina de Weigert.....	45
Anexo 3. Eosina de Carnegie	46
Anexo 4. Fucsina-Escarlata	46
Anexo 5. Azul de anilina	46
Anexo 6. Ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico.....	47
Anexo 7. Deshidratación de los cortes	47
Anexo 8. Rehidratación de los cortes	47
Anexo 9. Índice de maduración o de Jonhsen	48

Lista de Figuras

Figura 1.	Intersección de la vía catabólica metilmalonil-CoA con síntesis de cofactor de adenosilcobalamina.....	3
Figura 2.	Ruta de remetilación, representada a través del ciclo de folato, del ciclo de la metionina y de la producción intracelular de MeCbl.	4
Figura 3.	Apoptosis fisiológica espermatogonial en el testículo de rata adulta..	9
Figura 4.	Efecto de la dieta deficiente en colina y metionina (MCD) en el testículo de rata Wistar.	22
Figura 5.	Porcentaje de area de la presencia de fibras de colageno en rata Wistar.....	23
Figura 6.	Área del túbulo seminífero para los grupos control y MCD	24
Figura 7.	Número de espermatocitos para los grupos control y MCD	24
Figura 8.	Índice de diferenciación para los grupos control y MCD	25
Figura 9.	Índice de Jonhsen para los grupos control y MCD.....	26
Figura 10.	Efectos de la expresión de receptores en testículo de rata Wistar	27
Figura 11.	Porcentaje de área de la expresión del receptor de estrógenos alfa.....	31
Figura 12.	Porcentaje de área de la expresión del receptor de estrógenos beta	32
Figura 13.	Porcentaje de área de la expresión del receptor de andrógenos	33

Introducción

De acuerdo con la OMS, la nutrición es la ingesta de alimentos relacionada con las necesidades del organismo; para conservar una buena salud es importante poner atención en una adecuada nutrición, con aporte suficiente y equilibrado, todo esto, combinado con ejercicio físico cotidiano. Una mala nutrición reduce las defensas inmunitarias aumentando las enfermedades, altera el desarrollo físico y mental, y reduce la productividad (OMS, 2021).

Las dietas deficientes en vitaminas del complejo B, han sido muy estudiadas en modelos de roedores por estar muy relacionadas con enfermedades de hígado graso y guardar una estrecha conexión con el síndrome metabólico y con la resistencia a la insulina, que tienen una amplia prevalencia en el mundo occidental (Kucera y Cervinkova, 2014). Estas dietas pueden ser más comunes de lo que parecen en los humanos, pues la falta de recursos económicos y el consumo excesivo de alimentos “chatarra” provoca que las personas consuman cada vez menos carne y productos de origen animal como huevo y leche, que son vitales para obtener las vitaminas del complejo B; aunado al incremento del gusto por las dietas ausentes de carne, como el veganismo, entre otras.

La intención de este trabajo es investigar la relación entre una dieta deficiente en donadores de grupos metilo, que semeja la falta de vitaminas del complejo B y las posibles alteraciones provocadas en la histología del testículo de rata.

Metilación biológica

La metilación es la adición de un grupo metilo (-CH₃) a una molécula, se produce en proteínas y en ácidos nucleicos, lípidos y metabolitos secundarios. La metilación del ADN es el mecanismo epigenético principal, implicado en la regulación de la expresión génica en mamíferos. Los patrones de metilación son especie específicos e inclusive tejido específicos. Tanto la metilación del ADN como su significado funcional son áreas de investigación activas, ya que influyen en la estructura y replicación del ADN, la

expresión genética, en las interacciones ADN-proteína y la diferenciación celular, entre otros aspectos (Rodríguez *et al.*, 2004).

La metilación biológica depende de la transferencia de grupos metilo, en la que la vitamina B12 y el folato son fundamentales. La vitamina B12 (cobalamina, Cbl) no se produce en humanos, aunque es necesaria para la función de dos enzimas, la metionina sintasa citosólica (MS, EC 2.1.1.13) y la metilmalonil-CoA mutasa mitocondrial (MUT, EC 5.4.99.2) (Watkins y Rosenblatt, 2017). MUT utiliza la forma adenosilada de Cbl para catalizar la conversión de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA (Figura 1). Éste es un paso esencial en el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, de los ácidos grasos de cadena impar y de la cadena lateral del colesterol (Fowler *et al.*, 2008).

Por el contrario, la MS requiere la forma metilada de Cbl y cataliza la remetilación de homocisteína a metionina, usando 5-metiltetrahydrofolato como donante de metilo. La producción de metionina no es el único propósito de esta reacción, aunque es un aminoácido esencial, también se convierte en S-adenosilmetionina (AdoMet). El grupo metilo de AdoMet se puede donar a varios sustratos tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y metabolitos secundarios. La utilización de 5-metiltetrahydrofolato como donante de metilo por MS vincula el metabolismo de Cbl con el metabolismo de un carbono mediado por folato que, además de la producción de metionina y AdoMet, se requiere para la síntesis *de novo* de purinas, para la producción de monofosfato de desoxitimidina (dTMP), y es una fuente de energía celular importante a través de la reducción de NADP⁺ a NADPH (Figura 2) (Froese *et al.*, 2019).

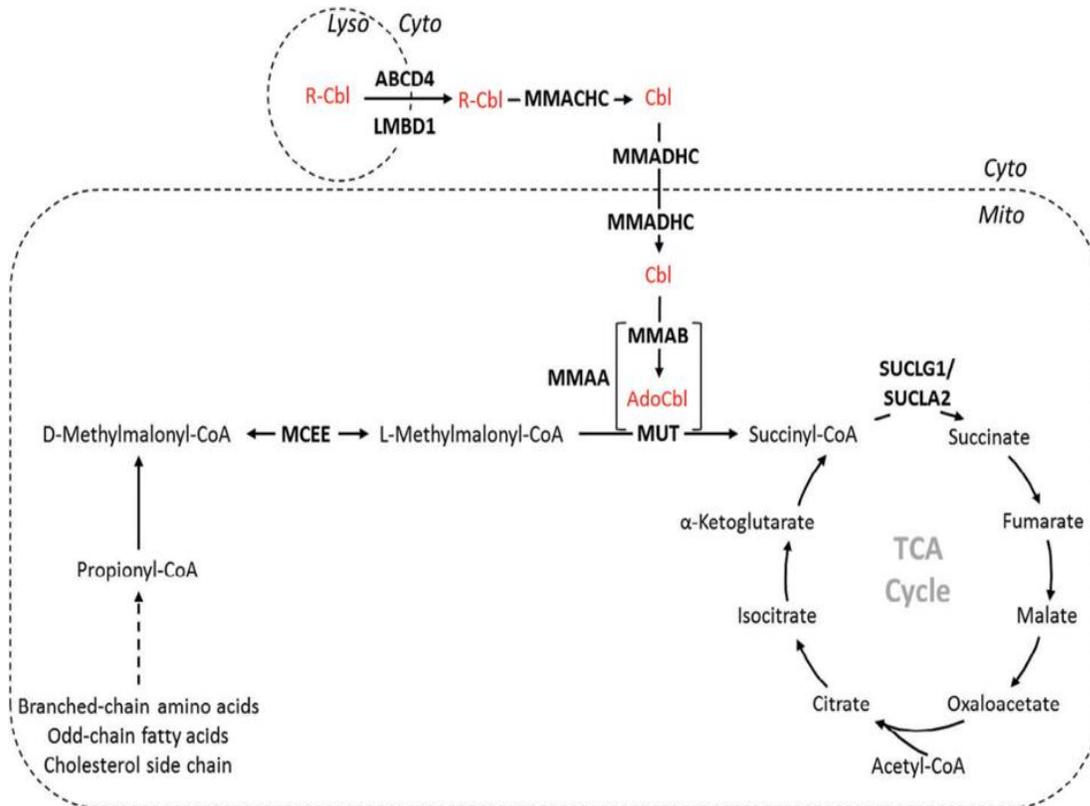


Figura 1. Intersección de la vía catabólica metilmalonil-CoA con síntesis de cofactor de adenosilcobalamina. Las flechas representan reacciones enzimáticas. Los nombres de las proteínas están en negro oscuro. Las formas de cobalamina están en rojo. ABCD4, miembro 4 de la subfamilia D de casete de unión a ATP; AdoCbl, adenosilcobalamina; Cbl, cobalamina (sin ligando axial superior unido); CoA, coenzima A; Cyto, Citosol; LMBD1, dominio de receptor de membrana que interactúa con lipocalina-1 que contiene 1; MCEE, metilmalonil-CoA epimerasa; Mito, mitocondria; MMAA, aciduria metilmalónica tipo cblA; MMAB, aciduria metilmalónica tipo cblB; MMACHC, aciduria metilmalónica tipo cblC con homocistinuria; MMADHC, aciduria metilmalónica tipo cblD con homocistinuria; MUT, metilmalonil-CoA mutasa; R-Cbl, cobalamina con ligando axial superior (por ejemplo, ciano-, hidrox-) unido; SUCLA2, subunidad beta formadora de ADP succinato-CoA ligasa; SUCLG1, subunidad alfa de succinato-CoA ligasa (Tomado de: Froese *et al.*, 2019).

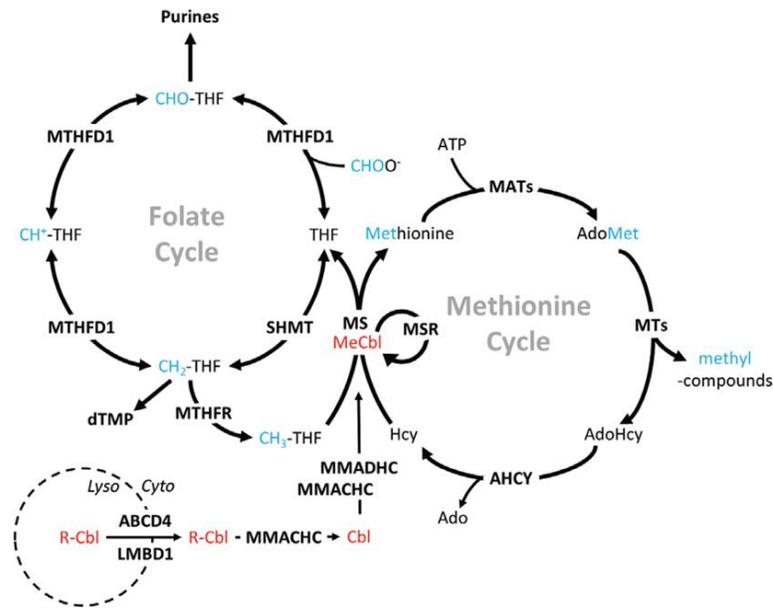


Figura 2. Ruta de remetilación, representada a través del ciclo de folato, del ciclo de la metionina y de la producción intracelular de MeCbl. Los nombres de las proteínas están en negro oscuro, las formas de cobalamina en rojo. Los grupos de carbono individuales que se originan a partir de formiato y terminan en compuestos metilados se representan en azul. ABCD4, miembro 4 de la subfamilia D de casete de unión a ATP; Ado, adenosina; AdoHcy, adenosilhomocisteína; AdoMet, S-adenosilmetionina; AHCY, adenosilhomocisteinasa; ATP, adenosina trifosfato; Cbl, cobalamina (sin ligando axial superior unido); CH + -THF, 5,10-meteniltetrahidrofolato; CH₂-THF, 5,10-metilenetetrahidrofolato; CH₃-THF, 5-metiltetrahidrofolato; CHO-THF, 10-formiltetrahidrofolato; CHOO⁻, formiato; dTMP, monofosfato de desoxitimidina; Cyto, Citosol; LMBD1, dominio de receptor de membrana que interactúa con lipocalina-1 que contiene 1; Liso, lisosoma; MAT, metionina adenosiltransferasa (s); MeCbl, metilcobalamina; MMACHC, aciduria metilmalónica tipo cblC con homocistinuria; MMADHC, aciduria metilmalónica tipo cblD con homocistinuria; MS, metionina sintasa; MSR, metionina sintasa reductasa; MTHFD1, metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1, ciclohidrolasa y formiltetrahidrofolato sintetasa 1; MTHFR, metilentetrahidrofolato reductasa; MT, metiltransferasa (s); RCbl, cobalamina con ligando axial superior (p. Ej., Ciano-, hidroxio-) unido; SHMT, serina hidroximetiltransferasa (Tomado de: Froese *et al.*, 2019).

El alcance y la gravedad de la enfermedad causada por la falta de donadores de grupos metilo y su disfunción subraya la importancia de sus vías para la salud humana (Froese *et al.*, 2019). La carencia de donadores de grupo metilo dificulta la metilación de biomoléculas indispensables para el buen desarrollo del metabolismo. Asimismo, la deficiencia en donadores de grupos metilo tiene una influencia perjudicial en el metabolismo energético y en la síntesis de hormonas esteroideas.

Los mecanismos implicados incluyen la reducción de la expresión de los factores específicos del hígado HNF-4-alfa, ER-alfa y ER-beta, además de hipometilación e hipoacetilación de PGC-1-alfa. Esto provoca esteatosis reversible cuando a los animales se les alimenta con una dieta normal. Sin embargo, una dieta hipercalórica en la vida adulta induce esteatosis con inflamación y fibrosis, lo que sugiere modificaciones epigenómicas (García *et al.*, 2011; Pooya *et al.*, 2012).

Asimismo, en ratones se ha evaluado el efecto de proporciones variables de Met:Cys sobre la tasa de anomalías en sus espermatozoides, la concentración de testosterona sérica y los niveles de receptor de andrógenos (AR), tanto en ARNm como en proteína. A medida que aumentaba la relación Met:Cys se encontró un incremento en la tasa de anomalías de los espermatozoides, lo que indica que las relaciones Met:Cys más bajas podrían mejorar la calidad del semen. La concentración sérica de testosterona se elevó significativamente en el grupo de proporción alta, comparado con los grupos de proporción baja y media, sin embargo, los niveles de ARNm y proteína de AR no fueron diferentes (Chen *et al.*, 2019).

Modelos de enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH)

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) es un problema grave de salud pública, puesto que, normalmente, se encuentra muy relacionada con la obesidad y la diabetes y ambas adquieren proporciones epidémicas en muchos países occidentales. Los modelos animales han tenido una gran importancia en el esclarecimiento de los mecanismos fisiopatológicos de NAFLD. Existen muchos modelos de NASH basados en dietas deficientes en metionina y colina. Los modelos basados en una deficiencia nutricional como las dietas MCD y otras, deficientes en aminoácidos se han utilizado durante mucho tiempo y tienen la ventaja de provocar un fenotipo de NASH exacto y puntual en un período de tiempo limitado (Van Herck *et al.*, 2017).

Los modelos en roedores que se han desarrollado para estudiar la carencia de grupos metilo consisten en una dieta deficiente en ácido fólico, colina y L-metionina, o de vitaminas B9 y B12, pero no han sido completamente caracterizados. La carencia de folatos y de vitamina B12 aumenta la permeabilidad intestinal, produce cambios en la

microbiota y estos efectos conducen a una esteatosis microvesicular en las crías de ratas que sufrieron carencia de compuestos metilados durante la gestación y la lactancia. Se sabe que la dieta deficiente en metionina y colina no permite la formación de fosfatidilcolina, que es esencial para la formación normal de la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y su secreción del hígado, alterando la beta oxidación mitocondrial en roedores, observándose una acumulación rápida de triglicéridos en el hígado con desarrollo posterior de esteatohepatitis y fibrogénesis (Ayala *et al.*, 2008; Kucera y Cervinkova, 2014).

La colina es una sal cuaternaria de amonio del catión N, N, N-trimetiletanolamina, es un nutriente esencial soluble en agua, se agrupa con las vitaminas del grupo B, y es esencial, ya que participa en muchas reacciones metabólicas (p. Ej., Metilación o transporte de lípidos). En los seres humanos, la deficiencia de colina puede conducir al desarrollo de esteatosis hepática y se puede encontrar en la desnutrición, el abuso de alcohol o durante el embarazo y la lactancia. La carencia de colina en la dieta lleva al uso de metionina, que puede usarse para sintetizar colina. A diferencia de la dieta deficiente en metionina y colina, una dieta deficiente solo en colina con suficiente suplementación de metionina no produce el bloqueo de la secreción de VLDL, lo que conduce sólo a esteatosis con inflamación en grado menor en el hígado de rata (Kucera y Cervinkova, 2014).

En las ratas una dieta deficiente en metionina y colina también provoca desnutrición generalizada; por lo que los animales pierden peso y el peso del hígado disminuye proporcionalmente. La lesión hepática inducida por una dieta deficiente en metionina y colina se acompaña de transaminasas séricas elevadas y citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Los niveles séricos de triglicéridos y colesterol se reducen debido al bloqueo de VLDL hepáticas. Esta dieta, también aumenta la peroxidación de lípidos y reduce el contenido hepático de glutatión reducido. La falta de metionina puede ser parcialmente responsable de la disminución de la síntesis de glutatión. Un aumento del estrés oxidante y la peroxidación lipídica precede al inicio de la esteatohepatitis en ratas alimentadas con esta dieta, y la peroxidación lipídica corresponde a daño hepatocelular y aumento del TNF- α hepático. Por el contrario, la regeneración del hígado después de una hepatectomía parcial de 2/3 en ratas Wistar

no se ve afectada significativamente por este tipo de alimentación (Kucera y Cervinkova, 2014).

Antecedentes

Toxicología de células germinales

La lesión de células germinales, como un evento morfológico primario es una manifestación común después de la administración de compuestos citotóxicos. Las espermatogonias no están protegidas por la barrera hematotesticular, son las células más vulnerables a los efectos tóxicos.

Las células madre de espermatogonias se dividen poco y son menos sensibles a la citotoxicidad que las espermatogonias que han entrado en el grupo proliferativo y de desarrollo; por lo que los efectos de los compuestos tóxicos en los testículos pueden ser reversibles cuando cesa la exposición. Este efecto reversible se produce gracias a la reconstitución de las espermatogonias a partir de las células madre sobrevivientes en el epitelio seminífero (Vidal y Whitney, 2014).

La espermatogonia apoptótica es una célula con citoplasma hialinizado, hipereosinofílico, condensado y núcleo poco definido, ocasionalmente rodeados por un espacio libre a medida que las células se encogen (Figura 3). Los cambios morfológicos producidos en las espermatogonias por toxinas no se distinguen del desgaste fisiológico espontáneo de las células germinales, como resultado de la maquinaria apoptótica normal que elimina las células defectuosas y evita que las células germinales excedan el soporte de las células de Sertoli. Sin embargo, esta apoptosis fisiológica tiende a ser limitada en número y etapa específica (Vidal y Whitney, 2014).

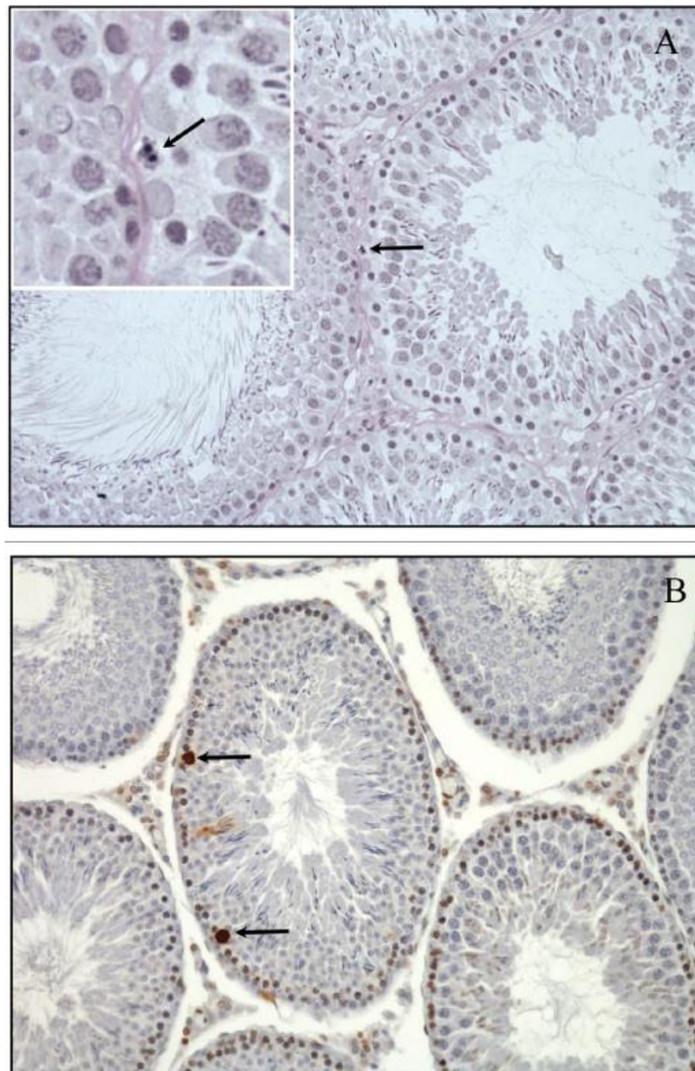


Figura 3. Apoptosis fisiológica espermatogonial en el testículo de rata adulta. (A) Ejemplo de espermatogonias que experimentan apoptosis (flecha) en testículos de rata en condiciones fisiológicas normales. El inserto (aumento de 300x) demuestra las características distintivas de la fragmentación del ADN, la formación de ampollas y los núcleos teñidos de forma oscura. (B) Ejemplo de células positivas para TUNEL que experimentan apoptosis en el testículo de rata adulta normal (flechas). Los testículos se fijaron por inmersión en Bouin, se incluyeron en parafina y se tiñeron secciones de 5 μm (Tomado de Murphy & Richburg 2014).

Aunque las manifestaciones histopatológicas debidas a las alteraciones hormonales y nutrimentales pueden variar notablemente entre especies, los efectos pueden deberse a respuestas centrales o sea del eje hipotálamo-pituitario o periféricas, como en el sistema testículo-célula de Leydig. Esto puede involucrar hormonas o sus receptores, proteínas de transporte, o factores involucrados en los circuitos de retroalimentación.

Si bien las especies comparten factores y mecanismos similares en la regulación endocrina, las peculiaridades de cada especie pueden alterar su respuesta morfológica a una modificación endocrina (Vidal y Whitney, 2014).

Receptores a estrógenos en testículo

Las células de Sertoli, ubicadas en los túbulos seminíferos, secretan proteínas funcionales para la regulación de la proliferación y diferenciación de espermatogonias, también secretan hormonas importantes para la reproducción (Nery *et al.*, 2014; García *et al.*, 2014). Los receptores de estrógenos alfa y beta se encuentran expresados en el testículo de muchas especies. Nie *et al.* (2002) localizaron por inmunohistoquímica ER α y ER β en gato y perro, utilizando anticuerpos específicos de los ER α y ER β . Los encontraron en células intersticiales y células mioides peritubulares en el testículo del perro, pero solo en las células intersticiales del gato. En la *rete testis* del perro, las células epiteliales fueron positivas para la tinción del ER α , pero en el gato, el epitelio de la *rete testis* fue solo débilmente positivo; en los conductos eferentes del perro, tanto las células ciliadas como las no ciliadas se tiñeron intensamente positivas; en el gato, las células epiteliales ciliadas se tiñeron menos que las células epiteliales no ciliadas. Las células epiteliales del epidídimo y del conducto deferente del perro fueron negativas para el ER α . En el gato, a excepción de la región inicial de la capa epididimaria, la tinción del ER α fue positiva en las células epiteliales del epidídimo y el conducto deferente. Múltiples tipos de células de testículos de perros y gatos se tiñeron positivamente para el ER β . En la *rete testis* y conductos eferentes, las células epiteliales fueron débilmente positivas para el ER β .

Attia y Elmansy (2013) detectaron la presencia del ER α solo en células de Leydig de testículo de rata. En los conductos eferentes el ER α se expresó fuertemente en las células epiteliales, mientras que las células estromales fueron moderadamente positivas. En el cuerpo del epidídimo, unas pocas células estrechas de la cabeza y algunas células principales mostraron una reacción positiva moderada, en cambio en la región de la cola muy pocas células apicales y basales mostraron una reacción débil. Las células estromales de la cabeza y el cuerpo del epidídimo mostraron una inmunorreacción fuerte, mientras que en la cola fueron débilmente positivas. En los

conductos deferentes, ER α estuvo ausente en las células epiteliales, pero se detectó en las células estromales; tampoco el epitelio prostático presentó ER α , mientras que las células estromales fueron inmunopositivas. El área de mayor inmunoexpresión y número de células inmunopositivas al ER α se detectó en el epitelio de los conductos eferentes.

El papel que juegan los estrógenos en la función reproductiva de los varones adultos sigue siendo incierto. Saunders *et al.* (2001) utilizaron anticuerpos específicos para el ER α y el ER β para investigar su distribución dentro del macho. En testículos de humanos adultos, macacos y titíes, detectaron el ER β en células de Sertoli, células de Leydig y células mioides peritubulares. En las células germinales, la intensidad de la inmunotinción para el ER β fue variable entre las especies. La inmunoexpresión en espermatocitos de preleptoteno, leptoteno y cigoteno fue baja o ausente en todas las especies. Las espermátidas alargadas fueron consistentemente inmunonegativas. No se detectó inmunoexpresión del ER α en los testículos. Se detectó el ER β en núcleos de células epiteliales y estromales en todo el sistema reproductor masculino (conductos eferentes, epidídimo, conductos deferentes y vesículas seminales) y en la vejiga. El ER α se detectó en células epiteliales no ciliadas en los conductos eferentes, pero rara vez en células epiteliales y basales dentro del epidídimo. Las células epiteliales de las vesículas seminales y la vejiga fueron inmunonegativas para el ER α . La expresión del ER α en células estromales fue rara en los conductos eferentes, epidídimo y vejiga, pero más frecuente en vesículas seminales. La expresión del ER α y las formas larga y corta del ER β se confirmó mediante Western blot. La expresión generalizada del ER β sugiere que es el objetivo principal para la modulación de la función tisular a través de ligandos estrogénicos en el sistema reproductor masculino.

Vitamina B12 y receptores a estrógenos en aparato reproductor masculino

Yamada *et al.* (2007) encontraron que las ratas alimentadas con una dieta deficiente en vitamina B12 que contenía 180 g de proteína de soya por kilogramo de dieta mostraron un daño histológico marcado en sus testículos y que la actividad de la metionina sintasa en testículo de ratas con deficiencia de B12 fue inferior al 2%. El suministro de metilcobalamina no contrarrestó los daños histológicos en el testículo. El

peso de los testículos de las ratas tratadas con una dieta deficiente en vitamina B12 fue menor que en el grupo tratado con metionina. Sin embargo, el peso de los testículos de las ratas tratadas con dieta deficiente en vitamina B12 más metionina fue el mismo que los grupos control y metionina. Se observó una extensiva excreción de ácido metilmalónico en los grupos de ratas tratadas con dieta deficiente en vitamina B12.

Chen *et al.* (2019) analizaron los metabolitos del ciclo de la metionina mediante kits de ELISA, para investigar si la relación Met:Cys podría cambiar el metabolismo del ciclo de la metionina. Los resultados mostraron que comparando con el grupo de proporción alta (3:1), la concentración sérica de S-adenosilmetionina aumentó significativamente en el grupo de proporción baja (1:3), y el grupo de proporción media aumentó, pero no significativamente. Además, la concentración de homocisteína en suero aumentó significativamente en el grupo de proporción baja y no en los otros dos grupos.

Chandra *et al.* (2010) observaron cambios degenerativos en testículo de ratas tratadas con Cr (VI), donde se vio desintegración severa de los espermatozoides, lo que resultó en la detención de la espermatogénesis con necrosis tubular moderada, disminución del diámetro tubular, desprendimiento de células germinales del epitelio tubular, vacuolas intraepiteliales y células de Leydig en degeneración. Además, la histoarquitectura testicular de las ratas tratadas con Cr (VI) suplementado con vitamina E mostró una desintegración moderada en la población de células germinales con detención de la espermatogénesis en comparación con el grupo control.

En ratas tratadas con 3 µg de vitamina B12 por día, se observó una disminución en la expresión del ERβ en todas las capas del epitelio germinal del testículo, con respecto a los grupos control que mostraron una expresión normal. Los mecanismos que afectan a los testículos y a la producción de espermatozoides no han sido investigados exhaustivamente, ni en la deficiencia en donadores de grupos metilo ni el daño que pueda provocar la sitagliptina u otros fármacos (Elsaed *et al.*, 2018).

Justificación

El metabolismo de grupos metilo es una red de vías interconectadas, necesarias para la síntesis de nucleótidos de purina, timidilato y para la remetilación de homocisteína a metionina. Las interrupciones en esta vía influyen tanto en la síntesis de ADN como en la estabilidad y la metilación de la cromatina, y pueden ser el resultado de deficiencias nutricionales y variantes genéticas comunes. Los mecanismos subyacentes a las patologías asociadas con la deficiencia de grupos metilo y las anomalías durante el desarrollo y en la vida adulta aún no se han establecido completamente (Stover, 2011).

Todas las formulaciones de dietas deficientes en grupos metilo lipogénicas, las deficientes en colina, en metionina-colina o metionina-colina-ácido fólico, provocan varias alteraciones moleculares similares, incluyendo metabolismo lipídico alterado, estrés oxidativo, metabolismo desregulado de un carbono y varias anomalías epigenéticas que resultan en lesión hepática progresiva que culmina en el desarrollo de tumores primarios. Las gónadas son especialmente sensibles a mutaciones y modificaciones de su epigenética, a pesar de esto, no se han estudiado los efectos de la dieta baja en metionina y colina en las espermatogonias precursoras de los gametos masculinos (Stover, 2011).

Pregunta de investigación

¿Cómo afecta al testículo la carencia de donadores de grupos metilo?

Específicamente:

¿Cuáles son los efectos morfológicos a nivel de células degenerativas que genera la carencia de donadores de grupos metilo en los testículos de rata Wistar?

Hipótesis

Si alimentamos ratas Wistar con una dieta baja en metionina y colina, no habrá suficiente disponibilidad de grupos metilo para su metabolismo, por lo que podremos analizar los efectos en el testículo, particularmente en las espermatogonias, en las que se desarrollará apoptosis que se podrá identificar por una morfología con un citoplasma hialinizado, hipereosinofílico, condensado y núcleos indefinidos. También, podrían estar disminuidos los receptores de hormonas esteroideas.

Objetivo general

Determinar el daño ocasionado por la carencia de donadores de grupos metilo en testículos de rata Wistar.

Objetivos específicos

1. Evaluar el daño en células degenerativas, de los tipos celulares que componen el testículo.
2. Cuantificar el efecto de la carencia en grupos metilo en los receptores a estrógeno alfa y beta y el receptor a andrógenos en testículo.
3. Cuantificar las células degenerativas en el testículo.

Materiales y métodos

Tratamiento de ratas Wistar

Se trabajó con muestras de testículo de ratas Wistar macho de 8 semanas de edad que fueron tratadas de la siguiente manera:

Grupo 1 Control: Alimento New Purina Rodent Laboratory Chow* 5001 (Lab Dyet; Sant Luis, Missouri. USA) comercial.

Grupo 2 Dieta deficiente en metionina y colina (DMC): Alimento marca Dyets Inc. (Easton Avenue Bethlehem, Pennsylvania, USA).

Las ratas macho de la cepa Wistar fueron solicitadas al Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa; y se mantuvieron bajo las reglas de la NORMA oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, en donde se encuentran las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. A los animales se les mantuvo con comida y agua *ad libitum*, con un ciclo de luz/obscuridad de 12X12 horas. Después de 6 semanas de tratamiento, se sacrificaron mediante eutanasia en una cámara de dióxido de carbono.

Histología

Los testículos se obtuvieron por disección. Se fijaron ambos testículos en formol al 10% durante 10 días. Después del tiempo de fijación los tejidos se sometieron a 3 lavados con PBS durante 10 minutos y posteriormente se conservaron en etanol al 70%, hasta su procesamiento. Los tejidos se deshidrataron por el método convencional de alcoholes-xilol (Anexo 7). Posteriormente los tejidos fueron incluidos en parafina (Tissue-Tek VIP, SAKURA FINETEK U.S.A., INC. TORRANCE, CA 90504 U.S.A.). Se cortaron las muestras con un micrótomo, a un grosor de 5 μ m y se montaron en portaobjetos fijando con gelatina para evitar el desprendimiento de los tejidos. Los cortes se dejaron secar durante toda la noche.

Se realizó la tinción de hematoxilina y eosina, para la cual las muestras se desparafinaron durante toda la noche en una estufa a 67°, posteriormente se rehidrataron (anexo 8). Para la tinción los tejidos se trataron de la siguiente forma:

hematoxilina 2 min (se estandarizó el tiempo con pruebas previas), agua de la llave, agua destilada y alcohol acidulado pasos rápidos, agua amoniacal 2 min, eosina 30 segundos, alcoholes y xilol pasos rápidos. Finalmente se realizó un montado con Entellan® para ser observadas al microscopio óptico.

Por otro lado, se realizó la tinción tricrómica de Masson (MT), para lo cual las muestras se procesaron de la misma manera que para la hematoxilina y eosina, posteriormente se rehidrataron en etanol de la siguiente forma: 2x10 minutos en etanol 100°, 10 minutos en etanol 96°, 10 minutos en etanol 80°, 70° y 50°. Después de 5 minutos en agua destilada, las muestras se incubaron en Hematoxilina férrica de Weigert por 5 minutos. Cuando se apreció el viraje de color se comprobó la tinción al microscopio. Después se realizó un lavado de 3 minutos en agua destilada, y posteriormente 5 minutos en fucsina-escarlata. Después se realizó un lavado de 2 minutos en agua destilada, y se incubaron las muestras en ácido fosfomolibdico al 5% durante 15 minutos. Las muestras se tiñeron con azul de anilina por 10 minutos y se lavaron unos segundos en agua destilada. Continuando con el procedimiento, las muestras pasaron por 3 minutos de diferenciación con ácido acético al 1% y luego por un minuto en agua destilada. Se realizó un deshidratado rápido, unos segundos, en etanol de graduación creciente: 80°, 96° y 100°, y después las muestras se pasaron 2 veces en xileno durante 10 minutos (Megías *et al.*, 2019). Se realizó un montado con Entellan® para ser observadas al microscopio óptico. Esta tinción permite observar fibras de colágena tipo I y fibras reticulares del resto de las estructuras. El colágeno se observará de un color verde azulado, el músculo de color rojo o marrón, el citoplasma se verá rosado, mientras que los núcleos se apreciarán de color negro.

Para complementar la tinción tricrómica de Masson, se realizó la tinción con Rojo Sirius o Red 80. Esta es una técnica que permite identificar de forma más precisa el colágeno en las muestras. Las muestras se fijaron e incluyeron como se describe arriba, posteriormente se rehidrataron en xilol 2 veces por 5 minutos y en etanol de la siguiente forma: 2 veces durante 10 minutos en etanol 100°, 10 minutos en etanol 96°, 10 minutos en etanol 80° y 70°, y 5 minutos en agua destilada. Posteriormente, se sometieron 1 hora en colorante Red 80. Después, las muestras se deshidrataron en etanol de graduación creciente: 70°, 80°, 96° y 100°, se pasaron 2 veces durante 5 minutos en

xilol. Se realizó un montaje con Entellan® para ser observadas al microscopio óptico. Para cuantificar el área de las fibras de colágeno se utilizó el software de análisis de imagen ImageJ 2.1.0/1.53c.

Para las 3 técnicas se digitalizaron las imágenes mediante el escáner Aperio CS2 (Leica biosystems, Illinois) y se realizó el análisis mediante el analizador de imágenes Imagescope versión 12.4.3.5008, 2019 (Leica biosystems, Illinois).

Evaluación histopatológica

La realizó un solo observador, por cada testículo se observaron 5 secciones transversales de túbulos seminíferos en donde se determinó:

- a) El área del túbulo seminífero mediante el analizador de imágenes Imagescope versión 12.4.3.5008, 2019 (Leica biosystems, Illinois).
- b) El número de espermatoцитos
- c) El índice de diferenciación, lo cual es el resultado de dividir el número de espermatoцитos diferenciados entre el número de espermatogonias observadas
- d) El grado de madurez del epitelio seminífero de Jonhsen (anexo 9).

Inmunofluorescencia

Se fijaron las secciones de tejido en formalina y se incrustaron en bloques de parafina de acuerdo con los procedimientos estándar. Se realizaron cortes de secciones de tejido de 5 µm de grosor con un micrótomo y se colocaron en portaobjetos previamente cubiertos con poly-L-lisina (SIGMA, México). Se procedió a desparafinar en xileno con dos cambios durante 5 minutos cada uno. Se rehidrataron las secciones paulatinamente a través de alcoholes graduados: 2x10 minutos en etanol 100°, 10 minutos en etanol 96°, 10 minutos en etanol 80° y 70°, y 5 minutos en agua destilada. Se lavaron en agua desionizada durante 1 minuto con agitación. Se aspiró el exceso de líquido de los portaobjetos. Se realizó el desenmascaramiento de antígenos, para exponer los determinantes antigénicos que se enmascararon mediante la fijación con formalina y la inclusión en parafina. Para ello se colocaron los portaobjetos en un recipiente y se cubrieron con tampón de glicina-HCl 50 mM, pH 3,5, con EDTA al 0,01% (p/v). Se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Se dejaron enfriar los portaobjetos en

el tampón durante aproximadamente 20 minutos. Se lavaron en agua desionizada tres veces durante 2 minutos cada uno. Se aspiró el exceso de líquido de los portaobjetos.

El receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) se detectó en el tejido usando un anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a (cadena ligera kappa) proporcionado a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que se une a la región N-terminal (A/B) del $ER\alpha$ humano. Los anticuerpos monoclonales se obtuvieron de (F-10, Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.). El anticuerpo se suministró a una dilución 1:600, colocando 200 μL en cada portaobjetos. Se dejaron incubar durante toda la noche a 4°C y se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno. Se colocó el cubreobjetos con un medio de montaje acuoso (PBS/glicerol), se sellaron los bordes con barniz transparente y se observaron al microscopio inmediatamente.

El receptor de estrógeno beta ($ER\beta$) se tiñó utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón IgGs (cadena ligera kappa) proporcionado a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, generado contra los aminoácidos 1-150 del $ER\beta$ de origen humano (N-20, Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.). El anticuerpo se suministró a una dilución 1:600, colocando 200 μL en cada portaobjetos. Se dejaron incubar durante toda la noche a 4°C y se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno. Se colocó el cubreobjetos con un medio de montaje acuoso (PBS/glicerol), se sellaron los bordes con barniz transparente y se observaron al microscopio inmediatamente.

El receptor de andrógenos (AR) se tiñó utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 (cadena ligera kappa) proporcionado a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, generado contra los aminoácidos 299-315 de AR de origen humano (441:sc-7305, Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.). El anticuerpo se suministró a una dilución 1:600, colocando 200 μL en cada portaobjetos. Se dejaron incubar durante toda la noche a 4°C y se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno. Se colocó el cubreobjetos con un medio de montaje acuoso (PBS/glicerol), se sellaron los bordes con barniz transparente y se observaron al microscopio inmediatamente. En todos los casos, como control negativo, se reemplazó el anticuerpo con solución salina.

Se analizaron los cortes en un microscopio confocal (Carl Zeiss modelo LSM780, Oberkochen) y se tomaron fotografías con una cámara digital conectada a una computadora. El láser utilizado para el RA fue el láser a 441 nm, para los receptores de estrógenos fue a 546 nm. El programa de análisis de imagen ImageJ 2.1.0/1.53c se utilizó para medir el porcentaje de área de fluorescencia de ER α , ER β y AR en los testículos de las secciones teñidas por inmunofluorescencia. Se analizaron cinco secciones para cada animal (Ayuob *et al.*, 2015). Se midieron cinco lecturas de cada sección y se calculó la media para cada animal según Zhou *et al.*, (2002).

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. Se utilizó la prueba “t” de Student para determinar la diferencia en cada uno de los parámetros estudiados. Se consideró significativa a $p < 0.05$. Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico IBM SPSS V.19.

Resultados

Testículo de rata Wistar

Se analizaron los testículos de 6 ratas; 3 controles y 3 animales alimentados con la dieta. Para cada tinción histológica e inmunofluorescencia, se analizaron al menos 5 cortes de cada testículo, y en cada uno se observaron 5 campos. En caso de no encontrar 5 campos de buena calidad, se analizaron más cortes. El total de cortes se encuentra en la tabla 1.

Tabla 1. Número de cortes analizados para los individuos control y dieta en cada una de las técnicas realizadas.

Muestras de testículo montadas (Individuos)		Número de cortes analizados					
		H & E	MT	Red 80	ER α	ER β	AR
Control	1	6	5	7	5	7	6
	2	6	6	6	6	6	5
	3	5	6	6	6	5	5
MCD	4	6	5	5	6	6	6
	5	7	6	7	7	6	6
	6	6	6	6	5	6	6

Histología

H y E: La tinción de los testículos de las ratas controles mostró una buena organización de los túbulos seminíferos, en su mayoría no se encontraban dañados y el tejido se mostró íntegro (Figura 4 A). La mayoría de las espermatogonias se observaron intactas y bien definidas en la periferia del túbulo, sin desprendimiento y con formas regulares. Los espermatocitos también se observaron íntegros y con núcleos bien teñidos y definidos. Se detectó la presencia de abundantes espermatozoides en la luz del túbulo. En los testículos de las ratas MCD se observaron algunos túbulos seminíferos desorganizados y dañados, también se pudieron observar ligeras deficiencias en la espermatogénesis, con pocas espermatogonias con formas irregulares y

espermatoцитos con núcleos oscuros, además en la luz de algunos túbulos se observaron escasos espermatozoides y un ligero desprendimiento en algunas zonas (Figura 4 D).

Tricrómica de Masson: La tinción de los cortes de testículo de las ratas control mostró un tejido conectivo intersticial íntegro, con el núcleo de las espermatogonias bien definido, sin daño aparente y sin desprendimiento en la periferia de los túbulos. Se observó una cantidad abundante de espermatozoides en la luz del túbulo (Figura 4 B). En el grupo tratado con la dieta MCD se observó tejido conectivo intersticial ligeramente dañado y espermatogonias con material genético muy oscuro y ligero desprendimiento en la periferia de los túbulos, con menos espermatozoides en la luz (Figura 4 E).

Direct Red 80: Los cortes del grupo control mostraron tejido conectivo intersticial bien definido con una cantidad aparentemente normal de fibras de colágeno con túbulos seminíferos bien vascularizados y vasos sanguíneos con una cantidad normal de fibras de colágeno, se observaron células germinales íntegras en el tejido, sin desprendimiento y una cantidad abundante de espermatozoides en la luz del túbulo (Figura 4 C). En los grupos MCD se observó un tejido conectivo intersticial ligeramente irregular, con mayor cantidad de fibras de colágeno. Túbulos seminíferos con una vascularización ligeramente mayor con respecto al control, y en los vasos sanguíneos se notó una cantidad mayor de fibras de colágeno. Algunas células germinales se encontraban desprendidas en el interior del túbulo seminífero (Figura 4 F).

La figura 4 muestra cortes histológicos de los grupos, en donde se pueden observar las características mencionadas anteriormente.

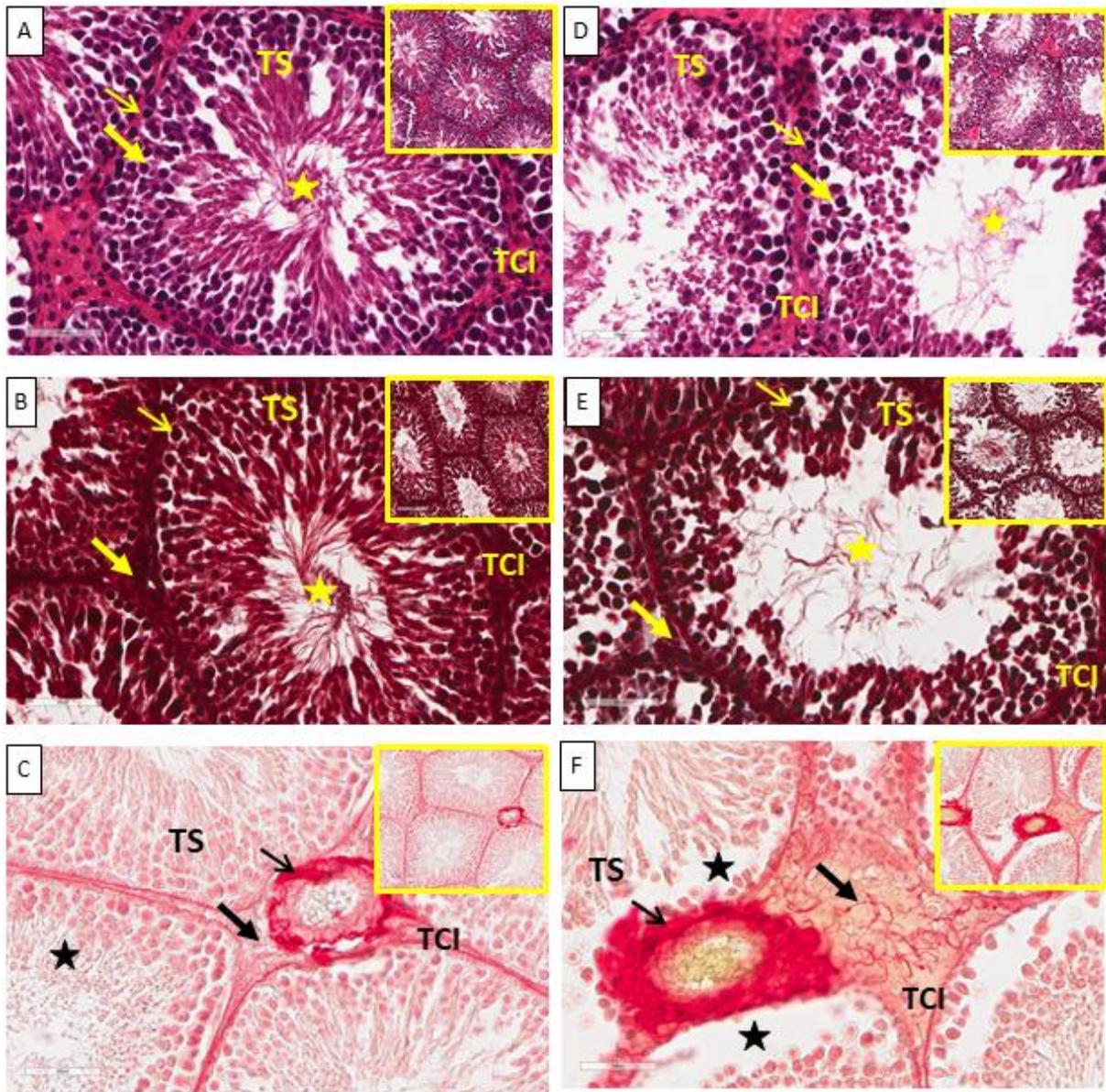


Figura 4. Efecto de la dieta deficiente en colina y metionina (MCD) en el testículo de rata Wistar. Controles A, B y C; A. se observan espermatogonias intactas y bien definidas en la periferia de los túbulos (flecha delgada), espermatocitos íntegros con núcleos teñidos y bien definidos (flecha gruesa), con abundantes espermatozoides en la luz del túbulo (estrella); B. se observa un tejido conectivo intersticial aparentemente íntegro (flecha gruesa), y espermatogonias con el material genético intacto y bien definido en la periferia de los túbulos (flecha delgada), con abundantes espermatozoides en la luz del túbulo (estrella); C. se observa un tejido conectivo intersticial bien definido con una cantidad normal de fibras de colágeno (flecha gruesa), así como túbulos seminíferos bien vascularizados, y vasos sanguíneos con una cantidad normal de fibras de colágeno (flecha delgada), con células germinales íntegras en el tejido y abundantes espermatozoides en la luz del túbulo (estrella). MCD D, E y F; D. escasas espermatogonias y con formas irregulares (flecha delgada), algunos espermatocitos

deformes con núcleos oscuros (flecha gruesa), menor cantidad espermatozoides en la luz del túbulo (estrella); E. tejido conectivo intersticial ligeramente dañado (flecha gruesa), algunas espermatozonias con el material genético obscuro en la periferia de los túbulos (flecha delgada), poca cantidad de espermatozoides en la luz del túbulo (estrella); F. tejido conectivo intersticial irregular y mayor cantidad de fibras de colágeno (flecha gruesa), túbulos seminíferos con una vascularización mayor con respecto al control, y más fibras de colágeno (flecha delgada), con células germinales desprendidas en el interior del túbulo seminífero (estrella); A y D, coloración H&E; B y E, tricrómica de Masson; C y F, Rojo Sirius (40x, insertos 20x barra 50 μ m); TS: túbulos seminíferos; TCI: tejido conectivo intersticial.

La figura 5 muestra el porcentaje de área de expresión de fibras de colágeno para los grupos control (3%) y MCD (10%) donde se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos.

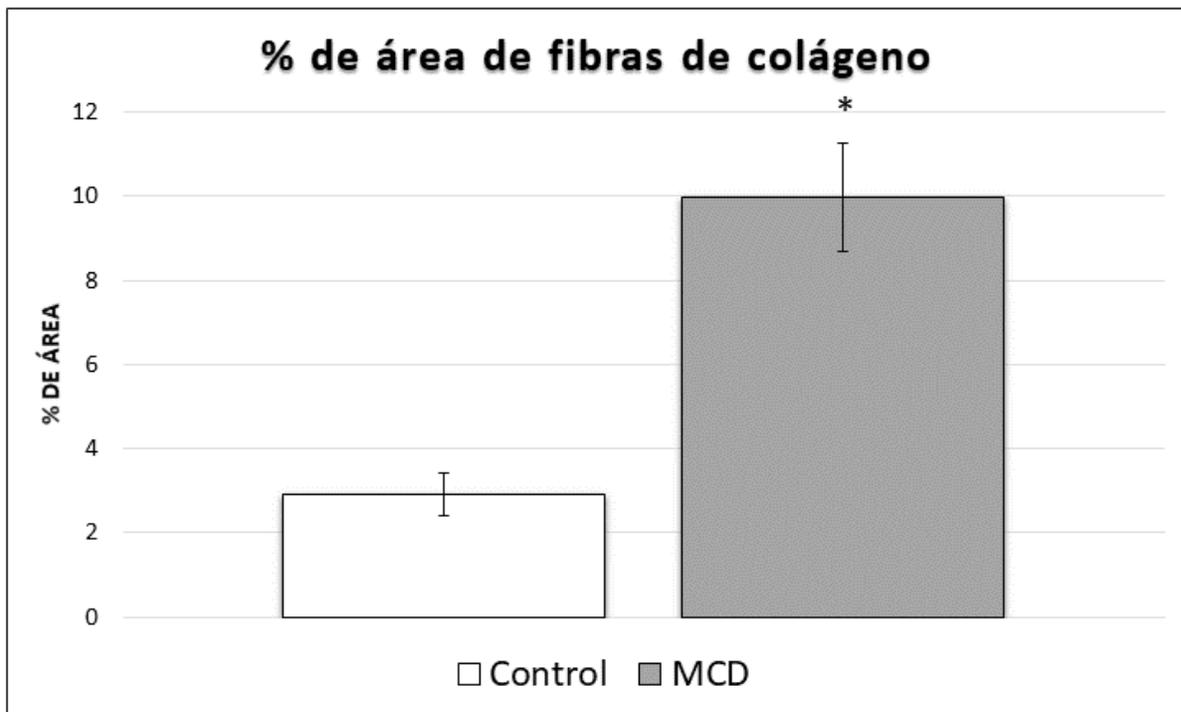


Figura 5. Porcentaje de área de la presencia de fibras de colágeno para los grupos control y MCD expresados como $\bar{X} \pm DE$ (* $p < 0.05$).

Área del túbulo seminífero

En la figura 6 se graficó el promedio del área de los túbulos seminíferos, se observa una ligera tendencia a disminuir en el grupo MCD ($34,952 \mu\text{m}^2$) con respecto al grupo control ($35,596 \mu\text{m}^2$) sin llegar a ser una diferencia significativa.

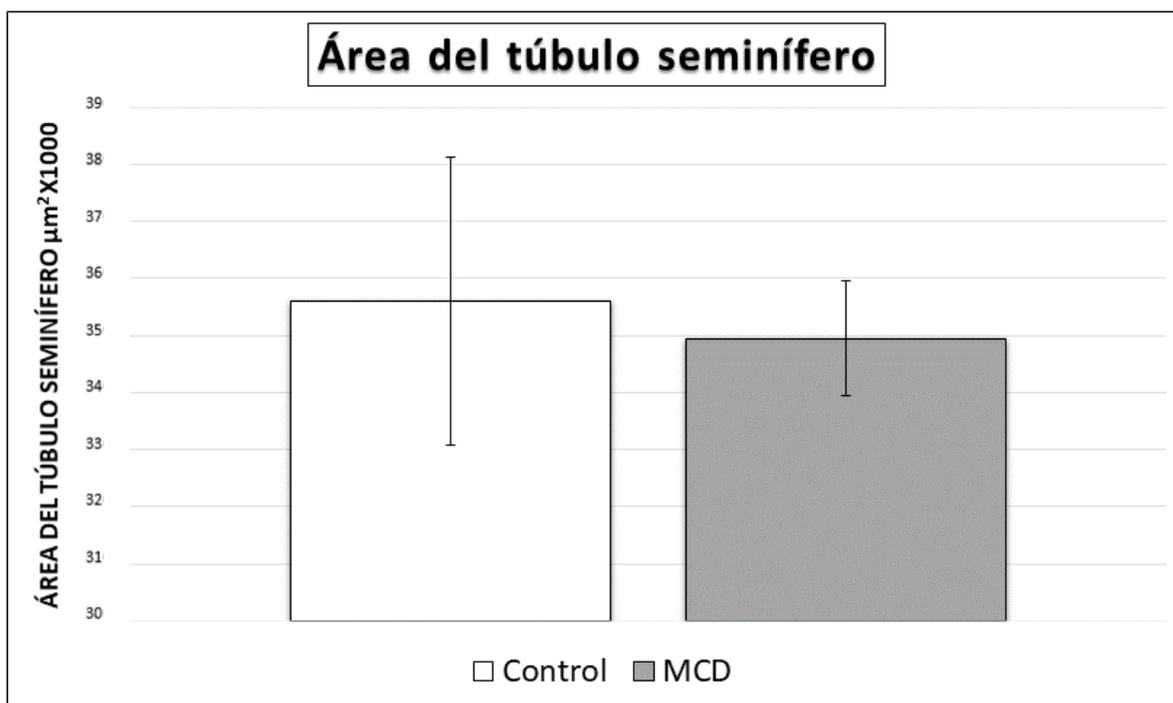


Figura 6. Área del túbulo seminífero para los grupos control y MCD expresados como $\bar{X} \pm \text{DE}$.

Número de espermatoцитos

La figura 7 muestra el número de espermatoцитos presentes en el túbulo seminífero para los grupos control (131) y MCD (127) donde se observa una disminución en el grupo MCD sin llegar a ser una diferencia significativa.

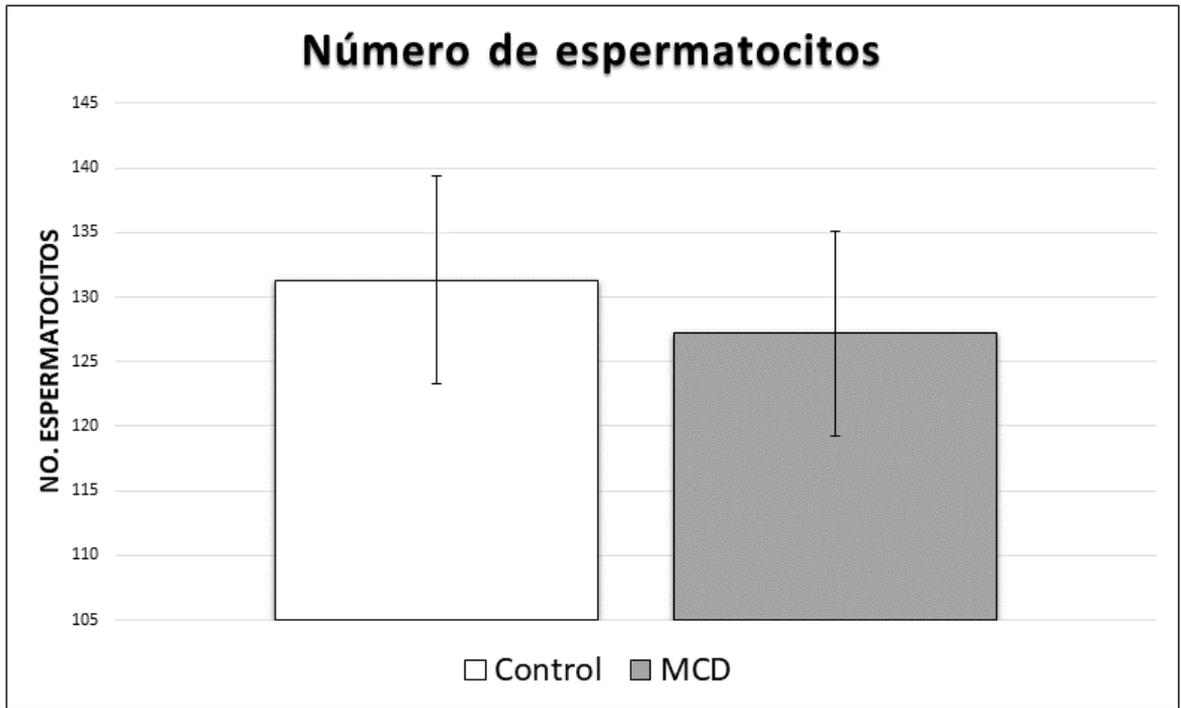


Figura 7. Número de espermatocitos para los grupos control y MCD expresados como $\bar{X} \pm DE$.

Índice de diferenciación del epitelio seminífero

La figura 8 muestra el índice de diferenciación para los grupos control (7.46) y MCD (7.58) donde se observa un ligero aumento en el grupo MCD sin llegar a ser una diferencia significativa.

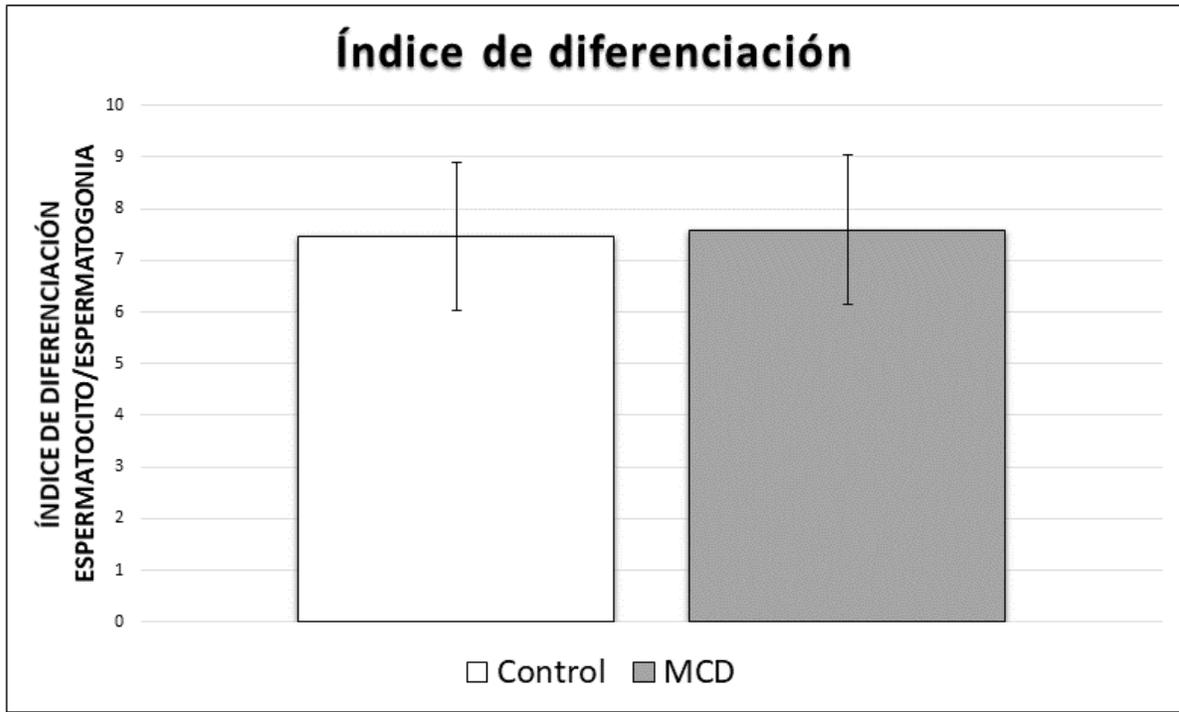


Figura 8. Índice de diferenciación para los grupos control y MCD expresados como $\bar{X} \pm DE$.

Índice de madurez del epitelio seminífero de Jonhsen

La figura 9 muestra el índice de Jonhsen para los grupos control (9.35) y MCD (8.93) donde se observa que no hay diferencia significativa entre los grupos. Para calcular este índice se utilizó la tabla correspondiente al anexo 9. En la figura 4A y D se observan las características a partir de las cuales se determinó el índice.

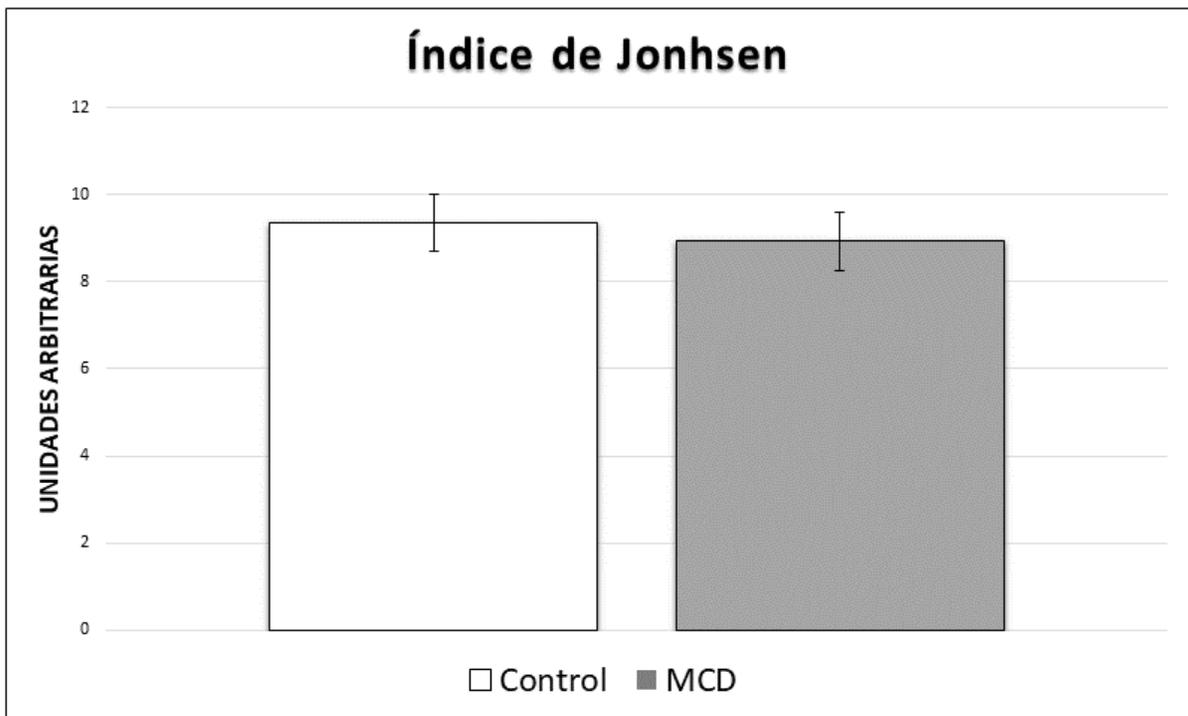


Figura 9. Índice de Jonhsen para los grupos control y MCD expresados como $\bar{X} \pm DE$.

Inmunofluorescencia

Receptor de estrógenos alfa: En cortes de testículo de rata del grupo control se observó una expresión normal del receptor en el tejido conectivo intersticial, en la zona de las células de Leydig (Figura 10 A). En las secciones de testículo de rata MCD se observó una expresión normal del receptor, sin embargo, esta expresión se encontraba ligeramente disminuida con respecto al control, en cuanto al número de zonas en el tejido conectivo intersticial (Figura 10 D).

Receptor de estrógenos beta: Se observó una expresión normal del receptor en el tejido conectivo intersticial de las secciones de testículo de rata del grupo control (Figura 10 B). Así mismo se observó una expresión normal del receptor en las

secciones de testículo de rata MCD, aunque en estos grupos la expresión era un poco mayor con respecto al control. La expresión se observó en las mismas zonas en los dos grupos (Figura 10 E).

Receptor de andrógenos: La expresión del receptor en las secciones de testículo de rata en los grupos control fue moderada en las zonas del tejido conectivo intersticial (Figura 10 C). Por otra parte, en las secciones de testículo de rata MCD se observó una expresión normal del receptor, aunque ligeramente superior con respecto al grupo control en las mismas zonas (Figura 10 F).

La figura 10 muestra la expresión de los receptores de estrógenos alfa, beta y andrógenos en los dos grupos estudiados.

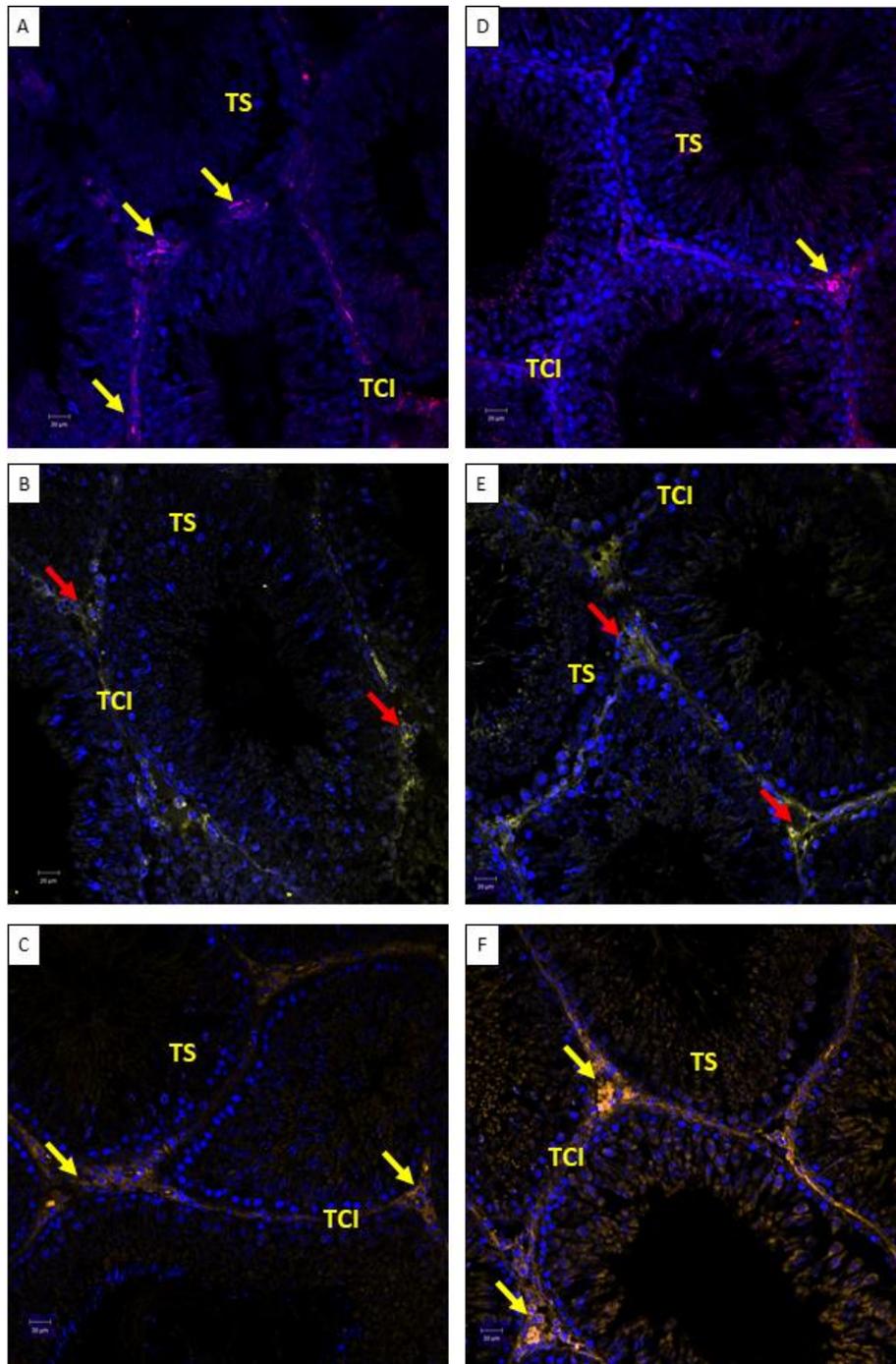


Figura 10. Efectos de la expresión de receptores en testículo de rata Wistar. Controles A, B y C; Dieta C, D y F; A. se observa una expresión normal del ER α en el tejido conectivo intersticial (flechas); D. se observa una expresión normal del ER α , aunque un poco disminuida en el número de zonas con respecto al control en el tejido conectivo intersticial (flechas); B. se observa una expresión normal del ER β en el tejido conectivo intersticial (flechas); E. se observa una expresión normal del ER β , muy ligeramente superior a la del

grupo control en el tejido conectivo intersticial (flechas); C. se observa una expresión moderada del AR en el tejido conectivo intersticial (flechas); F. se observa una expresión normal del AR, aunque ligeramente superior con respecto al grupo control en el tejido conectivo intersticial (flechas); A y D, receptor de estrógenos alfa; B y E, receptor de estrógenos beta , C y F, receptor de andrógenos (inmunofluorescencia microscopia confocal 20x, barra 20 μm ; tinción azul DAPI); TS: túbulos seminíferos; TCI: tejido conectivo intersticial.

La figura 11 muestra el porcentaje de área de expresión del receptor de estrógenos alfa para los grupos control (8.04) y MCD (7.13) donde se observa que no hay diferencia entre los grupos.

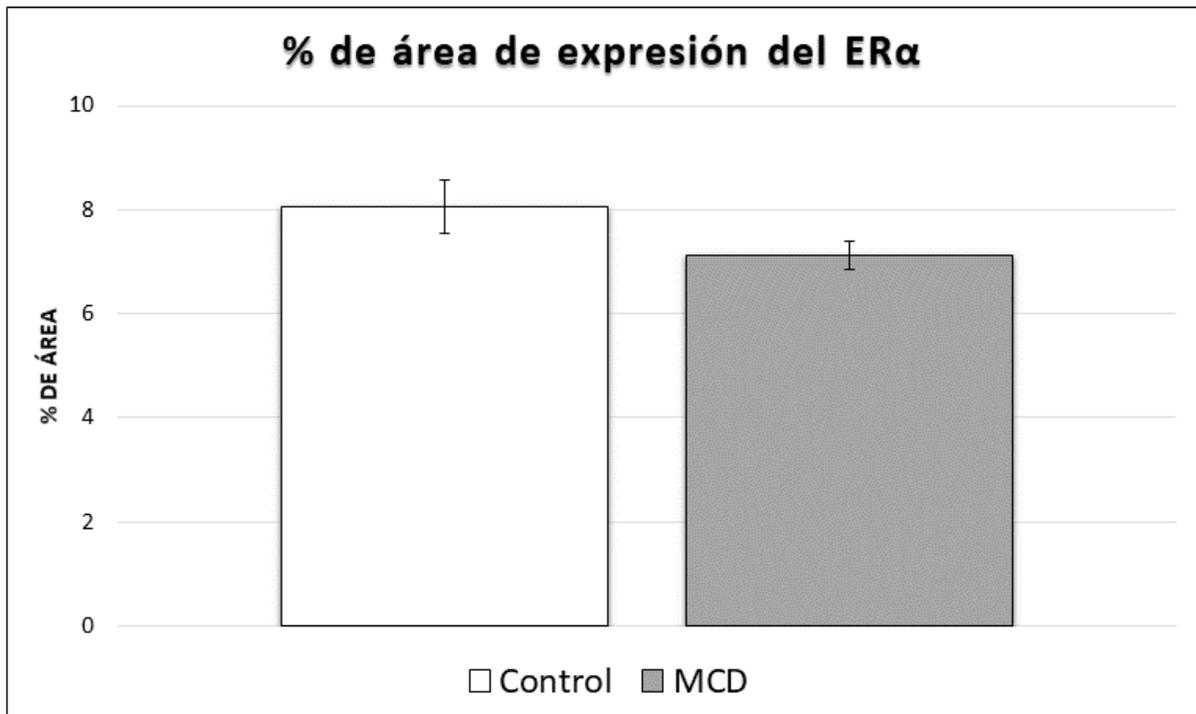


Figura 11. Porcentaje de área de la expresión del receptor de estrógenos alfa para los grupos control y MCD expresados como $\bar{X} \pm DE$

La figura 12 muestra el porcentaje de área de expresión del receptor de estrógenos beta para los grupos control (7.10) y MCD (8.09) donde se observa que no hay diferencia entre los grupos.

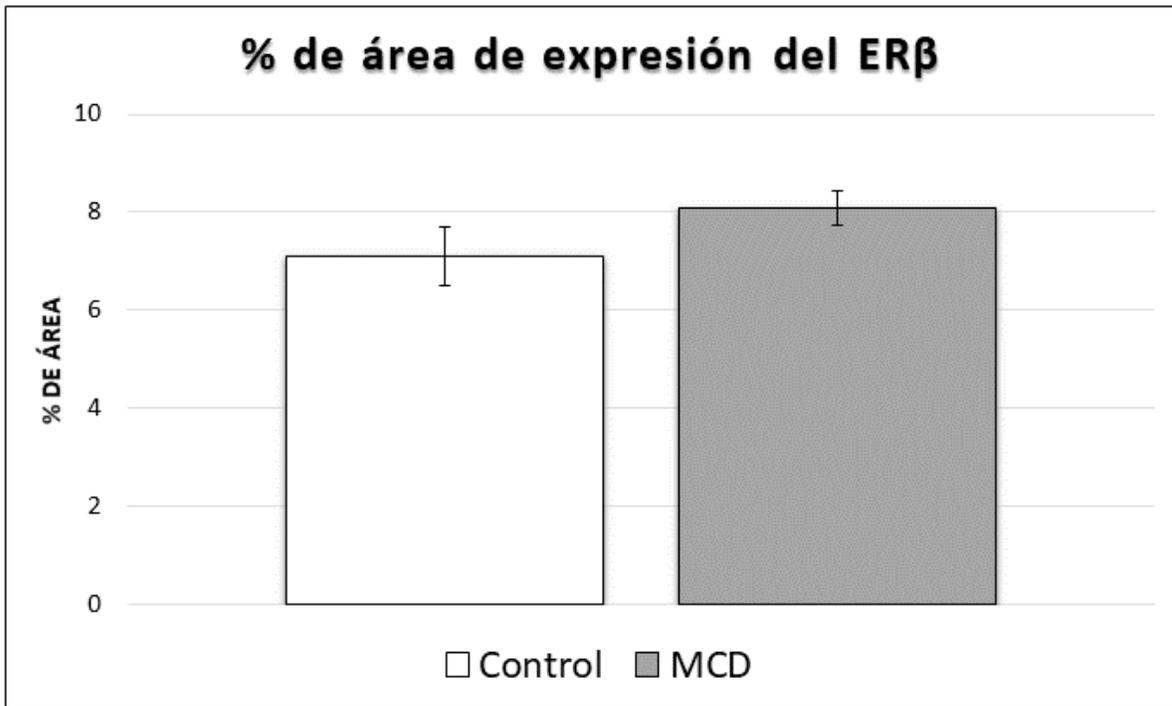


Figura 12. Porcentaje de área de la expresión del receptor de estrógenos beta para los grupos control y MCD expresados como $\bar{X} \pm DE$

La figura 13 muestra el porcentaje de área de expresión del receptor de andrógenos para los grupos control (12.85) y MCD (14.25) donde se observa que no hay diferencia entre los grupos.

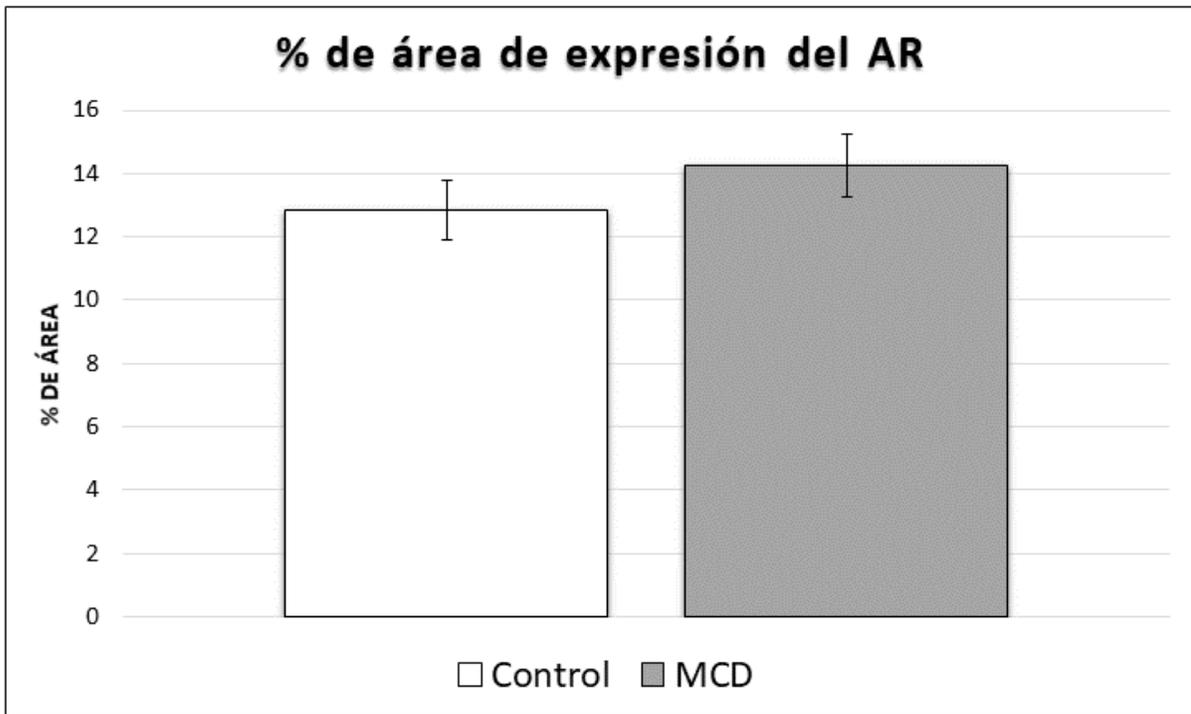


Figura 13. Porcentaje de área de la expresión del receptor de andrógenos para los grupos control y MCD expresados como $\bar{X} \pm DE$

Discusión

La malnutrición incluye la desnutrición, el retraso en el crecimiento, desequilibrio de vitaminas y/o minerales, así como enfermedades relacionadas con la alimentación (no transmisibles). Se sabe que en el mundo existen 52 millones de niños menores de 5 años con síndrome de emaciación, 17 millones con emaciación grave, y 155 millones presentan retraso en el crecimiento. Las repercusiones de la malnutrición en el desarrollo económico, social y médico son graves y duraderas para las personas y sus familias, para las comunidades y para los países a nivel mundial (OMS, 2021). La dieta adoptada en los tiempos modernos también influye, pues al contar con recursos cada vez más limitados, se ven obligados a descartar de su alimentación productos de origen animal, difíciles de sustituir con proteínas vegetales o sintéticas. Entre estas ausencias, la de vitamina B12 genera alteraciones en el metabolismo energético.

El objetivo de este trabajo fue determinar el daño ocasionado por la carencia de donadores de grupos metilo en testículos de rata Wistar, tanto a nivel de células germinales como a nivel de receptores hormonales. Para este estudio se trabajó con muestras de testículo de ratas Wistar macho que fueron divididas en dos grupos: uno con una dieta estándar, y el otro con una dieta deficiente en metionina y colina (MCD). Las ratas de 8 semanas de edad fueron sometidas al tratamiento durante 6 semanas y posteriormente se sacrificaron mediante eutanasia en una cámara de dióxido de carbono.

Histología

Los cambios histológicos observados por Yamada *et al.* (2007) fueron similares a los encontrados en este trabajo, en las tinciones con H&E y MT, aunque no fueron tan evidentes; los túbulos de las ratas MCD mostraron en ambos casos algunas células con formas irregulares, y túbulos seminíferos desorganizados. El hecho de que los daños histológicos no sean tan marcados en este trabajo puede ser atribuido a que la dieta fue administrada solo 6 semanas. No existen muchos estudios con dietas deficientes en metionina y colina, sin embargo, los estudios con dietas deficientes en vitamina B12 son más comunes, al ser la vitamina B12 necesaria para la producción

de metionina y ésta a su vez fundamental para muchos procesos descritos previamente en el presente trabajo como la donación de grupos metilo, los estudios con deficiencias en vitamina B12 nos pueden servir de parámetro para discutir los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Vasiliausha *et al.* (2016) trataron ratas con busulfán y suministraron vitamina B12 para contrarrestar los daños, sin embargo, observaron que la vitamina B12 no revirtió los daños ocasionados, los túbulos seminíferos de las ratas tratadas se redujeron y se encontraron vacuolas intraepiteliales y células germinales desprendidas de la luz del túbulo, con espermatoцитos con características nucleares anormales y escasas espermatogonias. Resultados similares se observaron en este trabajo, aunque con procedimientos distintos, las ratas MCD también mostraron desprendimiento de células germinales y algunos daños histológicos que pueden sugerir que la carencia en donadores de metilo afecta la histología del testículo.

Kawata *et al.* (1997) encontraron que ratas macho alimentadas en pareja durante 100 días con una dieta deficiente en vitamina B12 presentaban atrofia en los túbulos seminíferos y alteración en la espermatogénesis, resultados que apoyan a los obtenidos en este trabajo donde las ratas del grupo MCD también mostraron alteraciones en la espermatogénesis, de igual manera la prolongación de esta dieta puede ser una explicación de que los cambios observados fueran menos evidentes con respecto a estos estudios citados, dado que como se mencionó anteriormente, la dieta a la que se hace referencia duró 100 días y la que se administró en el presente estudio duró solamente 6 semanas. Es de interés continuar este tipo de estudios con dietas más prolongadas y con procesos controlados que permitan seguir ampliando los efectos de estos tratamientos. Otros estudios, como el de Watanabe *et al.* (2007) mostraron que la deficiencia de la vitamina B12 durante la gestación afecta a las células germinales generando un menor recuento y destruyendo a los espermatoцитos de las ratas macho en la primera generación. Resultados que apoyan lo observado en este ensayo en cuanto al daño a los espermatoцитos, pero no así en lo que se refiere a los conteos celulares, apoyando la idea de que se debe seguir trabajando en este tipo de dietas y sus efectos en el testículo.

Banihani (2017) menciona la importancia de la concentración en el suministro de la vitamina B12 para obtener una buena calidad en el semen, como el aumento en el recuento de espermatozoides, mejoras en la movilidad y reducción en el daño del ADN de los mismos, menciona a su vez que estos efectos positivos pueden deberse al aumento en la eficacia de los órganos reproductores masculinos, a la disminución de la toxicidad por homocisteína, a la disminución de la acumulación de especies reactivas de oxígeno y a la disminución del deterioro del semen inducido por inflamación, entre otros. Con base en los resultados obtenidos y que se han ido desglosando en este escrito, la idea de que la concentración de la vitamina B12 es crucial para observar los efectos de ésta en el testículo de rata se refuerza. Si bien es importante mencionar que las concentraciones siempre son fundamentales a la hora de suministrar un fármaco o una dieta.

Amany *et al.* (2019) detectaron la presencia de fibras de colágeno en la membrana basal testicular de ratas tratadas con fenpropatrina, lo cual produjo su engrosamiento y destrucción. Nuestros resultados con la coloración con Red 80 mostraron presencia normal de fibras de colágeno en el tejido conectivo intersticial de los testículos de las ratas control. Por el contrario, en las ratas tratadas con dieta MCD, la acumulación de fibras de colágeno fue mayor en esta misma zona, y alrededor de los vasos sanguíneos, mostrando una diferencia significativa ($p < 0.05$), sugiriendo una posible fibrosis perivascular intersticial. Este tipo de fibrosis se ha encontrado en algunas patologías en el testículo de ratas como lo describen Ayuob *et al.* (2015) que observaron la acumulación de fibras de colágeno en el tejido conectivo intersticial del testículo de ratas diabéticas. Sin embargo, no existen aun trabajos publicados con este tipo de fibrosis en testículos de rata provocadas por una dieta deficiente en donadores de grupos metilo, lo cual hace que sean muy interesantes los resultados obtenidos, y su posible relación con la dieta administrada en esta patología.

Evaluación histopatológica

Una sección transversal de los testículos de mamífero muestra numerosos túbulos seminíferos, lo que facilita considerablemente el trabajo cuando se desea cuantificar

los efectos de las sustancias químicas en los testículos de los animales (Working 1988). Las ratas tratadas con una dieta MCD mostraron una deficiencia mínima en el área de los túbulos seminíferos. Por otra parte, en estudios previos se ha reportado que el área de los túbulos seminíferos en ratas tratadas con vitamina B12 y alteradas con un fármaco se ven beneficiadas, y que los grupos tratados mostraron una histoarquitectura epitelial normal y las áreas tubulares fueron similares a las de los controles (Elsaed *et al.*, 2018).

Elsaed *et al.* (2018) trataron ratas con vitamina B12 para aminorar el daño ocasionado por cimetidina. Las secciones testiculares que obtuvieron no mostraron casi ninguna anomalía al ser observadas en el microscopio óptico, y las medidas morfométricas y los exámenes ultraestructurales de los grupos tratados con vitamina B12 mostraron casi las mismas medidas que los controles. En el presente estudio se trataron ratas con una dieta deficiente en donadores de metilo; las medidas morfométricas de las secciones testiculares obtenidas no mostraron una diferencia significativa con respecto a los controles, sin embargo, se encontraban alteradas, lo cual puede apoyar la teoría de que esta dieta genera cambios morfométricos a nivel testicular.

El número de espermatoцитos se redujo en el grupo MCD sin llegar a alcanzar una diferencia significativa (Figura 7). Sasso-Cerri *et al.* (2017) trataron ratas con vitamina B12 para estimular la proliferación de espermatogonias, y encontraron que las ratas que no fueron sometidas al tratamiento con vitamina B12 mostraban ausencia de espermatogonias en el compartimento basal epitelial, mientras que las ratas tratadas con la vitamina B12 durante 7 días mostraron suficientes espermatogonias. Además de esto, observaron que el número de espermatogonias aumentó significativamente en los animales que continuaron recibiendo el tratamiento durante 7 días más. Estos resultados podrían indicar que la reducción en el número de células germinales ya sean espermatogonias o espermatoцитos puede estar condicionado al tiempo del tratamiento o al suministro directo de una vitamina. En el estudio de Sasso-Cerri *et al.* (2017) se administró directamente la vitamina B12 después de tratar ratas con busulfán, mientras que en el trabajo que aquí se presenta, se sometieron a un grupo de ratas a una dieta que provocaría una deficiencia en la metilación directamente.

El índice de diferenciación se vio ligeramente elevado en el grupo MCD con respecto al control, sin llegar a ser una diferencia significativa (Figura 8). Beltrame y Sasso-Cerri, (2017) trataron ratas con cimetidina y, posteriormente, suplementaron vitamina B12 para contrarrestar los daños ocasionados a nivel testicular, encontrando que los grupos tratados con cimetidina presentaron una reducción de espermatogonias y espermatozoides en los túbulos seminíferos, mientras que los túbulos de las ratas con suplemento de vitamina B12 incrementaron sus espermatogonias y espermatozoides. La falta de una diferencia significativa en el índice de diferenciación en nuestro estudio con una tendencia superior en el grupo MCD (7.58) puede atribuirse entonces a que el tratamiento con la dieta MCD solo fue de 6 semanas, lo cual no fue tiempo suficiente como para provocar una reducción considerable de células germinales. Una dieta mas prolongada por ejemplo del doble de tiempo como las citadas en esta discusión, podría tener mayores efectos en cuanto a alteraciones histológicas.

El índice de madurez de Jonhsen no se afectó significativamente por la dieta MCD aunque disminuyó ligeramente (Figura 9). Yamada *et al.* (2007) encontraron daños histológicos testiculares notorios en ratas tratadas con una dieta deficiente en vitamina B12, como atrofia en los túbulos seminíferos y aplasia de las espermátidas y los espermatozoides. Al igual que para el índice de diferenciación las diferencias entre estos resultados pueden deberse a los tiempos durante los cuales se aplicó la dieta a los animales, pues en el experimento de Yamada *et al.* (2007) la dieta se suministró durante 120 días, mientras que en este estudio la dieta se dio durante 45 días, o bien podría influir también el número de muestra.

Inmunofluorescencia

Attia y Elmansy (2013) detectaron la presencia del ER α en las células de Leydig del tracto reproductivo de ratas tratadas con una dieta estándar; por el contrario, en las células de Sertoli, las espermatogonias y los espermatozoides no se detectó la presencia del receptor. En este trabajo, la presencia del ER α se detectó en el tejido conectivo intersticial en las células de Leydig de las ratas alimentadas con una dieta normal, lo que refuerza lo observado en el estudio previamente señalado. Sin embargo, esta expresión también se observó en las mismas zonas en los tejidos de las ratas MCD,

aunque con menor intensidad de fluorescencia, lo que continúa reforzando la idea de que la prolongación de la dieta puede ser factor determinante para ver sus efectos de manera evidente. Para el receptor de estrógenos beta los resultados fueron similares con una intensidad ligeramente mayor en el grupo control respecto al tratado. Varios estudios como los de Saunders *et al.* (2001) y Nie *et al.* (2002) demostraron la presencia del receptor de estrógenos beta en las células de Leydig de mamíferos. Su presencia fue evidente en los dos grupos, lo cual refuerza lo observado en estudios previos, pero sigue dando lugar al debate sobre la prolongación en la cual se administran las dietas para obtener resultados que permitan observar las modificaciones esperadas.

Ayuob *et al.* (2015) detectaron al receptor de andrógenos en ratas tratadas con una dieta normal, mientras que en ratas diabéticas la expresión del receptor se encontraba disminuida, lo cual podría indicar que en ciertas patologías su expresión disminuye. En el presente estudio, este receptor se observa en las ratas control; de manera interesante, en los grupos de dieta MCD, se expresó con una intensidad mayor. No existen aun estudios suficientes sobre la expresión de este receptor en dietas con deficiencia de donadores de grupos metilo para ratas, por lo cual es difícil comparar estos resultados. A pesar de esto, lo observado en nuestro estudio demuestra un comportamiento distinto entre el ER α con respecto al ER β y andrógenos, mientras que el ER α tuvo una expresión mayor en el grupo control (8.04 contra 7.13), el ER β y andrógenos mostraron una expresión mayor en el grupo MCD (7.10 contra 8.09 y 12.85 contra 14.25 respectivamente).

La disposición de las células germinales en el epitelio seminífero humano parece relativamente caótica cuando se observa un túbulo seminífero en su totalidad. Como resultado, la cuantificación de los efectos tóxicos sobre la espermatogénesis es una tarea mucho más difícil en los seres humanos, y la comparación directa con modelos animales puede no ser siempre posible o justificada. Se han descrito otros métodos más cuantitativos para la determinación de las tasas de producción de espermatozoides a partir de la histología testicular en humanos, incluida la enumeración de espermatoцитos y/o la determinación del número de espermátidas; y también se pueden aplicar para evaluar la toxicidad reproductiva si se pueden obtener

muestras testiculares (Working 1988). Es por esto por lo que extrapolar los resultados obtenidos en este estudio a la especie humana resulta complicado y puede generar inexactitudes a la hora de determinar las consecuencias de una dieta deficiente en donadores de metilo. Sin embargo, es interesante realizar una comparativa tentativa entre ambas especies con la intención de seguir dilucidando los mecanismos que conducen a patologías como infertilidad en humanos.

Conclusión

Una dieta con deficiencia en donadores de metilo produce alteraciones cuantificables en el testículo de rata a nivel histológico y modifica la expresión de receptores hormonales, y el tiempo de administración de ésta influye en la magnitud de las modificaciones observadas.

Perspectivas

Aumentar el número de muestra especialmente en cuanto a la parte de inmunohistoquímica para poder tener resultados más robustos.

Bibliografía

- Amany Abdel-Rahman Mohameda, Suhair A. Abdellatiefb, Safaa I. Khaterc, *et al.*, 2019. Fenpropathrin induces testicular damage, apoptosis, and genomic DNA damage in adult rats: Protective role of camel milk. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 181: 548-558
- Attia G, y Elmansy R. 2013. Localization of estrogen receptor α in adult male albino rat reproductive tract: an immunohistochemical study. *The Egyptian Journal of Histology* 36: 494–504
- Ayala, I, Cámara, P, Fernández-Pardo J. 2008. Modelos animales experimentales de enfermedad de hígado graso y síndrome metabólico. In *Anales de Veterinaria de Murcia*. Vol. 24: 5-16
- Ayuob N, Murad A, Ali S. 2015. Impaired expression of sex hormone receptors in male reproductive organs of diabetic rat in response to oral antidiabetic drugs. *Folia Histochemica Cytobiologica* 53: 35-48
- Banihani Saleem Ali. 2017. Vitamin B12 and semen quality. *Biomolecules* 7: 42-52
- Beltrame F, y Sasso-Cerri. 2017. Vitamin B12-induced spermatogenesis recovery in cimetidine-treated rats: effect on the spermatogonia number and sperm concentration. *Asian Journal of Andrology* 19: 567-572
- Murphy Caitlin J, y Richburg John H 2014. Implications of Sertoli cell induced germ cell apoptosis to testicular pathology. *Spermatogenesis* 4:2
- Chandra Amar K, Chatterjee Aparajita, Ghosh Rituparna, *et al.*, 2010. Vitamin E-supplementation protect chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic disorders in testicular tissues of rats. *Food and Chemical Toxicology* 48: 972–979
- Chen X, Chen T, Sun J, *et al.*, 2019. Lower methionine/cystine ratio in low-protein diet improves animal reproductive performance by modulating methionine cycle. *Food Science and Nutrition* 7:2866–2874
- Elsaed W, Bedeer R, Eladl M. 2018. Ameliorative effect of vitamin B12 on seminiferous epithelium of cimetidine-treated rats: a histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study. *Anatomy & Cell Biology* 51: 52-61
- Fowler B, Leonard J, Baumgartner M. 2008. Causes of and diagnostic approach to

methylmalonic acidurias. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 31: 350-60

Froese D, Fowler B, Baumgartner M. 2019. Vitamin B12 , folate, and the methionine remethylation cycle-biochemistry, pathways, and regulation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 42: 673-85

Garcia M, Guéant-Rodriguez R, Pooya S, *et al.*, 2011. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1. *The Journal of Pathology* 225(3) :324-35

Garcia T, Farmaha J, Kow S, *et al.*, 2014. RBPJ in mouse Sertoli cells is required for proper regulation of the testis stem cell niche. *Development* 141(23):4468–78

Kawata T, Tamiki A, Tashiro A, *et al.*, 1997. Effect of vitamin B12-deficiency on testicular tissue in rats fed by pair -feeding. *International Journal for Vitamin and Nutrition research* 67(1): 17-21

Kucera O. y Cervinkova Z. 2014. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World Journal of Gastroenterology* 20:8364-8376

Megías M, Molist P, Pombal MA. 2019. Atlas de histología vegetal y animal. Técnicas histológicas. Recuperado el 20 de octubre del 2020 de: <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/1-introduccion.php>

Nery S, Vieira M, De la Cruz C, *et al.*, 2014. Seminal plasma concentrations of anti-Mullerian hormone and inhibin B predict motile sperm recovery from cryopreserved semen in asthenozoospermic men: a prospective cohort study. *Andrology* 2(6):918–23

Nie R, Zhou Q, Jassim E, *et al.*, 2002. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in the reproductive tracts of adult male dogs and cats. *Biology of Reproduction* 66: 1161-8

O’Flaherty Cristian, y Matsushita-Fournier David, 2017. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. *Biology of Reproduction* 97(4), 577–585

Organización Mundial de la Salud. Temas de Salud. Nutrición. <https://www.who.int/topics/nutrition/es/>. consultada mayo, 2001.

Pooya S, Blaise S, Moreno M, *et al.*, 2012. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 α hypomethylation and decreased ER- α , ERR- α , and HNF-4 α in the rat liver. *Journal of Hepatology* 57: 344-51

Rival Claudia M., Xu Wenhao, Shankman Laura S. 2019. Phosphatidylserine on viable

sperm and phagocytic machinery in oocytes regulate mammalian fertilization. *Nature Communications* 10:4456 <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12406-z>

Rodríguez M, Téllez N, Cerbón M, *et al.*, 2004. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Revista de Investigación Clínica* 56(1), 56-71. Recuperado el 26 de junio de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762004000100010&lng=es&tlng=es.

Saunders P, Sharpe R, Williams K, *et al.*, 2001. Differential expression of estrogen receptor α and β proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Molecular Human Reproduction* 7: 227–236

Sasso-Cerri E, Oliveira B, de Santi F, *et al.*, 2017. The antineoplastic busulphan impairs peritubular and Leydig cells, and vitamin B12 stimulates spermatogonia proliferation and prevents busulphan induced germ cell death. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 95: 1619-1630

Stover P. 2011. Polymorphisms in 1-Carbon Metabolism, Epigenetics and Folate-Related Pathologies. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics* 4: 293-305

Van Herck Mikhaïl A., Vonghia Luisa, Francque Sven M. 2017. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—A Starter’s Guide. *Nutrients* 9: 1072

Vasiliausha S, Beltrame F, de Santi F, *et al.*, 2016. Seminiferous epithelium damage after short period of busulphan treatment in adult rats and vitamin B12 efficacy in the recovery of spermatogonial germ cells. *International Journal of Experimental Pathology* 97: 317-328

Vidal J, y Whitney K. 2014. Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity. *Spermatogenesis* 4: 2, e979099-1 – 17

Watanabe T, Ebara S, Kimura S, *et al.*, 2007. Maternal vitamin B12 deficiency affects spermatogenesis at the embryonic and immature stages in rats. *Congenital Anomalies* 47: 9-15

Watkins D, y Rosenblatt D. 2017. Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism In: *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* ed. D Valle, S Antonarakis, A Ballabio, A Beaudet, GA Mitchell. USA: *McGraw-Hill Medical*

Weinbauer G, Schlatt S, Walter V, *et al.*, 2001. Testosterone-induced inhibition of spermatogenesis is more closely related to suppression of FSH than to testicular androgen levels in the cynomolgus monkey model (*Macaca fascicularis*). *Journal of Endocrinology* 168: 25-38

Working P. 1988. Male Reproductive Toxicology: Comparison of the Human to Animal Models. *Environmental Health Perspectives* 77: 37-44

Yamada K, Kawata T, Wada M, *et al.*, 2007. Testicular injury to rats fed on soybean protein-based vitamin B12-deficient diet can be reduced by methionine supplementation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)* 53: 95-101

Zhou Q, Nie R, Prins G, *et al.*, 2002. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *Journal of Andrology*. 23:870–881

Anexos

Anexo 1. Hematoxilina de Harris

2.5 g de hematoxilina en cristales

25 mL de alcohol 96°

50 g de sulfato de amonio y aluminio

1.25 g de oxido rojo de mercurio

500 mL de agua destilada

Nota: La hematoxilina es un colorante básico y tiñe núcleos de azul, citoplasmas en rosa, músculo en tonos rojizos a rosados, glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

Anexo 2. Hematoxilina de Weigert

Solución "A"

1 g de hematoxilina

100 mL de alcohol 95°.

Solución "B"

Solución de cloruro férrico al 29% 4 mL,

Agua destilada 95 mL,

Ácido clorhídrico 1 mL.

Solución de trabajo: solución "A" y "B" 1:1.

Se deja madurar por un mes en la oscuridad.

Nota: La hematoxilina es un colorante básico y tiñe núcleos de azul, citoplasmas en rosa, músculo en tonos rojizos a rosados, glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

Anexo 3. Eosina de Carnegie

4 g de eosina amarillenta (CI 45380) eosina azulada (CI 45400), y eosina soluble en alcohol (CI 45386),

100 mL de alcohol 96°

300 mL de agua destilada.

Nota: La eosina es un colorante ácido que se une a elementos del citoplasma y de la matriz extracelular. De los tres tipos de eosina, la eosina amarillenta es la más usada.

Anexo 4. Fucsina-Escarlata

90 mL de Escarlata de Biebrich (C.I. 26905) al 1% en H₂O destilada,

9 mL de fucsina ácida en solución acuosa al 1% en H₂O destilada

1 mL de ácido acético glacial.

Nota: La fucsina escarlata o fucsina ácida-escarlata de Biebrich- es una mezcla basada en la fucsina, colorante de color magenta que se usa normalmente en tinciones tricrómicas como Masson.

Anexo 5. Azul de anilina

2.5 g de azul de anilina

2 mL de ácido acético glacial

100 mL de H₂O destilada.

Nota: El azul de anilina o sus constituyentes se utilizan para teñir el colágeno, ya que las fibras se tiñen en la tricrómica de Masson.

Anexo 6. Ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico

5 g de ac. fosfomolibdico,

5 g de ac. fosfotúngstico

200 mL de agua destilada

Nota: El ácido fosfotúngstico se une a las fibras de colágeno y tejido conectivo y sustituye los aniones de estos materiales de forma selectiva para generar blanqueo.

Anexo 7. Deshidratación de los cortes

Etanol 80° 60 minutos

Etanol 96° 60 minutos X2

Etanol absoluto 60 minutos X2

Etanol absoluto y xilol 1:1 60 minutos

Xilol 60 minutos X2

Parafina 60 minutos X2

Anexo 8. Rehidratación de los cortes

Xilol 5 min X2

Alcohol absoluto 5 min X2

Alcohol 96° 5 min X2

Agua destilada 5 min X2

Anexo 9. Índice de maduración o de Jonhsen

Puntaje	Maduración
10	Espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides (más de 6).
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 (más de 6).
6	Presencia de pocas espermátidas (5 por tubo).
5	Gran cantidad de espermatoцитos presentes (más de 6).
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.



Alteraciones en la histopatología del testículo de rata provocadas por una dieta deficiente en donadores de grupos metilo

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 15:00 horas del día 16 del mes de marzo del año 2022 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DRA. IRMA JIMENEZ MORALES
- DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS
- DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA
- DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ



Bajo la Presidencia de la primera 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:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ALEJANDRO PADRON SANTILLAN

ALEJANDRO PADRON SANTILLAN
ALUMNO

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

REVISÓ

MTRA ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

VOCAL

DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO
CASTELLANOS

VOCAL

DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA

SECRETARIO

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

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