

EFECTO DE LOS ESTEROIDES SOBRE LA DINÁMICA DE LAS CÉLULAS GERMINALES TESTICULARES DE PEZ CEBRA

Nuria Esther GÓMEZ GONZÁLEZ^{1,2}, Rafael Henrique NÓBREGA^{2,3}, Alfonsa GARCÍA AYALA¹, Jan BOGERD², Rüdiger W. SCHULZ²

¹ Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Biología, Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España

² Grupo de Biología de la Reproducción, Biología del Desarrollo, Universidad de Utrecht, NL-3584 CH Utrecht, Holanda

³ Departamento de Morfología, Universidad del Estado de São Paulo, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Email de contacto: nuriaesther.gomez@um.es



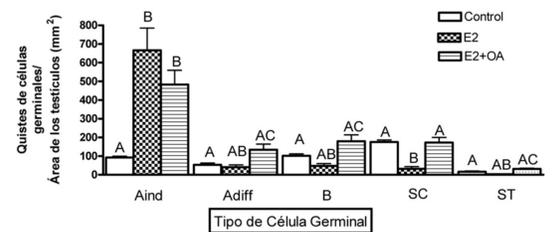
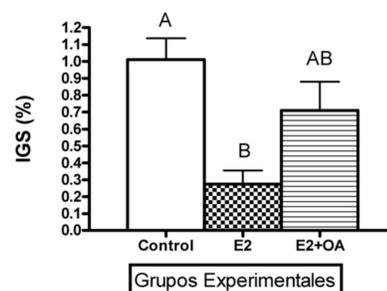
Resumen

Los peces, que representan una importante fuente mundial de alimentación, están sufriendo el incremento de amenazas a causa de la intensificación de la pesca y de los contaminantes medioambientales, algunos de los cuales actúan como disruptores endocrinos (DEs). La mayor parte de estos DEs se comportan como estrógenos, es decir, interfieren con la hormona femenina 17β-estradiol (E₂), actuando, en la mayor parte de los casos, por unión con los receptores de estrógenos (REs), y en menor proporción como andrógenos. En peces, la espermatogénesis está regulada por las hormonas sexuales esteroideas, estrógenos y andrógenos.

El objetivo de nuestro estudio es determinar el efecto de las hormonas esteroideas sexuales en la espermatogénesis en peces para lo que hemos utilizado el pez cebra (*Danio rerio*, Hamilton 1882), considerado como modelo de estudio, para, posteriormente, comprobar los posibles efectos de los contaminantes ambientales de carácter estrogénico o androgénico sobre la capacidad reproductiva. En el presente trabajo hemos utilizado 3 lotes de peces cebra macho sexualmente maduros: 1) ejemplares control, 2) ejemplares expuestos a 10 nM de E₂ en el agua del baño durante 5 semanas y 3) ejemplares expuestos a 10 nM de E₂ en el agua del baño durante 3 semanas y, posteriormente, expuestos a 10 nM de E₂ y 100 nM de ketoandrostenediona (OA) en el agua del baño durante las últimas dos semanas. Los resultados obtenidos indican que el E₂ provoca una disminución del índice gonadosomático (IGS) e inhibe la progresión de la espermatogénesis mientras que los andrógenos aumentan el IGS y el número y porcentaje de los diferentes tipos celulares germinales, con la excepción de las espermatogonias A indiferenciadas, al tiempo que aumentan el nivel de expresión de genes marcadores específicos de espermatocitos, espermátidas, espermatozoides y de células de Leydig.

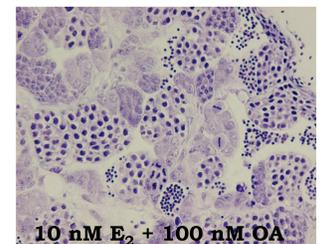
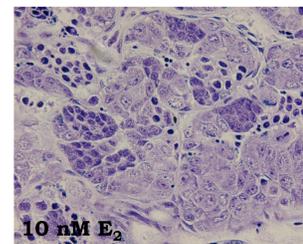
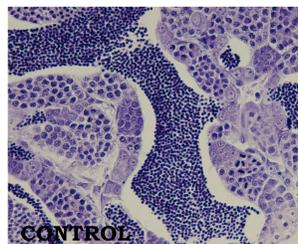


OA tiende a recuperar el IGS (Índice Gonadosomático) y reestablecer la espermatogénesis tras la exposición a E₂.



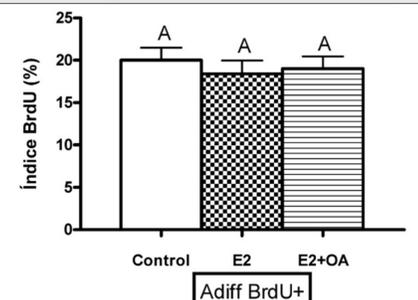
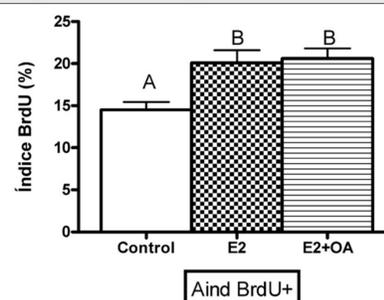
Índice gonadosomático de los ejemplares de pez cebra control y de los tratados con E₂ durante 5 semanas (E₂) y los tratados con E₂ durante 5 semanas y con OA durante las últimas 2 semanas (E₂+OA). Las diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según el test de Tukey (p ≤ 0,05).

Número de quistes de los diferentes tipos de células germinales en el testículo en los ejemplares de pez cebra tras los diferentes tratamientos: ejemplares control, ejemplares tratados con E₂ durante 5 semanas (E₂) y ejemplares tratados con E₂ durante 5 semanas y con OA durante las 2 últimas semanas (E₂+OA). Aind, espermatogonias A indiferenciadas; A diff, espermatogonias A diferenciadas; B, espermatogonias B; SC, espermatocitos; ST, espermátidas. Las diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según el test de Tukey (p ≤ 0,05).



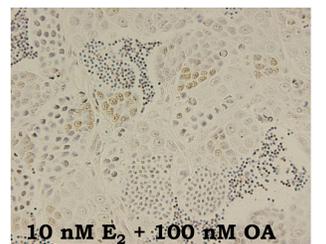
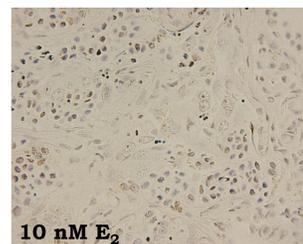
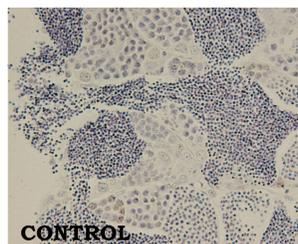
Secciones de testículo de pez cebra teñidas con azul de toluidina. Nótese las diferencias morfológicas entre las secciones de testículo de ejemplares de peces cebra control (A), peces cebra tratados con E₂ (B) y peces cebra tratados con E₂ y OA (C). Aind, espermatogonias A indiferenciadas; A diff, espermatogonias A diferenciadas; B, espermatogonias B; SC, espermatocitos; ST, espermátidas; espermatozoides. Aumento x40.

El 17β-estradiol (E₂) estimula la proliferación de espermatogonia A indiferenciada en pez cebra adulto.



Porcentaje de espermatogonias A indiferenciadas BrdU positivas en las secciones testiculares de ejemplares de peces cebra control, tratados con E₂ durante 3 semanas (E₂) y tratados con E₂ durante 5 semanas y de OA durante las 2 últimas semanas (E₂+OA). Aind BrdU+, espermatogonias A indiferenciadas que han incorporado BrdU en su material genético y que han sido puestas de manifiesto mediante un suero anti-BrdU mediante una técnica inmunocitoquímica.

Porcentaje de espermatogonias A diferenciadas BrdU positivas en las secciones testiculares de ejemplares de peces cebra control, tratados con E₂ durante 3 semanas (E₂) y tratados con E₂ durante 5 semanas y de OA durante las 2 últimas semanas (E₂+OA). Adiff BrdU+, espermatogonias A diferenciadas que han incorporado BrdU en su material genético y que han sido puestas de manifiesto mediante un suero anti-BrdU mediante una técnica inmunocitoquímica.



Secciones testiculares de ejemplares de pez cebra control, de ejemplares tratados con E₂ durante 3 semanas y de ejemplares tratados con E₂ durante 5 semanas y tratados con OA durante las 2 últimas semanas que han sido inmunoteniadas con el suero anti-BrdU. Los ejemplares han sido previamente incubados con BrdU. Nótese como el número de células BrdU positivas es mayor en los ejemplares tratados con esteroides. Aumento x40.

La ketoandrostenediona (OA) estimula la expresión de genes marcadores de espermatocitos, espermátidas, espermatozoides y células de Leydig

Análisis de los niveles de ARNm de *scp3l*, *shippo* y *insl3* en testículo de ejemplares de pez cebra tratados con E₂ durante 5 semanas (E₂) y ejemplares tratados con E₂ durante 5 semanas y con OA durante las 2 últimas semanas (E₂+OA) mediante qRT-PCR. Los datos de expresión representan la media ± SEM de muestras por triplicado. Los niveles de expresión del gen fueron normalizados con los niveles de ARNm de *rps18*. Las diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según el test de Tukey (p ≤ 0,05). El ARNm total se obtuvo realizando un pool con la misma cantidad de ARNm de 6 peces/grupo/tiempo.

