

Tesis Doctoral

Rol de los estrógenos en la fisiología testicular del sapo *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura)

Scaia, María Florencia

2015-03-31

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Scaia, María Florencia. (2015-03-31). Rol de los estrógenos en la fisiología testicular del sapo *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Scaia, María Florencia. "Rol de los estrógenos en la fisiología testicular del sapo *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-31.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Rol de los estrógenos en la fisiología testicular del sapo
Rhinella arenarum (Amphibia, Anura)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencia Biológicas

Lic. María Florencia Scaia

Director de Tesis: Dra. Nora R. Ceballos
Consejero de Estudios: Dra. Nora R. Ceballos

Lugar de trabajo: Laboratorio de Endocrinología Comparada, Departamento
de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEN, UBA, Buenos Aires,
Argentina.

Buenos Aires, marzo 2015

Rol de los estrógenos en la fisiología testicular del sapo *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura).

El órgano de Bidder (BO) es una estructura característica de los bufónidos, entre ellos, *Rhinella arenarum*. Este órgano expresa varias enzimas esteroidogénicas, incluyendo la aromatasa, responsable de la síntesis de estrógenos. En algunos anfibios se propuso que el estradiol (E_2) tiene un efecto negativo directo sobre la función testicular, más allá de la regulación de las gonadotrofinas hipofisarias. En este marco, y utilizando como modelo experimental machos de *R. arenarum*, los objetivos de esta tesis fueron: analizar la capacidad del BO de producir E_2 a partir de sustratos endógenos, medir las variaciones estacionales en la concentración plasmática de E_2 , determinar la presencia del receptor testicular de estrógenos (ER) y analizar el efecto del E_2 , a lo largo del año, sobre las enzimas esteroidogénicas citocromo P450 17α -hidroxilasa-C₁₇₋₂₀ liasa (CypP450c17) y 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ isomerasa (3β -HSD/I), sobre la apoptosis y la proliferación. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de E_2 plasmático son significativamente menores durante el período pre reproductivo (PreR) y que el BO es una de las principales fuentes de E_2 . Además, se determinó la presencia de ER en testículo. El tratamiento con E_2 no modificó ni la actividad ni la expresión del CypP450c17, mientras que se detectó una inhibición significativa de la actividad de 3β -HSD/I durante el período post reproductivo (PostR). Por otra parte, se observó una elevada tasa de proliferación espermatogonial durante el período reproductivo (R) y una marcada apoptosis durante el PostR. El tratamiento con E_2 estimuló la apoptosis solo durante el período R y no se observó efecto en la proliferación de la línea espermatogénica. En conclusión, esta tesis describe las variaciones estacionales en el E_2 plasmático, la apoptosis y la proliferación testicular, y demuestra que el E_2 regula la esteroidogénesis testicular y la espermatogénesis.

PALABRAS CLAVE: sapo, órgano de Bidder, estradiol, testículo, esteroidogénesis, apoptosis, proliferación.

Role of estrogens in the testicular physiology of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura).

Bufoiids, among them *Rhinella arenarum*, are characterized for having a structure called Bidder's organ (BO). This organ expresses steroidogenic enzymes, including aromatase that is responsible for estrogens synthesis. In several amphibians, it has been proposed that besides regulating pituitary gonadotropins, estradiol could have direct negative effects on testicular function. In this context, the purpose of this study was to describe seasonal variations in plasma estradiol (E_2) in males of *R. arenarum*, to determine the capacity of the BO to synthesize E_2 from endogenous substrates, to determine the presence of estrogen receptor (ER) in the testes and to analyze the effect of E_2 on testicular steroidogenic enzymes, like the cytochrome P450 17 α -hidroxilase-C₁₇₋₂₀ liase (CypP450c17) and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase (3 β -HSD/I), and on proliferation and apoptosis of the germ line. Results indicate that plasma E_2 is significantly lower during the pre reproductive (PreR) season than during the reproductive (R) and post reproductive (PostR) seasons, and that the BO is one of the main sources of plasma E_2 . After the presence of ER was determined, testicular fragments were incubated with different concentrations of E_2 . Results indicate that E_2 has no effect either on CypP450c17 activity or on protein level, while it reduces 3 β -HSD/I activity only during the PostR season. Furthermore, high rate of spermatogonial proliferation was found during the breeding and elevated apoptosis in the PostR season, mostly in spermatocytes. Treatments with E_2 stimulate testicular apoptosis during the R season, with no effect on testicular proliferation all year long. Taken together, these results demonstrate that E_2 is involved in the regulation of testicular steroidogenesis and spermatogenesis.

KEYWORDS: toad, Bidder organ, estradiol, testes, steroidogenesis, apoptosis, proliferation.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por tener sus puertas siempre abiertas. A sus profesores, por intentar transmitir la curiosidad ante todo.

A la educación pública y gratuita de mi país. Gracias por permitir el acceso a una formación universitaria de lujo.

Al CONICET, por financiar mis estudios de postgrado. A la Universidad de Buenos Aires, a ANPCyT y al CONICET, por los subsidios que permitieron realizar esta investigación.

A la Dra. Nora Ceballos, gracias por confiar, brindarme la posibilidad de trabajar en su laboratorio y guiarme en la investigación durante todos estos años.

A mis papás, por enseñarme a perseguir los sueños. Gracias por el amor y los abrazos incondicionales. Gracias por el aliento, la esperanza y el empujón en los momentos de duda.

A mi hermano Rober, por querernos tanto, respetarnos y admirarnos por nuestras diferencias. Gracias por el humor ácido y los chistes inesperados; por ayudarme a sentirme en casa, aunque esté lejos de casa.

A todos mis abuelos, a quienes tuve muy presente particularmente en este último tiempo, cada uno con su ejemplo de vida.

A Anajuacio y la barra del bosque.

A mis tíos Élida, Isabel y Eduardo. Gracias por el amor, el apoyo y el interés en todo lo que hago.

A mi prima Mage, por su ejemplo. A Pato, Santi y Paz, por los asados de risas, danzas y juegos.

A Ele, gracias por su amistad y por guiarme en los primeros años de formación. A Clari, por haber compartido innumerables charlas y tantos

años de trabajo. A Ali, Cris y Nadia, porque si bien fue menos tiempo, con ellas me sentí muy a gusto trabajando día a día en la mesada. A todas, gracias por los consejos cuando a veces las cosas no resultaban tan fáciles y por contaminar la rutina con risas.

A Andrea, Lucas y Dante, por ayudarme en las primeras técnicas histológicas. A Evelyn, por ayudarme en la cuantificación de los cortes histológicos.

A Gladys por ayudarme a mejorar las coloraciones cuando mis preparados no me conformaban.

A Luquitas, Mariana, Esteban, Clari y Ali, por las catas con cosas ricas y risas.

A mis amigas Malala, Pía, Mery, Anita y Gaby. Gracias por las charlas y las tardes en el mar. Gracias porque, a pesar de que a veces estamos geográficamente lejos, seguimos compartiendo las distintas etapas de la vida.

A las pintonas: Gaby, Roxy, Silcho, Lau y Euge. Por todas las anécdotas divertidas durante la carrera y después. Gracias por las noches mexicanas y por seguir caminando juntas a lo largo del tiempo.

A las vertebradas Nanu, Guille, Mari y Maru. Gracias por compartir cursadas, cumpleaños, noviazgos, rupturas, embarazos, risas y llantos. Gracias por transitar juntas.

A Maxi, Lucas y Luchi. Gracias por hacerme reír y decir casi siempre exactamente lo opuesto a lo que quiero escuchar.

A Luli y Marti, gracias por los consejos y por este último tiempo 'yolo'.

A Mario y Georgi, mis amigos de la infancia. Gracias por salir del lugar de confort y por cambiar la realidad con solo una carcajada.

A Ricardo, Shang-Chien, Mariano y Marylin. Gracias porque, a pesar de haber compartido tan pocos días, viví momentos inolvidables y de ellos aprendí. Gracias por ayudarme a abrir la cabeza.

A mis amigos de la música. Gracias por llenar cada jueves con corcheas y jazz, y ayudarme a que esa felicidad se extienda hasta el jueves siguiente.

A los grandes maestros, aquellos con los que me crucé durante este recorrido y que ansío seguir encontrando. Gracias por las trabas y por las ayudas, porque a partir de todas ellas aprendí y crecí.

No tengo más que decirles a todos ustedes, solo infinitas gracias...

Índice

I. Introducción	
Los anfibios	1
Los anuros	2
<i>Rhinella arenarum</i>	3
El testículo de los anfibios	4
Los esteroides testiculares	7
Regulación de la reproducción	12
El Órgano de Bidder	16
La apoptosis testicular	22
Apoptosis y proliferación celular como reguladores de la espermatogénesis en anfibios	25
Regulación hormonal de la espermatogénesis	28
Efecto del estradiol sobre la espermatogénesis de anfibios	34
Efecto del estradiol sobre la esteroidogénesis testicular	36
II. Objetivos e hipótesis	38
III. Capítulo 1. El órgano de Bidder y la producción de estradiol	
Materiales y métodos	41-47
Animales	41
Obtención y procesamiento de plasma y tejidos	42
Tratamiento de los órganos de Bidder	42
Cuantificación de hormonas mediante radioinmunoensayo (RIA)	43
Medición de la actividad de la enzima aromatasa	44
Separación y cuantificación de sustrato y producto	45
Análisis estadístico de los resultados	46
Medios de incubación y soluciones buffer utilizadas	47
Resultados	48-58

Variaciones estacionales en las concentraciones de esteroides sexuales	48
Actividad de aromatasa en el órgano de Bidder y síntesis de estradiol	50
Discusión	59
IV. Capítulo 2. Variaciones estacionales en la apoptosis y la proliferación celular en el testículo y el órgano de Bidder. Presencia de receptores de estrógenos.	
Materiales y métodos	66-71
Animales y obtención de tejidos	66
Procesamiento del material para histología e inmunohistoquímica	66
Estudio de apoptosis	67
Proliferación celular	68
Inmunohistoquímica del receptor de estradiol	69
Análisis estadístico de los resultados	70
Medios de incubación y soluciones buffer utilizadas	71
Resultados	72-103
Variaciones estacionales en la proliferación celular y en la apoptosis de la línea germinal	72
Localización celular del receptor de estradiol en el testículo y en el órgano de Bidder	84
Variaciones estacionales en la proliferación celular en el Órgano de Bidder	96
Discusión	104
V. Capítulo 3. Efecto del estradiol sobre la esteroidogénesis testicular y la espermatogénesis.	
Materiales y métodos	113-120
Animales y obtención de plasma tejidos	113

Tratamiento de los fragmentos testiculares con estradiol	113
Medición de la actividad del CypP450c17	113
Medición de la cantidad de proteína del CypP450c17 mediante Western blot	114
Medición de la actividad 3 β HSD/I	116
Procesamiento del material para histología e Inmunohistoquímica	116
Estudio de apoptosis	116
Proliferación celular	117
Análisis estadístico de los resultados	117
Medios de incubación y soluciones buffer utilizadas	119
Resultados	121-149
Efecto del E ₂ sobre las enzimas esteroideogénicas Testiculares	121
Efecto del E ₂ sobre la apoptosis testicular	134
Efecto del E ₂ sobre la proliferación celular en el testículo	142
Discusión	150
VI. Conclusiones	159
VII. Bibliografía	164

Publicaciones

Los resultados presentados en el **Capítulo 1** de esta tesis fueron publicados en el siguiente artículo:

*Scaia MF, Regueira E, Volonteri MC, Ceballos NR. 2013. Estradiol production by the Bidder's organ of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Seasonal variations in plasma estradiol. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol. 319(6):355-64. doi: 10.1002/jez.1799.*

Los resultados presentados en el **Capítulo 2** de esta tesis forman parte de la siguiente publicación en redacción:

*Scaia MF, Czuchlej SC, Cerviño N, Ceballos NR. Seasonal variations in spermatogenesis and cellular proliferation of the Bidder organ in *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Presence of an estradiol receptor similar to β receptor.*

Los resultados presentados en el **Capítulo 3** de esta tesis fueron publicados en el siguiente artículo:

*Scaia MF, Volonteri MC, Czuchlej SC, Ceballos NR. 2015. Effect of estradiol on apoptosis, proliferation and steroidogenic enzymes in the testes of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Gen Comp Endocrinol. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.12.016.*

Especies de anfibios y sinónimos

El conocimiento de la diversidad de los anfibios es cambiante debido a que día a día se realizan nuevas descripciones y revisiones. El parentesco entre las especies se encuentra en revisión constante y de allí surge que los nombres que se le otorgan a cada una sean muy variables. Dado que en esta tesis se utiliza la nomenclatura más actualizada, planteada por Frost (2011, Amphibian Species of the World 5.5, an Online Reference, AMNH), a continuación se mencionan los sinónimos más conocidos de las especies mencionadas:

Agalychnis dacnicolor = *Pachymedusa dacnicolor* = *Phyllomedusa dacnicolor*

Anaxyrus fowleri = *Bufo fowleri*

Anaxyrus woodhousii = *Bufo woodhousii*

Duttaphrynus melanostictus = *Bufo melanostictus*

Hypselotriton orientalis = *Cynops orientalis*

Lithobates catesbeianus = *Rana catesbeiana*

Lithobates pipiens = *Rana pipiens*

Litoria maini = *Cyclorana maini*

Litoria platycephala = *Cyclorana platycephala*

Pelophylax esculentus = *Rana esculenta*

Pelophylax nigromaculatus = *Rana nigromaculata*

Pelophylax perezii = *Rana perezii*

Rhinella arenarum = *Bufo arenarum*

Rhinella ictérica = *Bufo ictericus*

Rhinella marina = *Bufo marinus*

I. Introducción

I. Introducción

Los anfibios

Los anfibios fueron los primeros vertebrados en pasar del medioambiente acuático al terrestre y se ha sugerido que evolucionaron a partir de un grupo primitivo de peces con aletas lobuladas hace aproximadamente 350 millones de años. El término "anfibio" proviene del griego "amphi" (ambos) y "bio" (vida) y hace referencia a que estos individuos habitan los ambientes terrestres y acuáticos, en mayor o menor medida, según el estadio de desarrollo y la especie a la cual pertenezcan. En general, cuando existen estadios larvales, éstos son estrictamente acuáticos. En estos casos, luego de la metamorfosis, los juveniles y adultos de algunas especies siguen siendo de hábitat acuático mientras que otros habitan el ambiente terrestre la mayor parte de su vida y dependen del regreso al agua o a zonas de alta humedad para reproducirse. A pesar de que éste es el ciclo de vida más frecuente, se han descrito especies con desarrollo directo como por ejemplo *Eleutherodactylus coqui*, entre otras (Kulkarni y col., 2010) y también existen otras que son acuáticas a lo largo de todo su ciclo de vida, como *Xenopus laevis*.

Los anfibios son animales ectotérmicos, tienen una piel con numerosas glándulas exocrinas y ciertas modificaciones que han resultado favorables en el pasaje al ambiente terrestre. Entre ellas, se pueden destacar un sistema respiratorio con pulmones y narinas pares y una estructura esquelética resistente que permite soportar el peso del cuerpo en tierra gracias a las extremidades y cinturas con elementos óseos característicos de los tetrápodos. Además, poseen numerosas modificaciones a nivel sensorial, como por ejemplo oídos con membrana timpánica y estribo, ojos en los cuales la principal superficie de refracción pasa a ser la córnea y la línea lateral presente, en algunas especies, sólo en algunas etapas del desarrollo (Hickman, 1998).

Los anfibios actuales pertenecen al grupo Lissamphibia, que está compuesto por tres clados. El orden Gymnophiona agrupa especies vulgarmente conocidas como cecilias. Son anfibios vermiformes, sin miembros

y con cola rudimentaria o ausente. Por otro lado, el orden Caudata hace referencia a los anfibios lacertiformes con cola, entre los que se encuentran las salamandras y los tritones. El orden Anura agrupa a las ranas, escuerzos y sapos, que tienen un cuerpo acortado, sin cola y con miembros posteriores más largos que los anteriores (Montero y Autino, 2004).

El número de especies de anfibios descriptas asciende a aproximadamente 7125 (Frost, 2011) y cerca del 32% se encuentra en peligro de desaparición (IUCN, 2014 <http://www.iucnredlist.org/>). Al analizar mundialmente el número de especies en peligro crítico y de especies vulnerables, el mayor número de ellas se encuentra en la región geográfica neotropical (Holt y col., 2013). Entre los factores que contribuyen al declive mundial de los anfibios se pueden mencionar el cambio climático (Carey y Alexander, 2003), la fragmentación, modificación y destrucción de hábitats (Davidson y col., 2001; Dodd y Smith 2003), la introducción de especies exóticas, ciertas enfermedades específicas de gran impacto como la quitridiomycosis (Berger y col., 2004) y los contaminantes químicos introducidos por la actividad humana (Relyea y Mills, 2001; Blaustein y col., 2003,). Los mecanismos subyacentes a este fenómeno mundial son complejos y muchos factores pueden actuar de manera sinérgica. Los anfibios son extremadamente sensibles a los cambios ambientales y estas variaciones pueden afectar su éxito reproductivo e incrementar la sensibilidad a los agentes químicos contaminantes.

Los anuros

Los anuros constituyen el grupo más numeroso de los anfibios (87% de las especies conocidas hasta el momento) y el más extendido geográficamente (Vitt y Caldwell, 2009). Vulgarmente se los conoce como ranas, sapos y escuerzos y si bien estos términos no están definidos según una clasificación taxonómica hacen referencia a tres grandes grupos eco-morfológicos. En la mayoría de los casos su ciclo de vida es típicamente anfibio: los estadios larvales son estrictamente acuáticos mientras que la fase post metamórfica suele ser terrestre pero altamente dependiente de la presencia de cuerpos de

agua para reproducirse. Sin embargo, como ya se mencionó, existen algunas especies de anfibios anuros, entre ellas *X. laevis*, que son acuáticas a lo largo de todo el ciclo de vida.

Los miembros de este grupo son en su mayoría ovíparos con fecundación externa. En la primavera, los machos cantan para llamar a las hembras quienes entran al agua y son tomadas por los machos en un proceso denominado "amplexo". Durante este proceso ocurren cambios hormonales que llevan a que a medida que la hembra libera los oocitos el macho descarga de manera coordinada el fluido seminal, produciéndose la fecundación (Ishii e Itoh, 1992).

Rhinella arenarum

La familia Bufonidae está compuesta por 34 géneros de amplia distribución en el mundo. Los miembros de esta familia tienen ciertos rasgos característicos tales como 1) presencia de órgano de Bidder; 2) dientes ausentes; 3) músculo constrictor posterior ausente; 4) cuerpos grasos inguinales; 5) cráneo altamente osificado. Esta familia incluye a los "sapos" que poseen miembros anteriores cortos, utilizados para caminar o saltar, piel seca y cubierta de verrugas y glándulas parótidas localizadas detrás de los ojos (Montero y Autino, 2004).

Rhinella arenarum (ex *Bufo arenarum*, Frost 2011) es una especie de bufónido sudamericano que posee una extensa distribución geográfica que abarca la región comprendida entre el Departamento de Cochabamba en Bolivia y la Provincia de Chubut en Argentina y desde el estado brasileño de Río Grande do Sul hasta la Cordillera de los Andes (Gallardo, 1965). Esta amplia región se caracteriza por tener ambientes muy heterogéneos. Abarca zonas húmedas y de clima tropical, con lluvias de hasta 1000 mm anuales, y zonas secas y de clima frío, con menos de 500 mm anuales. Con respecto a la altitud, la distribución geográfica de esta especie abarca algunas zonas a nivel del mar y otras a 2500 m de altitud (Bolivia).

A pesar de su amplia distribución geográfica, esta especie no posee una clara diferenciación en subespecies. Esto puede deberse a que es una especie adaptada a distintas condiciones ambientales y que, además, su tamaño y su agilidad le permiten trasladarse con facilidad, contribuyendo así a su amplia distribución. De todos modos, dentro de una misma población se encuentran variaciones en diversos caracteres morfológicos tales como el ancho y largo de las glándulas parótidas. Además, se han descrito variaciones geográficas con respecto a otros caracteres tales como las granulaciones dorsales, las crestas cantales, los tubérculos sub-articulares, la longitud total del animal y el diámetro timpánico (Gallardo 1965).

Con respecto a sus características reproductivas, al analizar las poblaciones de *R. arenarum* distribuidas en el Gran Buenos Aires y La Plata, se describió que la época reproductiva abarca los meses correspondientes a la primavera (entre mediados de septiembre y principios de diciembre), cuando ocurren las mayores precipitaciones (Gallardo, 1974). Los machos de *R. arenarum* llegan a la madurez sexual en el cuarto año de vida, la cuarta onda espermatogénica comienza en la primavera del tercer año y finaliza en la primavera del cuarto año, momento en el cual los machos adultos se reproducen por primera vez (Echeverría, 1987).

El testículo de los anfibios

El testículo de los anfibios, al igual que el de los demás grupos de vertebrados, está organizado en dos compartimentos: el intersticial está compuesto por las células de Leydig, productoras de hormonas esteroideas sexuales, por tejido conectivo y vasos sanguíneos (Pudney, 1998), mientras que el germinal está formado por lóbulos seminíferos, donde ocurre la espermatogénesis (Wake, 1969; Duellman y Trueb, 1994). En los vertebrados anamniotas, la unidad funcional de la espermatogénesis es el espermatocisto o cisto, que se forma cuando una espermatogonia es rodeada por las proyecciones citoplasmáticas de las células de Sertoli (Wake, 1969; Lofts, 1974; Duellman y Trueb 1994; Pudney, 1995). Dentro de cada cisto las espermatogonias I proliferan por mitosis y se diferencian a

espermatogonias II, que luego comienzan la meiosis y dan origen a los espermatocitos, espermatidas y espermatozoides maduros, los que permanecen asociados a las células de Sertoli hasta su liberación. La organización cística lleva a que las células germinales dentro de cada cisto se encuentren en el mismo estadio de la espermatogénesis. Durante el período reproductivo se produce la espermiación, que se definió inicialmente, y de manera general, como el proceso por el cual los espermatozoides son liberados desde el testículo hacia el exterior (van Oordt y Klomp, 1946). Este proceso ha sido ampliamente estudiado en diversas especies de anfibios, entre ellas, *R. arenarum* (Pozzi y Ceballos, 2000; Pozzi y col., 2006, Volonteri y Ceballos, 2010).

En los anfibios, los ciclos reproductivos pueden ser continuos o discontinuos (van Oordt, 1960). En los ciclos reproductivos continuos la espermatogénesis está activa durante todo el año y si bien ciertos estadios espermatogénicos predominan en distintas épocas del año, hay producción de espermatogonias y espermatocitos constantemente. Por otro lado, en los ciclos discontinuos las espermatogonias pierden su capacidad mitótica cuando comienzan a diferenciarse los espermatocitos, por lo cual solamente hay espermatozoides en un período del año en particular. Por lo general, los ciclos continuos están presentes en especies tropicales y subtropicales mientras que las especies de zonas templadas poseen ciclos discontinuos o potencialmente continuos (Rastogi y col., 1976; Lofts, 1987).

R. arenarum es una especie con ciclo espermatogénico anual continuo dado que los testículos nunca tendrían un verdadero estado de reposo (Ceï, 1980). La progresión de la espermatogénesis fue descrita detalladamente por Burgos y Mancini (1948), quienes describieron que la onda espermatogénica comienza en octubre, durante el período reproductivo, cuando el número de espermatogonias es máximo y hay pocos espermatocitos y espermatidas. En noviembre y diciembre el número de espermatogonias disminuye y aumentan los espermatocitos I (intensamente picnóticos) y las espermatidas. En enero la cantidad de espermatogonias se mantiene, los espermatocitos disminuyen y

las espermatidas y matas de espermatozoides aumentan. En febrero y marzo se incrementan los espermatoцитos, las espermatidas y las matas de espermatozoides. A partir de abril predomina la estructura de matas de espermatozoides mientras que las espermatidas disminuyen y las espermatogonias aumentan ligeramente. En mayo, junio y julio las matas de espermatozoides siguen en aumento mientras que las espermatidas y las espermatogonias II disminuyen. En agosto se mantiene el predominio de las matas de espermatozoides, que alcanzan su máximo en septiembre. Las espermatogonias I y II aumentan durante agosto y septiembre, mientras que las espermatidas y los espermatoцитos alcanzan su mínimo. De este modo, en septiembre se cierra el ciclo anual espermatogénico en esta especie, cuando los testículos poseen el mayor número de matas de espermatozoides y espermatogonias. Un patrón semejante en cuanto a la cantidad de espermatozoides disponibles para ser espermiados, aunque desfasado temporalmente, fue descrito por Pozzi y Ceballos (2000). En dicho trabajo el máximo de espermatozoides disponibles, es decir formando matas de espermatozoides, se detectó en el mes de octubre.

Considerando el ciclo espermatogénico en su conjunto, surgen al menos dos escenarios posibles:

a. Los espermatoцитos que no alcanzan a diferenciarse en espermatozoides podrían mantenerse latentes, esperando a la próxima onda espermatogénica para continuar la espermatogénesis y constituir las nuevas matas de espermatozoides del año siguiente.

b. Los espermatoцитos I y II podrían ser eliminados de los lóbulos seminíferos mediante algún mecanismo de muerte celular, mientras que las espermatogonias continuarían con una nueva onda espermatogénica.

Estas dos opciones constituyen dos mecanismos posibles en la espermatogénesis de *R. arenaurm* y no habían sido estudiadas hasta el momento.

Finalmente, con respecto a las variaciones en el compartimento intersticial, en el verano el intersticio está poco desarrollado y con células semejantes a fibroblastos. A partir de junio aumenta su volumen por hipertrofia e hiperplasia de sus células. A partir de este mes también comienza a aumentar el número de conductos excretores de espermatozoides, los cuales comienzan a dilatarse y aumentan su luz. Además, los conductos excretores tienen un epitelio cúbico simple, que en agosto y septiembre aumenta de altura hasta llegar a ser cilíndricos (Burgos y Mancini, 1948).

Los esteroides testiculares

Como se mencionó anteriormente, el compartimento intersticial posee células de Leydig que son las encargadas de producir los esteroides sexuales. En los anuros, existen variaciones estacionales en la síntesis de esteroides testiculares y también en las concentraciones plasmáticas de diversos esteroides sexuales. El patrón reproductivo en anuros se denomina asociado a andrógenos cuando la época reproductiva se caracteriza por altas concentraciones plasmáticas de dichos esteroides. Tal es el caso de *Pelophylax perezi*, *Lithobates catesbeianus*, *Agalychnis dacnicolor* y *X. laevis* (Wetzel y Kelley, 1983; Mendonça y col., 1985; Rastogi y col., 1986; Delgado y col., 1989). Por otro lado, en los casos en los que las concentraciones plasmáticas de andrógenos son bajas durante la época reproductiva, se habla de un patrón reproductivo disociado de andrógenos, como por ejemplo en *Pelophylax esculentus* y *R. arenarum*, especies en las que los andrógenos aumentan durante el otoño e invierno y disminuyen durante la primavera (Fasano y col., 1989, 1993; Canosa y col., 2003).

En todos los vertebrados estudiados, el primer paso de la esteroidogénesis es la conversión de colesterol en pregnenolona, esteroide de 21 átomos de carbono, mediante la enzima citocromo P450 colesterol desmolasa (CypP450scc), de localización mitocondrial (Simpson y col., 1979; Hall, 1994). A su vez, la transformación de los esteroides de 21 átomos de carbono en andrógenos puede llevarse a cabo por dos vías distintas: la vía $\Delta 4$ (3-oxo-4-ene esteroides) y la vía $\Delta 5$ (3 β -hidroxi-5-ene esteroides) (Hall,

1994). En nuestro laboratorio se demostró que la biosíntesis de andrógenos en *R. arenarum* se lleva a cabo casi exclusivamente por una vía $\Delta 5$ de isomerización tardía (Canosa y col., 1998, Canosa y Ceballos, 2001).

En *R. arenarum*, como en otros anfibios, la esteroidogénesis exhibe importantes variaciones a lo largo del año y este cambio se manifiesta en que los andrógenos son el principal producto testicular solo fuera de la época reproductiva. En ese momento ocurre un cambio en la biosíntesis de esteroides que pasa de la producción de andrógenos a la de esteroides de 21 átomos de carbono (progesterona, 5 α -pregnan-3 α ,20 α -diol, 3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona y 5 α -pregnan-3,20-diona) (Canosa y Ceballos, 2002a). Este cambio en la biosíntesis testicular se debe, al menos en parte, a la disminución de la actividad de la enzima citocromo P450 17-hidroxilasa, 17-20 liasa (CypP450c17) durante el período reproductivo (Fernández Solari y col., 2002). Esta enzima cataliza la conversión de pregnenolona en 17-hidroxipregnenolona y dehidroepiandrosterona y de progesterona en 17-hidroxiprogesterona y androstenediona. De este modo, la enzima CypP450c17 posee dos actividades, la de 17-hidroxilasa y la de 17,20-liasa, ambas catalizadas por el mismo sitio activo (Bhasker y col., 1989; Perrin y col., 1991).

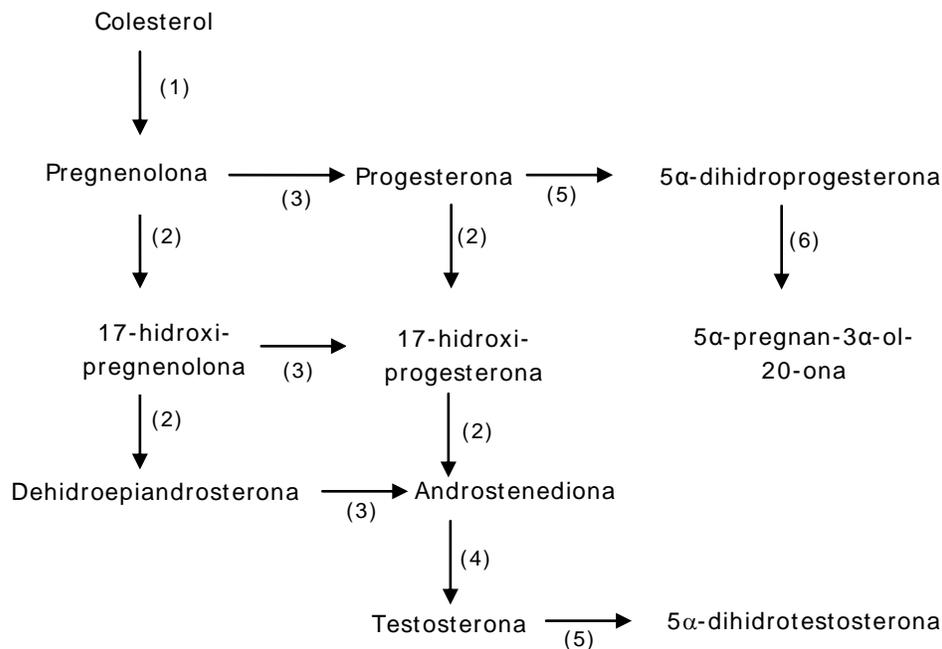


Figura 1. Vía esteroidogénica en el testículo de *R. arenarum*. (1) Citocromo P450 colesterol desmolasa (Cyp450scc); (2) Citocromo P450 17-hidroxilasa, 17-20 liasa (CypP450c17); (3) 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (3β-HSD/I); (4) 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; (5) 5α-reductasa; (6) 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

En *R. arenarum* se demostró que la actividad de la enzima CypP450c17 disminuye luego del tratamiento prolongado con bajas concentraciones de la hormona folículo estimulante (FSH) como con la gonadotrofina coriónica humana (hCG), aún cuando las concentraciones requeridas de hCG son mucho mayores. Por lo tanto, su disminución en el período reproductivo podría deberse, al menos en parte, a un aumento en la concentración de FSH (Canosa y Ceballos, 2002a, 2002b). Además, la actividad y expresión de esta enzima son inhibidas por dexametasona y el derivado 5α-reducido de corticosterona. Sin embargo, la disminución de la actividad es mayor que la caída en la cantidad de proteína, sugiriendo que la disminución de la actividad enzimática inducida por los glucocorticoides podría deberse también a modificaciones postraduccionales (Tesone y col., 2011, Tesis doctoral Dra. Regueira). Dado que la disminución de la actividad de CypP450c17 en el período reproductivo

explicaría el cambio en la biosíntesis de esteroides, esta enzima constituye un punto clave de regulación en la vía esteroidogénica de esta especie.

Otros trabajos del laboratorio corroboraron que los niveles plasmáticos de andrógenos en *R. arenarum* disminuyen durante el período reproductivo (Denari y Ceballos, 2005). Además, fue en dicho trabajo en el que se propuso dividir el período no reproductivo en dos, teniendo en cuenta las variaciones mensuales en las concentraciones plasmáticas de testosterona. El período no reproductivo entonces fue dividido en el período pre reproductivo (PreR, mayo-agosto), con niveles plasmáticos de testosterona muy elevados y un período post reproductivo (PostR, enero-abril), con concentraciones plasmáticas de testosterona intermedias. La notable caída de los niveles plasmáticos de testosterona y 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) durante el período reproductivo (R) permitió caracterizar a *R. arenarum* como una especie con un patrón reproductivo disociado de andrógenos (Canosa y Ceballos, 2002a; Canosa y col., 2003; Denari y Ceballos, 2005). En el trabajo de Denari y Ceballos (2005) se analizaron también las variaciones estacionales en las concentraciones plasmáticas de corticosterona, el glucocorticoide de esta especie, y se observó que las concentraciones son mínimas durante el período PreR y máximas durante el reproductivo. De este modo, como se muestra en la Figura 2, los tres períodos mencionados se caracterizan por lo siguiente:

- Período PostR: hay una activa síntesis de andrógenos y la producción de corticosterona es moderada.
- Período PreR: ocurre un aumento en la concentración plasmática de andrógenos y una disminución en la concentración de corticosterona.
- Período R: hay una gran disminución en la concentración plasmática de andrógenos y los niveles de corticosterona plasmática son máximos.

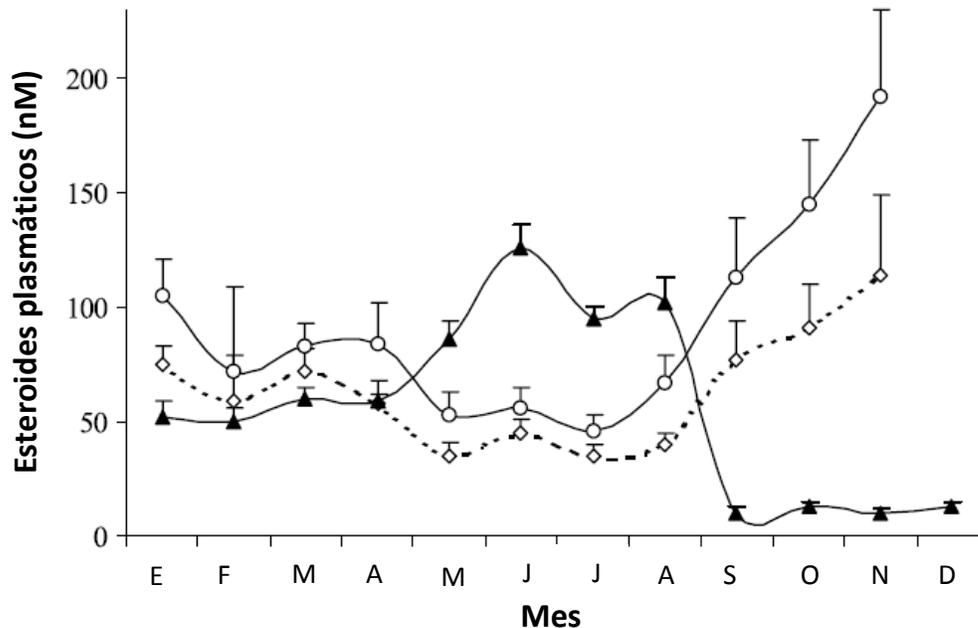


Figura 2. Variaciones estacionales en la concentración plasmática de corticosterona total (○), corticosterona libre (◇) y testosterona total (▲). Los resultados se expresan como el promedio \pm EE. El número de animales varió entre 5 y 8, dependiendo del mes. (Tomado de Denari y Ceballos, 2005).

Por otra parte, al igual que en mamíferos, las células de Leydig de los anfibios expresan la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (3β -HSD/I) (Arvy, 1962; Botte y Delrio, 1967; Antila y Saure, 1978; Pozzi y col., 1997). Esta enzima es la encargada de convertir los 3β -hidroxi-5-ene esteroides en 3-oxo-4-ene esteroides, y constituye un paso fundamental en la biosíntesis de corticosteroides, progestágenos y andrógenos. En *X. laevis* se demostró que la actividad de esta enzima disminuye con la administración de gonadotrofinas (Wiebe 1970, 1971) y, además, en esta especie y en *Lithobates pipiens* esta enzima se localiza en el retículo endoplasmático liso (Wiebe, 1972). En *Rana temporaria* y *P. esculentus* se describió que durante la hibernación las células de Leydig no tienen lípidos ni actividad de la enzima 3β -HSD/I (Callard y col., 1978). A finales del invierno, las células comienzan a llenarse de lípidos y la actividad de esta enzima aumenta. Luego de la puesta de los huevos, tanto los lípidos como la actividad de la enzima comienzan a

disminuir, las células de Leydig ingresan en regresión y no se las diferencia de las células del tejido conectivo intersticial. En el caso de *R. arenarum*, la enzima 3β -HSD/I testicular es de localización mitocondrial y microsomal y ambas actividades son mayores en el período reproductivo al compararlas con el no reproductivo, si bien no se habían analizado las diferencias entre el PreR y el PostR (Pozzi y col., 1997). Se demostró también que esta enzima no es regulada ni por FSH ni por hCG ni por la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH (Canosa y Ceballos, 2002b; Canosa y col., 2002), con lo cual los factores que regulan a la enzima 3β -HSD/I testicular en esta especie permanecen desconocidos.

Existe una gran variabilidad en la regulación hormonal de la reproducción en los anuros y estas evidencias demuestran que, particularmente en *R. arenarum*, la profundización del estudio de las variaciones estacionales en la esteroidogénesis testicular y de la espermatogénesis constituye un factor clave que contribuye a un mayor entendimiento de la regulación hormonal de su ciclo reproductivo.

Regulación de la reproducción

Como ocurre en todos los vertebrados, el control de la reproducción en los anfibios es ejercido por el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. El término 'eje' hace referencia a la interacción entre un componente del sistema nervioso central (hipotálamo) y el sistema endocrino relacionado con la reproducción, es decir la hipófisis y las glándulas periféricas (ovario o testículo). Las gonadotropinas hipofisarias tienen un rol clave en el control de la gametogénesis y la función endócrina de las gónadas (Norris, 2007). Todos los vertebrados poseen dos gonadotropinas, FSH y la hormona luteinizante (LH). GnRH estimula a LH y FSH, que son liberadas al torrente sanguíneo y de este modo alcanzan sus órganos blanco, regulando así el funcionamiento gonadal. La función de las gonadotropinas hipofisarias ha sido estudiada en la mayoría de los vertebrados, aunque con mayor profundidad en los mamíferos. En este grupo, LH estimula la síntesis de andrógenos en las células de Leydig (Hall, 1994) y en las células de la teca de los folículos

ováricos (Tajima y col., 2007). Por otra parte, FSH está involucrada en la producción de gametas, entre otras funciones. En los machos actúa sobre las células de Sertoli, encargadas de coordinar la espermatogénesis y en las hembras estimula el desarrollo de los folículos ováricos. FSH también estimula la expresión de la enzima aromatasa en las células de la granulosa del ovario y en las células de Sertoli de los mamíferos pre púberes, promoviendo así la conversión de andrógenos a estrógenos (Norris, 2007).

Diversos estudios en anfibios han analizado si la reproducción en este grupo se encuentra bajo el control de una o de dos gonadotrofinas, tal cual ocurre en mamíferos. En anuros, diversos autores demostraron que existen dos gonadotrofinas químicamente distintas entre sí y similares a LH y FSH de mamíferos (Licht y Papkoff, 1974; Papkoff y col., 1976; Licht y col., 1977; Takahashi y Hanaoka, 1981; Hanaoka y col., 1984; Takada y Ishii, 1984; Takahashi y Hanaoka, 1985; Itoh y col., 1990; Itoh e Ishii, 1990; Hayashi y col., 1992 a, b; Pinelli y col., 1996; Kim y col., 1998; Huang y col., 2001; Komoike e Ishii, 2003; Zhang y col., 2007; Volonteri y col., 2013). Al igual que en mamíferos, ambas gonadotrofinas están formadas por dos subunidades, α y β , siendo la subunidad β la que les confiere especificidad de función.

Con respecto a la función biológica de las gonadotrofinas, en *R. temporaria* la administración de LH en individuos hipofisectomizados induce la espermiación y la hipertrofia de las células de Leydig mientras que la inyección de FSH estimula la división de las espermatogonias y de las células de Sertoli (Lofts, 1961). Estos resultados sugirieron que en anuros la función testicular está regulada por dos gonadotrofinas, al igual que en mamíferos. Sin embargo, otros trabajos fueron menos concluyentes con respecto a la especificidad de la respuesta a LH y FSH (Licht, 1973; Callard y col., 1978). Por lo tanto, a pesar de que en anfibios las gonadotrofinas pueden ser semejantes a FSH y LH de mamíferos, no hay consenso acerca de las células blanco de cada una de ellas. Además, si bien los genes que codifican para ambas hormonas y para sus receptores están diferenciados, la especificidad de los sitios de unión no está claramente establecida. Por ejemplo en *L. catesbeianus*, cuando se utilizan LH

y FSH homólogas se observa que los receptores de FSH tienen baja especificidad. La unión de FSH es completamente desplazada tanto por FSH como por LH mientras que la unión de LH puede ser desplazada sólo parcialmente por altas concentraciones de FSH (Takada y col., 1986). Por lo tanto, en los anfibios, los receptores de gonadotrofinas tendrían una baja especificidad, siendo más específico el receptor de LH que el de FSH.

En *R. arenarum*, la regulación de la función testicular por las gonadotrofinas fue estudiada por varios autores pero utilizando gonadotrofinas heterólogas. Las gonadotrofinas estimulan y mantienen la espermatogénesis, el volumen del compartimento intersticial, la liberación de los espermatozoides y contribuyen a desarrollar y mantener los caracteres sexuales secundarios y el comportamiento sexual (Burgos, 1951; Burgos y Houssay, 1957; Burgos y Rufino, 1952; Iriarte y Burgos, 1958, Mancini y Burgos, 1947; Pisanó y Burgos, 1971; Pizarro y Burgos, 1963; Pozzi y Ceballos, 2000; Pozzi y col., 2006). Con respecto al papel que ejerce cada gonadotrofina en la función testicular, en nuestro laboratorio se estudió el efecto *in vitro* de hCG, la LH y la FSH, las dos últimas recombinantes de origen humano, en la espermiación y la síntesis de testosterona. En primer lugar, se observó que tanto FSH como hCG inhiben la síntesis de andrógenos luego del tratamiento *in vitro* por períodos prolongados (Canosa y Ceballos, 2002b). Años más tarde se encontró que mientras que FSH estimula eficientemente la espermiación, tanto LH como FSH estimulan la síntesis aguda de andrógenos, sugiriendo que la espermiación y la esteroidogénesis son inducidas por distintos receptores (Pozzi y col., 2006). Cabe destacar que la aparente discrepancia entre ambos trabajos no es tal, debido a que en el primer trabajo se evaluó el rol de las gonadotrofinas luego de tratamientos prolongados y, en cambio, en el segundo se estudiaron los efectos agudos. Además se observó que, si bien las gonadotrofinas no tienen efecto sobre la actividad de la enzima 3β HSD/I, tanto hCG como FSH inhiben la actividad de las enzimas 5α -reductasa y CypP450c17 testiculares (Canosa y Ceballos 2002a, b). De este modo, FSH estaría involucrada en la regulación de los cambios que ocurren en la biosíntesis de esteroides testiculares durante el período reproductivo, tal como se mencionara en párrafos anteriores.

Recientemente, en nuestro laboratorio se obtuvieron las secuencias de las subunidades β de LH (LH β) y de FSH (FSH β) de *R. arenarum* y el análisis filogenético sugirió que LH β posee una secuencia más cercana a la de los teleósteos que a la de los mamíferos y las aves mientras que la secuencia de la subunidad β de FSH tiene mayor porcentaje de identidad con la de los mamíferos. Se analizaron también las variaciones estacionales en la expresión del ARNm de LH β y FSH β y se observó que la expresión de los ARNm parece tener un patrón opuesto al de la concentración plasmática de andrógenos. La expresión de los mensajeros de las gonadotrofinas es mínima hacia finales del período PostR y durante el PreR, y aumentan en el período reproductivo y a comienzos del PostR (Figura 3, Volonteri y col., 2013). Si bien la expresión del ARNm de las subunidades β podría no reflejar necesariamente lo que ocurre con los niveles circulantes de gonadotrofinas, es un primer indicio de la relación entre ellas y los esteroides. Por otro lado, el tratamiento con andrógenos durante el período reproductivo inhibe la expresión del ARNm LH β mientras que el tratamiento con estrógenos inhibe la expresión del ARNm FSH β durante todo el año (Tesis doctoral, Dra. Volonteri).

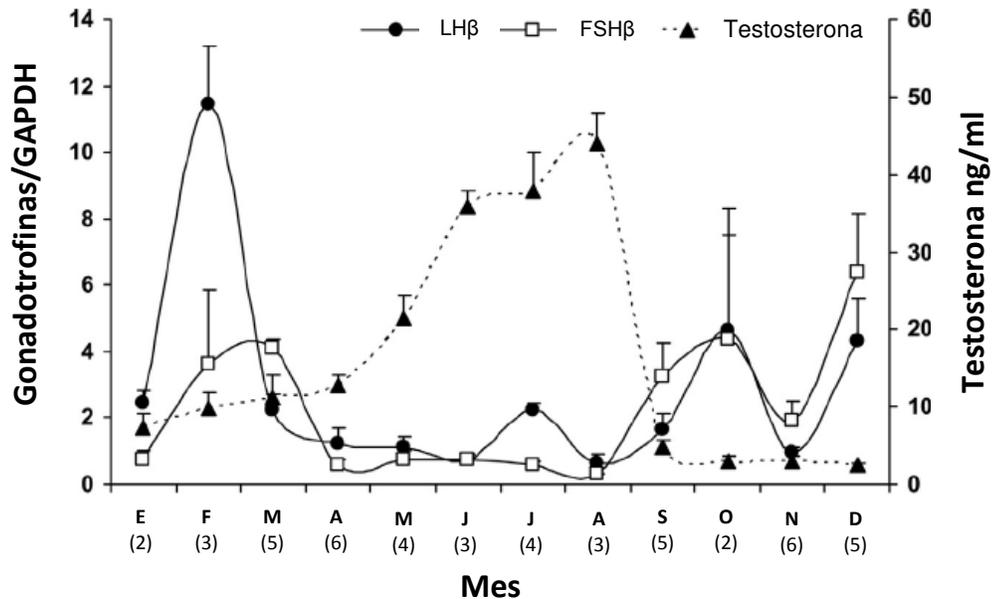


Figura 3: Variaciones estacionales en la expresión de los ARNm de FSH β y LH β y en las concentraciones plasmáticas de testosterona. La cantidad de ARNm de las gonadotropinas está expresada como el promedio de las relaciones de cada ARNm/GAPDH en cada mes \pm EE. Las concentraciones de testosterona están expresadas en ng/ml y como las medias \pm EE. Los números entre paréntesis indican el número de animales analizados en cada mes. (Tomado de Volonteri y col., 2013).

El órgano de Bidder

El órgano de Bidder (BO) es una estructura característica de la familia Bufonidae y está ubicado en la zona anterior del testículo. Históricamente, este órgano fue comparado con un ovario atrofiado debido a que posee oocitos arrestados en estadio joven, previtelogénico. Su presencia sistemática en el extremo anterior de los testículos de los bufónidos ha llevado a pensar en los sapos machos como potenciales hermafroditas (Ponse, 1927a). Estudios histológicos realizados en *Rhinella icterica* muestran que se pueden distinguir una corteza, caracterizada por la presencia de oocitos y células foliculares y una médula, donde hay vasos sanguíneos y células pigmentadas que contienen melanina (Farias y col., 2002). En la corteza pueden observarse folículos

bidderianos en distintos estadios de desarrollo. Si bien la gran mayoría son previtelogénicos, en algunos oocitos pueden distinguirse núcleos con microvellosidades en la envoltura nuclear y con nucléolos ubicados periféricamente, aspecto característico de los oocitos vitelogénicos tempranos.

Si bien la presencia del BO en los machos de bufónidos es evidente debido a que se puede distinguir fácilmente del testículo, su presencia en hembras es más difícil de determinar. Como el BO está ubicado adyacentemente a la gónada y dado que el ovario en anuros alcanza un gran desarrollo y tamaño, es muy difícil distinguir el BO en hembras e incluso en algunos casos, imposible. Según la bibliografía, el BO fue registrado en hembras de *R. icteria* (Farias y col., 2004), *Bufo vulgaris* (Ponse 1927b) y *Bufo bufo* (Falconi y col., 2007). En *Bufo lentiginosus* se produce la desaparición de este órgano en las hembras jóvenes y no se encuentran trazas de él en hembras de segundo año (King, 1908), mientras que en *Rhinella marina*, está presente solo en machos (Brown y col., 2002).

En *R. arenarum* el BO es evidente desde la vida larval, en el estadio 26 (Gosner, 1960; Sassone y col., 2014). En las hembras de esta especie la atresia de los folículos bidderianos aumenta marcadamente durante el tercer invierno y el órgano reduce su tamaño al llegar la primavera y, finalmente, en el cuarto verano pierde su organización y desaparece totalmente (Echeverría, 1990). En cambio, en los machos juveniles el BO no desaparece y a partir del cuarto año de vida exhibe un patrón cíclico anual (Echeverría, 1990).

En general, a lo largo de los años, se propuso que el desarrollo del BO en diversas especies de anuros permanece detenido por la diferenciación de la gónada funcional femenina o masculina. En *B. vulgaris* se observó que al gonadectomizar sapos machos y hembras con gónadas funcionales, el BO alcanza un desarrollo similar al de un ovario funcional en ambos sexos, cuyos oocitos alcanzan estadios vitelogénicos (Ponse, 1927b). Debido a esta potencialidad del BO, algunos autores consideran su presencia como una posible estrategia reproductiva (Tanimura e Iwasawa., 1986). Por otra parte, Pancak-Roessler y Norris (1991) también sugirieron que la inhibición de la

oogénesis en *Anaxyrus woodhousii* es debida a la presencia de un testículo funcional, dado que la orquiectomía bilateral provoca un aumento en el peso de los BOs y favorece el desarrollo de los oocitos hacia estadios más avanzados. En *Duttaphrynus melanostictus*, se demostró que el mencionado órgano se atrofia como consecuencia de la administración de testosterona, apoyando la idea de que la funcionalidad del testículo mantiene reprimida la diferenciación del BO (Deb y Chatterjee, 1963). Todas estas evidencias han llevado a sugerir que la inhibición de la oogénesis en el BO podría deberse a la presencia de algún/os factor/res producidos por el testículo funcional, siendo el candidato más firme la testosterona o alguno de sus derivados.

En *R. arenarum*, las observaciones macroscópicas del BO reflejan que si bien en la mayoría de los individuos el BO tiene un tamaño reducido con respecto al tamaño testicular, en algunos casos el BO alcanza un gran desarrollo y un tamaño mucho mayor que el del testículo adyacente (Figura 4, Scaia y col., 2011). Además, el análisis histológico mostró que si bien muchos folículos son previtelogénicos, otros se encuentran en vitelogénesis temprana, con un citoplasma heterogéneo y una vesícula germinal central, e incluso otros folículos están en el estadio de vitelogénesis tardía (Figura 5, Scaia y col., 2011).

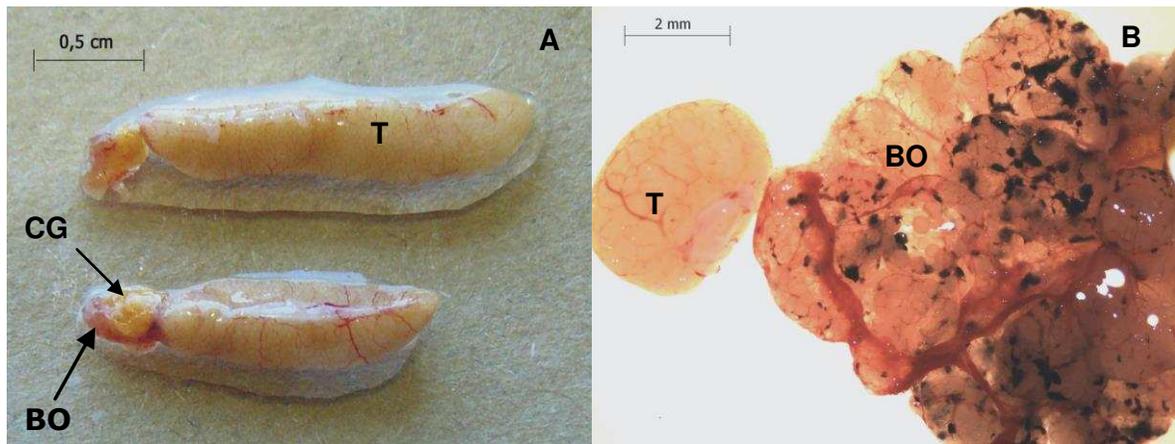


Figura 4. (A) Testículos de distintos tamaños pertenecientes a un mismo individuo. Los órganos de Bidder (BO) en este caso son de menor tamaño que los testículos (T). Puede observarse también algunos fragmentos de cuerpos grasos (CG). (B) Órganos de Bidder de gran tamaño, mayor al testicular. (Tomado de Scaia y col., 2011).

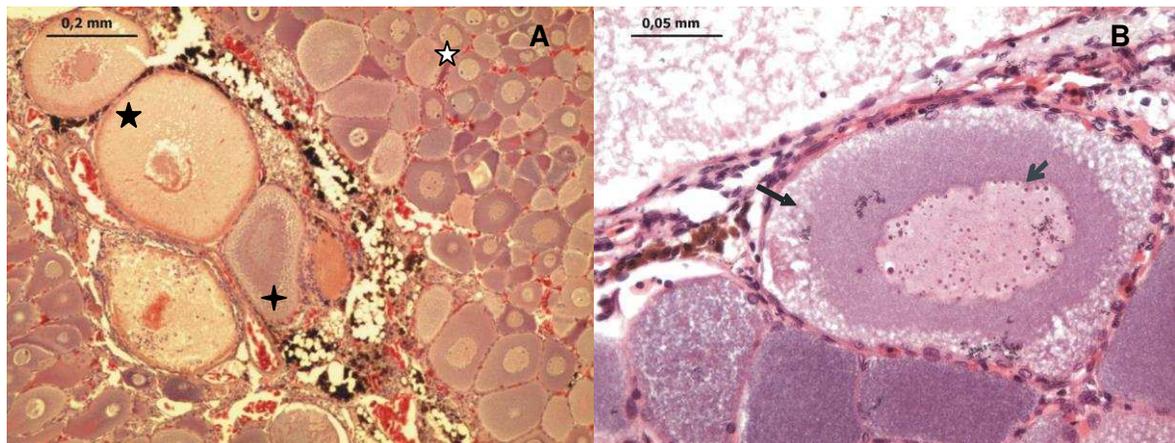


Figura 5. (A) Folículos bidderianos en distintos estadios de desarrollo. La mayoría de los folículos son previtelogénicos (☆), mientras que otros se encuentran en vitelogénesis temprana (✦) o tardía (★). (B) Detalle de un folículo bidderiano en vitelogénesis temprana. Obsérvese el citoplasma heterogéneo con vitelo ubicado periféricamente (→), vesícula germinal con membrana nuclear irregular (→) y numerosos nucléolos. (Tomado de Scaia y col., 2011).

La capacidad esteroidogénica del BO fue analizada en diversas especies. En *D. melanostictus* se registró la presencia de algunas enzimas esteroidogénicas tales como la 3β -HSD/I y la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Ghosh y col, 1984) y en *A. woodhousii* se localizó la actividad de estas enzimas en el ooplasma y las células foliculares (Pancak-Roessler y Norris, 1991). Por otra parte, en *B. bufo* se sugirió que la producción de esteroides por parte del órgano permite pensar en los machos de esta especie como "hermafroditas hormonales" dado que son capaces de producir estradiol (E_2) a partir de pregnenolona radioactiva (Colombo y Colombo Belvedere, 1980).

La presencia de E_2 en circulación es un fenómeno que se observa en los machos de numerosas especies de diversos grupos de vertebrados, inclusive en anfibios. En algunas especies de anuros pertenecientes a la familia Ranidae el E_2 plasmático es de origen testicular (Polzonetti-Magni y col., 1984, Varriale y col., 1986; Fasano y col., 1989) a diferencia de lo que ocurre en *R. arenarum*. Si en esta especie hubiera E_2 en circulación, los testículos no serían los responsables de su producción debido a que no expresan la enzima aromatasa (Canosa y col., 1998; Canosa y Ceballos, 2001). Por otra parte, el BO de *R. arenarum* expresa varias enzimas esteroidogénicas tales como Cyp450scc, 3β -HSD/I, CypP450c17 y aromatasa, esta última encargada de producir estrógenos a partir de andrógenos aromatizables, lo cual sugiere que el BO podría ser una fuente de E_2 plasmático (Scaia y col., 2011).

Con respecto a las variaciones estacionales en el desarrollo del BO, se encontró que el peso de estos órganos es menor en el período PreR, cuando las concentraciones plasmáticas de andrógenos son máximas, y significativamente mayor en el reproductivo, cuando los niveles de andrógenos son mínimos (Scaia y col., 2011). Estas observaciones sugirieron que podría haber una regulación negativa del desarrollo del BO por parte de los andrógenos. Sin embargo, no hay una correlación significativa entre el desarrollo de los BO y los niveles de andrógenos plasmáticos, sugiriendo que otros factores hormonales podrían estar involucrados en la regulación del

desarrollo del BO. El tratamiento con dexametasona no altera la actividad de la enzima aromatasa en el BO, sugiriendo que los glucocorticoides no estarían involucrados en la regulación de la producción de estrógenos por parte del BO (Tesis de Licenciatura, M.F. Scaia, 2010). De este modo, los factores involucrados en la regulación del desarrollo y la actividad esteroideogénica del BO en *R. arenarum* se desconocen.

Surge entonces la siguiente pregunta: ¿Qué significado tiene en el marco de la fisiología reproductiva de los anfibios, profundizar el estudio del BO y de su regulación?

Algunos de los agentes químicos utilizados actualmente como herbicidas o pesticidas se comportan como disruptores químicos. Este término hace referencia a aquellos compuestos químicos que alteran la fisiología de los individuos debido a que interrumpen o modifican su regulación endócrina. En mamíferos y reptiles se demostró que algunos de estos disruptores tienen un efecto estrogénico debido a que aumentan la actividad de la enzima aromatasa (Crain y col., 1997; Sanderson y col., 2001). Algunos trabajos proponen efectos similares sobre dicha enzima y la consecuente feminización de larvas de anfibios (Hayes y col., 2002 a y b; Fan y col., 2007; Hayes y col., 2010), mientras que otros autores no encuentran efectos (Hecker y col., 2004, 2005b; Coady y col., 2005). En *Pelophylax nigromaculatus*, la exposición crónica a microcistina, una toxina producida por la cianobacteria *Microcystis*, induce la actividad de aromatasa y produce anormalidades en el testículo (Jia et al., 2014). Además, en *Pleurodeles waltl* la inhibición de la aromatasa produce un desvío en la proporción de sexos, sugiriendo que los estrógenos son fundamentales en la determinación de la proporción de sexos (Chardard and Dournon 1999). En este contexto, es fundamental estudiar el efecto que tienen los estrógenos sobre la función gonadal en especies pertenecientes a la familia Bufonidae. El BO, característico de las especies de esta familia de anuros, es una estructura altamente afectada por las condiciones ambientales. Por ejemplo, en *R. marina* se observó que las anormalidades encontradas en los BO parecen responder a la intensidad de la actividad desarrollada en las zonas

agrícolas en donde los animales son capturados, de manera dosis-dependiente (McCoy y col., 2008).

De todo lo expuesto, y dado que el BO puede estar presente en larvas de ambos sexos y su aparición durante el desarrollo de algunas especies es previa a la diferenciación del esbozo gonadal, resulta evidente que el BO no es un ovario atrofiado, tal como fuera descrito históricamente. La presencia de folículos vitelogénicos y de diversas enzimas esteroidogénicas sugiere que en machos de *R. arenarum* el BO podría ser un órgano productor de estrógenos. Su potencial para producir E₂ y el hecho que el desarrollo de este órgano pueda estar afectado por ciertos agentes químicos empleados en la actividad agrícola realzan el interés por el estudio de su regulación.

La apoptosis testicular

La espermatogénesis es el proceso durante el cual las espermatogonias I sufren divisiones mitóticas sucesivas y se diferencian a espermatogonias II, las cuales a su vez se diferencian a espermátocitos que ingresan en meiosis y dan origen a las espermátidas y finalmente a los espermatozoides maduros. La progresión de la espermatogénesis parecería estar determinada por un equilibrio dinámico entre la proliferación celular y la muerte celular de la línea germinal. En los testículos normales no todas las espermatogonias ingresan en la espermatogénesis para dar lugar a espermatozoides maduros y muchas de ellas mueren antes de la iniciación del proceso (Sinha y col., 1997; Lue y col., 1997; Sinha y col., 2003). De este modo, un gran número de células muere diariamente para mantener la homeostasis testicular y, en este contexto, se requiere un tipo de muerte celular en la cual no se desencadene una respuesta inmune y se proteja el microambiente celular. Los principales tipos de muerte celular son la necrosis, la autofagia y la apoptosis. La necrosis es causada por factores externos tales como infecciones y toxinas y, generalmente, desencadena una respuesta inmune. La autofagia, en cambio, involucra la degradación de componentes celulares mediante la vía lisosomal. Por otro lado, la apoptosis es una muerte celular programada que no involucra lisis celular y, por lo tanto, no desencadena una reacción inflamatoria. El término

'apoptosis' fue utilizado por primera vez para describir un tipo de muerte celular morfológicamente distinto al resto, en el cual se observaban rasgos muy particulares como, por ejemplo, la fragmentación del ADN, la condensación de la cromatina y la protrusión de la membrana plasmática (Kerr y col., 1972). La apoptosis es el tipo de muerte celular más estudiado debido a su gran impacto en la fisiología de todos los tejidos. Este tipo de muerte celular es fundamental, por ejemplo, en la morfogénesis de los tejidos durante el desarrollo y en la regulación fisiológica del número de células. El tejido con mayor incidencia de apoptosis en los machos de vertebrados es el testículo, ya que el 75 por ciento de las células germinales masculinas son "eliminadas" mediante este tipo de muerte celular (Shaha y col., 2010). La apoptosis en la línea germinal puede ocurrir en cualquier estadio de la espermatogénesis y puede ser inducida por factores celulares internos o por disturbios externos que afecten la viabilidad celular.

Existen dos caminos mediante los cuales puede ocurrir la apoptosis: la vía extrínseca, o mediada por receptor, y la vía intrínseca, o mitocondrial. La vía extrínseca se desencadena cuando ciertos receptores (Fas) unen a sus ligandos (FasL), lo cual desencadena la formación del complejo DISC (*'Death-inducing signaling complex'*) y la activación de la cadena de caspasas. En cambio, la vía intrínseca es principalmente regulada por proteínas de la familia Bcl-2 (Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xl), que regulan positiva o negativamente la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo c, entre otros. Una vez en el citosol, el citocromo c junto con otras moléculas apoptóticas forma el apoptosoma, que activa la cascada de caspasas efectoras que llevan a la muerte celular. Si bien cada vía tiene su mecanismo de acción e involucra distintas proteínas, las moléculas de ambas vías pueden influenciar a las moléculas de la otra y ambas participan en la apoptosis de las células germinales durante la espermatogénesis. Algunas de las características histológicas de las células apoptóticas son: protrusión de la membrana plasmática (*'membrane blebbing'*), condensación de la cromatina, contracción celular, vacuolización del citoplasma y aparición de cuerpos apoptóticos que eventualmente son fagocitados (Majno y Joris, 1995). Dentro de las

características bioquímicas de la apoptosis se pueden mencionar la activación de caspasas y el clivaje y la fragmentación del ADN (*'DNA laddering'*) (Fadok y col., 1992). De este modo, tanto las características histológicas como las bioquímicas pueden emplearse en las diversas técnicas de detección de la apoptosis.

En los mamíferos, la apoptosis de la línea germinal ocurre en distintos momentos a lo largo de la vida de los individuos. En primer lugar, este tipo de muerte celular ocurre durante la vida fetal, cuando la apoptosis temprana elimina un cierto número de espermatogonias pre meióticas (Rodríguez y col., 1997). Más adelante, durante la vida adulta, este tipo de muerte celular es importante dado que elimina las células de la línea germinal que podrían haber sido dañadas por la exposición a agentes ambientales tóxicos, quimioterapéuticos, calor, etc. (Wang y col., 2007). Además, se ha sugerido que la apoptosis tiene un rol fundamental en la infertilidad masculina ya que se observaron marcadores apoptóticos tales como la activación de caspasas y la fragmentación del ADN, en células germinales de testículos de pacientes infértiles (Paasch y col., 2004; Grunewald y col. 2009; Aitken y De Iuliiis, 2010; Aitken y Curry 2011).

Con respecto al control hormonal de la apoptosis de la línea germinal en machos, se demostró que tanto la exposición a un exceso de ciertas hormonas como también la falta de ellas pueden desencadenar la apoptosis en el testículo (para una revisión, ver Shaha 2008b). Durante la maduración de los túbulos seminíferos, tanto la testosterona como FSH en combinación con el E₂ promueven la supervivencia celular mientras que el E₂ en ausencia de otras hormonas tiene un efecto pro-apoptótico. Con respecto a la testosterona, en primer lugar se observó que un exceso de esta hormona promueve la muerte celular mediante un aumento en la expresión de Fas/FasL (Zhou y col., 2001) y, por otro lado, la ausencia de testosterona estimula la actividad de las caspasas y la fragmentación de ADN en las células de Sertoli y no así en la línea germinal (Tesarik y col., 2002). El E₂ regula el equilibrio entre la supervivencia celular, la apoptosis y la proliferación en numerosos tejidos, pero

el motivo por el cual esta hormona cambia el equilibrio hacia la supervivencia o hacia la muerte celular es objeto de numerosos estudios y no está aún del todo dilucidado (para una revisión, ver Vasconsuelo y col., 2011). En el caso del testículo, estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que los estrógenos inducen la apoptosis de la línea germinal mediante un aumento en la expresión de Fas/FasL (Nair y Shaha, 2003; Mishra y Shaha, 2005). Por otro lado, tanto testosterona como FSH mantienen la homeostasis testicular inhibiendo las señales de muerte celular (Pareek y col., 2007). Estas evidencias sugieren que la regulación hormonal de la apoptosis constituye un mecanismo complejo que involucra tanto el efecto individual como la acción sinérgica de diversas hormonas.

Apoptosis y proliferación celular como reguladores de la espermatogénesis en anfibios.

La apoptosis en el testículo está relacionada con el equilibrio entre el número de células germinales y la capacidad de soporte de las células de Sertoli y es por ello que el estudio de las variaciones estacionales en la espermatogénesis en anfibios está íntimamente relacionado con la apoptosis de la línea germinal.

Con respecto al mecanismo molecular involucrado en la apoptosis testicular de anfibios, en *Hypselotriton orientalis* la apoptosis inducida por estrés ocurre por la activación de la caspasa 3 mediante las vías extrínseca e intrínseca y que, probablemente, esto involucre a Apaf1 pero no a p53 (Wang y col., 2012). Además, en *P. nigromaculatus* se observó que la apoptosis inducida por microcistina involucra a la vía mitocondrial y al retículo endoplasmático liso (Zhang y col., 2013). Sin embargo, son pocos los autores que investigan la apoptosis en anfibios haciendo foco en los mecanismos moleculares, y la gran mayoría tiene un enfoque más fisiológico centrado en la estacionalidad de la apoptosis dentro del contexto de la espermatogénesis.

Uno de los factores que podría regular la estacionalidad de la apoptosis de la línea germinal es la temperatura. En *Cynops pyrrhogaster*, un urodelo

que vive en zonas templadas, las bajas temperaturas inducen muerte celular de las espermatogonias secundarias debido a un aumento en la concentración plasmática de prolactina y, por lo tanto, los testículos carecen de espermatocitos durante el invierno, época que corresponde al período quiescente (Yazawa y col., 1999). Sin embargo, en otro urodelo, *Triturus marmoratus*, otros autores sugieren que la temperatura no influye sobre la apoptosis testicular dado que se observan altos niveles de apoptosis tanto durante el verano (en espermatocitos primarios) como el invierno (en espermatogonias) (Ricote y col., 2002). Con respecto a los ápodos, en *Ichthyophis tricolor* las células germinales muestran diversas características apoptóticas durante la fase de regresión testicular, tales como núcleos heterocromáticos, fragmentación nuclear en cuerpos apoptóticos y marginalización nuclear, en la que la condensación de la cromatina comienza en la periferia nuclear y adquiere la característica forma cóncava semejante a "media luna". La apoptosis durante la fase de regresión testicular fue confirmada además mediante microscopía electrónica y mediante el ensayo de TUNEL (Smita y col., 2005). En algunos anuros, como *L. catesbeianus* de zonas tropicales, hay una elevada producción de espermatocitos durante el invierno y luego, durante la primavera, se completa la meiosis y ocurre la espermiogénesis y la espermiación, procesos que se repiten en el verano (Sasso-Cerri y col., 2004). Además, en esta especie, se observan altos niveles de apoptosis en los cistos en el período reproductivo, hacia finales de la primavera, y durante el verano, época del año que se asocia con un fotoperíodo largo y elevadas temperaturas (Sasso-Cerri y col., 2006). En este último trabajo, los núcleos apoptóticos están dentro de vacuolas que generalmente se encuentran cerca o incluso rodeadas por células de Sertoli. Además, el citoplasma de las células de Sertoli contiene estructuras membranosas similares a cuerpos apoptóticos. Estas observaciones en *L. catesbeianus* concuerdan con trabajos anteriores que sugieren que las células que mueren por apoptosis durante la espermatogénesis son fagocitadas por las células de Sertoli (Allan y col., 1992; Shiratsuchi y col., 1997; Sasso-Cerri y Miraglia, 2002).

Por otra parte, la espermatogénesis está íntimamente ligada a la proliferación de la línea germinal. La proliferación de las espermatogonias fue estudiada en diversas especies de anfibios, como por ejemplo *C. pyrrhogaster* (Yuwen y col., 2008) y *P. esculentus*, siendo esta última una de las especies más estudiadas. Uno de los primeros trabajos sobre la proliferación celular en anuros trata acerca de la localización de Jun, Fos, Myc y Mos en el testículo de *P. esculentus* (Chieffi y col., 1995). Estas proteínas son productos de la familia de los proto-oncogenes, que son genes altamente conservados y que tienen roles fundamentales en el control del desarrollo y la diferenciación. Los proto-oncogenes se expresan diferencialmente en los distintos estadios de la espermatogénesis de *P. esculentus*. Si bien todos se expresan en las espermatogonias I y II, Myc y Mos también se expresan en los espermatoцитos I y III, en tanto que Jun sólo se expresa en los espermatoцитos II. Además, en esta especie, Myc, Fos y Jun espermatogoniales translocan al núcleo cuando comienza una nueva onda espermatogénica (a partir de febrero y marzo), lo que sugiere que la actividad de los proto-oncogenes tiene un rol regulatorio en la espermatogénesis de anfibios (Chieffi y col., 1995). Años más tarde, se profundizó en el estudio de la actividad testicular de Mos en esta misma especie y se observó que tanto el ARNm como la proteína están presentes durante todo el ciclo reproductivo. Además, la expresión del ARNm y la síntesis de la proteína aumentan significativamente en marzo y mayo, respectivamente. De este modo, la máxima síntesis de Mos en mayo coincide con que la proliferación de las espermatogonias se enlentece y las divisiones meióticas se aceleran, sugiriendo que esta proteína está involucrada en la regulación de la proliferación de las espermatogonias (Ferrara y col., 2004). En esta especie, Chieffi y col. (2000a) analizaron también la localización intratesticular mediante inmunohistoquímica y las variaciones estacionales en la expresión de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). PCNA es una proteína nuclear altamente conservada y es un componente esencial en la replicación y reparación del ADN. Es por ello que PCNA es uno de los marcadores moleculares más utilizados para el estudio de la mitosis del epitelio germinal. Los autores mencionados observaron inmunomarca en las espermatogonias I y

II y, sorprendentemente, también en los espermatocitos I. Con respecto a las variaciones estacionales, la máxima expresión de PCNA en las espermatogonias I ocurre en marzo, mientras que en las espermatogonias II se produce en julio, octubre y noviembre. Por otro lado, los autores adjudican la presencia de PCNA en los espermatocitos I al hecho de que esta proteína además de estar involucrada en la replicación del ADN participa también en su reparación. Las variaciones estacionales de PCNA en *P. esculentus* fueron también estudiadas en relación con las variaciones estacionales en la expresión de c-kit, un proto-oncogen que es indispensable para la proliferación y diferenciación de las espermatogonias (Vincent y col., 1998; Sette y col., 2000). Se observó que c-kit se expresa en todos los estadios de la espermatogénesis, y que tanto c-kit como PCNA aumentan significativamente durante el período reproductivo (Raucci y Di Fiore, 2007). Estos resultados sugieren que la máxima proliferación durante el período reproductivo está asociada a altos niveles de PCNA y a la activación del sistema c-kit.

En vista de estos antecedentes, resulta evidente que tanto la apoptosis como la proliferación son procesos muy complejos que involucran diversas proteínas y mecanismos moleculares. La activación diferencial de cada uno de ellos en los distintos estadios de la espermatogénesis determina el balance entre la apoptosis y la proliferación celular. De este modo, resulta casi imposible estudiar la espermatogénesis en anfibios sin hacer referencia a las variaciones estacionales en la proliferación y apoptosis testicular.

Regulación hormonal de la espermatogénesis.

Con respecto al control hormonal de la espermatogénesis, en mamíferos se demostró que FSH, LH y testosterona regulan la progresión de la línea germinal y que un exceso o bien la ausencia de estas hormonas pueden estimular la apoptosis testicular. Como se mencionó anteriormente, durante la maduración de los túbulos seminíferos, la testosterona y FSH, esta última en combinación con el E₂, promueven la supervivencia celular mientras que el E₂ en ausencia de otras hormonas tiene un efecto pro-apoptótico. La caída en las concentraciones de FSH y de testosterona conduce a una activación de las vías

intrínseca y extrínseca, sugiriendo que ambas hormonas son fundamentales para mantener la homeostasis espermatogénica (Pareek y col., 2007). La importancia de la testosterona en el mantenimiento de la homeostasis se manifiesta tanto por exceso como por su ausencia. El exceso provoca un aumento en la expresión de Fas/FasL en testículo mientras que su ausencia estimula la actividad de caspasas y provoca fragmentación en el ADN de las células de Sertoli (Zhou y col., 2001; Tesarik y col., 2002). Por otro lado, si bien en mamíferos FSH regula la espermatogénesis, su importancia en la fisiología testicular de roedores varía según la especie. Se ha postulado que si bien FSH está involucrada en la regulación de la espermatogénesis, esta hormona no sería esencial para mantener la fertilidad en ratones (para una revisión ver Siegel y col., 2013). En cambio, en el hámster FSH estimula la proliferación de las células de Sertoli y es la principal hormona reguladora de la espermatogénesis en adultos (Tarulli y col., 2006). En el caso de los primates, las células de Sertoli expresan el receptor de FSH y el hecho de si esta hormona es fundamental para mantener la fertilidad, o no, ha sido objeto de profundos debates (para una revisión ver Plant y Marshall, 2001). Es decir que el rol de FSH en la regulación de la espermatogénesis varía entre y dentro de los distintos grupos de mamíferos y "*parecería estar adaptado a las necesidades de cada especie*" (tomado de una revisión de Schlatt y Ehmcke, 2014).

Otro factor involucrado en la regulación de la fisiología testicular es GnRH, un neuropéptido de origen hipotalámico que pertenece a una familia de decapeptidos encargados de promover y mantener las funciones reproductivas en los vertebrados, entre otras cosas. Este neuropéptido juega un rol fundamental en la regulación del proceso reproductivo de los vertebrados y desde su purificación a partir de hipotálamo ovino (Burgus y col., 1972) se han descrito numerosas formas (para una revisión ver Kah y col., 2007; Kim y col., 2011).

Como ya se mencionó, GnRH tiene un rol fundamental en la regulación de la fisiología testicular de los vertebrados (para una revisión, ver Meccariello

y col., 2014) y puede regular eventos de proliferación y de inhibición de la proliferación celular. Por ejemplo, en ratones con la espermatogénesis endógena bloqueada, el tratamiento *in vivo* con un agonista de GnRH (leuprolide) estimula la colonización de células espermatogénicas en testículo luego de la implantación de espermatogonias provenientes de ratones dadores (Ogawa y col., 1998). Además, el tratamiento *in vivo* de ratas con un antagonista de GnRH (Cetrorelix) indujo una disminución de la apoptosis espermatogonial, llevando a un incremento del número de espermatogonias en comparación con las ratas control (Shuttlesworth y col., 2000). Además, GnRH tiene un efecto directo sobre el testículo en diversos peces, roedores y primates (para revisiones sobre este tema, ver Pierantoni y col., 2002; Kah y col., 2007; Pierantoni y col., 2009; Chianese y col., 2011). En algunos casos este efecto directo involucra una acción anti proliferativa, ya que modula la apoptosis celular en la regresión de las gónadas en peces (Andreu-Vieyra y col., 2005; Soverchia y col., 2007).

Otros actores fundamentales en la regulación de la espermatogénesis son las kipeptinas, neuropéptidos de origen hipotalámico que participan en la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, al regular directamente a GnRH o a las gonadotrofinas (Oakley y col., 2009). Si bien estos neuropéptidos regulan principalmente la secreción de GnRH por parte de las neuronas hipotalámicas también participarían de la regulación intra-gonadal (para una revisión, ver Meccariello y col., 2014).

En los anfibios, las neurohormonas también tienen un papel importante en la regulación de la reproducción (para una revisión, ver el capítulo 2 en "Hormones and Reproduction of Vertebrates", Vol. 2, por Tsai, 2011). En el caso particular de *P. esculentus*, se propuso un mecanismo de regulación intratesticular en el cual GnRH gonadal estimula la producción de andrógenos y la proliferación de las espermatogonias directamente mientras que los andrógenos inducen la formación de espermátidas y estimulan la proliferación de las espermatogonias (Minucci y col., 1992). En *R. arenarum*, GnRH también tiene un efecto directo sobre el testículo ya que reduce la producción de

testosterona mediante la inhibición de CypP450c17 (Canosa y col., 2002). Además, el estudio de las formas de GnRH en larvas de esta especie sugiere que GnRH de mamífero es el péptido mayoritario y probablemente sea la única variante de GnRH presente en el cerebro durante el desarrollo de esta especie (Somoza y col., 1996). Además, se describió la localización de GnRH de mamífero en el cerebro de adultos de esta misma especie y también se sugirió que es la principal isoforma en adultos (Miranda y col., 1998). En el mismo trabajo se detectaron fibras GnRHérgicas que desembocaban en la *pars nervosa* de la neurohipófisis, lo cual sugeriría que GnRH puede llegar a la circulación general. Aún se desconoce si GnRH tiene algún efecto sobre la proliferación de las espermatogonias en *R. arenarum*.

Por otra parte, durante la época reproductiva de *P. esculentus* hay una asociación positiva entre los elevados niveles de testosterona, la actividad mitótica del epitelio germinal y la expresión de PCNA y c-kit, que como ya se mencionó son indispensables para la espermatogénesis y la proliferación de las espermatogonias (Raucci y di Fiore, 2007). Por otro lado, en *L. catesbeianus* se observó, mediante inmunohistoquímica, que las células primordiales en el testículo retienen testosterona durante el invierno (Sasso-Cerri y col., 2005), aunque estos resultados deberían ser revisados si se considera que los esteroides no se almacenan dada su gran permeabilidad. Los autores de este trabajo sugieren que las células primordiales actuarían como un reservorio de andrógenos y que así controlarían o bien la espermatogénesis temprana durante el invierno o bien la espermiogénesis y la espermiación durante la primavera y el verano siguientes.

Los estrógenos y sus receptores también juegan un rol fundamental en la regulación de la espermatogénesis en mamíferos (Shaha, 2008a; O' Shaughnessy, 2014). Los receptores de estrógenos pertenecen a la familia de receptores nucleares (NR) que son factores de transcripción activados por sus ligandos. Se los clasifica como NR tipo I (receptor de estrógenos, andrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides y progesterona) o NR tipo II (receptor de hormona tiroidea, vitamina D y ácido retinoico). Los receptores de

estrógenos corresponden a los receptores NR tipo I, los cuales tienen una localización citoplasmática cuando no están unidos a sus ligandos y están asociados a chaperonas que mantienen la conformación del receptor de modo tal que este puede unir su ligando, pero no DNA. Luego de unirse a la hormona, los receptores NRI tienen cambios conformacionales y traslocan al núcleo, donde se asocian a la cromatina y regulan la transcripción de genes (para una revisión, ver Bagamasbad y Denver, 2011; Nelson y Habibi, 2013). Además, se han descrito por lo menos dos tipos, receptor tipo α y tipo β (ER α y ER β). En mamíferos ER α tiene una expresión generalizada, mientras que ER β se expresa mayoritariamente en ovarios, pulmones y próstata (Couse y col., 1997). En el testículo de mamíferos las células de Leydig y Sertoli expresan receptores para E₂ del tipo ER α y ER β , en tanto que las células germinales poseen solo ER β . La presencia de ER β en la línea germinal se demostró en los testículos de diversas animales, como por ejemplo ratones, ratas, humanos, lagartos y ranas (Saunders y col., 1998; van Pelt y col., 1999; Jefferson y col., 2000; Aschim y col., 2004; Chieffi y Varriale, 2004; Selva y col., 2004; Stabile y col., 2006; Vicini y col., 2006). Por otra parte, se han descrito también receptores de membrana capaces de mediar acciones rápidas, no genómicas. Tal es el caso de GPR30, un receptor acoplado a la proteína G que una vez unido al E₂ desencadena una cascada señalización de segundos mensajeros (Nelson y Habibi, 2013). A pesar de la importancia que tiene la existencia de un receptor de E₂ que medie efectos no genómicos, los resultados que proponen que GPR30 funciona como receptor de estrógenos son aún controversiales (para una revisión acerca de esta controversia, ver Langer y col., 2010).

Las células de la hipófisis y las células de la línea germinal, entre otros tipos celulares, expresan receptores para estrógenos (ER α y ER β) y se ha demostrado que ratones que no expresan ER α son infértiles debido a que la acción de los estrógenos durante el período neonatal es fundamental para el correcto funcionamiento de la espermatogénesis y la fertilidad en individuos adultos (Sinkevicius y col., 2009). En cambio, si bien aquellos ratones que no expresan ER β también son estériles, esto no sería debido a una

espermatogénesis defectuosa (Antal y col., 2008). Por otro lado, distintos agentes químicos con función estrogénica podrían actuar como agonistas o antagonistas de distintas hormonas, interfiriendo así con la regulación de la espermatogénesis, lo que provocaría una disminución de la fertilidad (Nikula y col., 1999). Se demostró también que la administración de estrógenos es perjudicial para la producción y maduración de los espermatozoides (McGlynn y col., 2008). Esto podría estar relacionado con que, como se mencionó anteriormente, los estrógenos inducen la apoptosis de las células germinales mediante la vía extrínseca y mediante una estimulación del sistema Fas/FasL (Nair y Shaha 2003; Mishra y Shaha 2005). El efecto que tienen los estrógenos en la apoptosis y la función testicular de mamíferos ha llevado a la especulación de que podría existir una relación entre un aumento de los contaminantes estrogénicos ambientales y la reducción de la fertilidad.

En el caso de los anfibios, la espermatogénesis también está bajo el control de las gonadotropinas y los esteroides sexuales. En urodolos se demostró que la administración de FSH de mamíferos en individuos hipofisectomizados de *P. waltl* y *Ambystoma tigrinum* estimula la espermatogénesis (Andrieux y col., 1973; Moore, 1975). Además, en *C. pyrrhogaster*, la FSH porcina promueve la proliferación de las espermatogonias y su diferenciación a espermatoцитos I (Ji y col., 1992; Ito y Abé, 1999).

Con respecto a los andrógenos, se considera que la testosterona tiene un rol central en la regulación de la espermatogénesis, pero su modo de acción difiere entre las especies. En *R. arenarum* los andrógenos aumentan el tamaño testicular (Penhos, 1956) y en *Anaxyrus fowleri* estimulan la espermatogénesis pero la suprimen en diversas especies de Rana (*Euphlyctis hexadactylus*, *R. temporaria*, *P. esculentus*, *Hoplobatrachus tigerinus* y *L. pipiens*) y en *D. melanostictus* (para una revisión, ver Rastogi y Iela, 1980 y el capítulo 3 en "Hormones and Reproduction of Vertebrates", Vol. 2, por Propper, 2011). En algunas especies, como *P. perezii* y *Rana italica*, las concentraciones de testosterona son elevadas durante la época de proliferación espermatogonial pero luego disminuyen en los estadios más avanzados de la espermatogénesis

(Delgado y col., 1989; Guarino y col., 1993). Por otro lado, en las ranas desérticas *Litoria platycephala*, *Litoria maini* y *Neobatrachus sutor*, se observó que durante la estivación las variaciones en los niveles de testosterona correlacionan significativamente con las variaciones en los diámetros de los lóbulos seminíferos y con el índice gonadosomático y los autores sugieren que dicho andrógeno tendría un rol fundamental en el control de la actividad testicular (Shalan y col., 2004).

Otras hormonas que pueden participar en la regulación de la espermatogénesis son los glucocorticoides. Un aumento en las concentraciones plasmáticas de corticosterona o cortisol como consecuencia de una situación de estrés, por ejemplo, podrían afectar la espermatogénesis ya que en mamíferos elevados niveles de glucocorticoides afectan la liberación de gonadotropinas y de esteroides sexuales. En el sapo *D. melanostictus* se demostró que los tratamientos *in vivo* con corticosterona por cortos o largos períodos suprimen la espermatogénesis (Biswas y col., 2000). De modo similar, en *L. pipiens* se demostró que la administración de corticosterona durante 20 días inhibe significativamente la formación de espermátocitos II y espermátidas (Tsai y col., 2003). En este último caso se observó también que la 5 α -DHT reduce la cantidad de espermátogonias II y de espermátidas y estimula la formación de espermátocitos I.

Estas evidencias sugieren que la espermatogénesis en anfibios es un proceso muy complejo, en el cual cada estadio celular puede ser regulado de modo distinto por diferentes esteroides y el rol de los distintos participantes puede diferir entre las distintas especies.

Efecto del estradiol sobre la espermatogénesis de anfibios

Con respecto al control que ejercen los estrógenos sobre la fisiología testicular de anfibios, en salamandras se demostró que los estrógenos actúan tempranamente en el proceso espermatogénico y que regulan los estadios premeióticos de la espermatogénesis (Callard, 1992). En *L. catesbeianus* se observó inmunomarca de PCNA en un gran número de células primordiales

germinales (CPG) en los testículos de animales capturados durante el verano, asociado a una elevada actividad de aromatasa testicular y a una gran expresión del receptor testicular de estrógenos (Caneguim y col., 2013a). Además, se detectó inmunomarca del receptor de andrógenos durante el invierno y del receptor de estrógenos durante el verano, cuando hay elevada proliferación de espermatogonias (Caneguim y col., 2013b). De este modo, estos autores sugieren que los andrógenos y los estrógenos tienen un rol importante en el control de las espermatogonias primordiales y en las variaciones estacionales de la espermatogénesis. Estudios *in vivo* en *L. pipiens* sugieren que el E₂ puede tener un efecto tanto inhibitorio como estimulador dependiendo del estadio de la espermatogénesis, ya que el tratamiento con estrógenos durante 20 días retarda la formación de espermatogonias secundarias y espermatocitos pero acelera los estadios más tardíos (Tsai y col., 2003).

Por otra parte, el estudio de las variaciones plasmáticas de E₂ en *P. esculentus* demostró que las concentraciones son máximas durante abril y mayo, meses que corresponden al período reproductivo (Varriale y col., 1986, Fasano y col., 1989). Durante este período del año hay también una elevada actividad mitogénica y la expresión de PCNA en las espermatogonias I es máxima (Chieffi y col., 2000a). Este análisis sugiere una posible relación entre el E₂ y la proliferación de las espermatogonias. Más tarde, estudios *in vitro* demostraron que el tratamiento con E₂ estimula la mitosis de las espermatogonias (Minucci y col., 1997) y que esto sería mediante la activación de c-fos y la inducción de proteínas kinasas (Cobellis y col., 1999; Chieffi y col., 2000b). A su vez, se demostró que la inducción de la proliferación espermatogonial es inhibida por la melatonina (d' Iстриa y col., 2003). Además, se determinó que el E₂ induce la activación de Akt-1, que inactiva moléculas pro-apoptóticas tales como Bad y caspasa-9 (Stabile y col., 2006). En este trabajo se determinó también la presencia en el testículo del ERβ, cuya expresión es máxima en el período reproductivo.

De todo lo expuesto resulta evidente que el mecanismo de acción del E₂ sobre la espermatogénesis es complejo, ya que esta hormona tiene efectos inhibitorios o estimulatorios en los distintos estadios y en los diversos modelos de anfibios. Lamentablemente la mayoría de los trabajos se refiere a la relación entre el E₂ y la proliferación espermatogonial y no hay estudios acerca del efecto de E₂ sobre la apoptosis testicular en anfibios anuros.

Efecto del estradiol sobre la esteroidogénesis testicular

Por otra parte, en diversas especies se encontró una relación entre el E₂ y la actividad de algunas enzimas esteroidogénicas testiculares. En peces, particularmente en trucha, se observó que el tratamiento con E₂ disminuye la expresión de las enzimas CypP450c17, 3β-HSD/I y 11β-hidroxilasa (Govoroun y col., 2001). Con respecto a los anfibios, la exposición de adultos de *X. laevis* a E₂ durante 49 días produce una disminución significativa de los niveles plasmáticos de testosterona aunque no se determinó si es debido a una disminución en la actividad de enzimas esteroidogénicas o, por ejemplo, de las concentraciones plasmáticas de gonadotrofinas (Hecker y col., 2005a). Por otro lado, en machos de *P. esculentus*, los niveles de E₂ plasmático aumentan tempranamente en el verano y, a continuación, los niveles de testosterona plasmática disminuyen. En base a estas evidencias indirectas, los autores infieren que la caída en la concentración de andrógenos se debe a que el E₂ inhibiría la liberación de GnRH y la secreción de LH, aún cuando no poseen evidencias directas que avalen su propuesta (Polzonetti-Magni y col., 1984). Además, en esta misma especie, el tratamiento *in vitro* de testículos con E₂ durante 6 y 24 hs provocó una disminución en la producción de andrógenos (Pierantoni y col., 1986). Más tarde, otros estudios *in vitro* demostraron que el E₂ disminuye la síntesis de andrógenos mediante la inhibición de la actividad de la actividad 17-hidroxilasa del CypP450c17 testicular (Fasano y col., 1989, 1991). Además, recientemente en *P. esculentus* se estudió la relación entre las kisseptinas y el E₂. En esta especie se demostró que el receptor de kisseptinas del testículo es dependiente de E₂ y que las kisseptinas modulan la expresión del receptor testicular de estrógenos. Esto sugiere que las kisseptinas y sus

receptores podrían estar involucrados en la modulación de las funciones testiculares reguladas por E₂ (Chianese y col., 2013).

Todos estos resultados sugieren que en algunas especies de anfibios el E₂ puede regular la producción de andrógenos mediante un efecto directo sobre las enzimas esteroideogénicas testiculares o mediante la modulación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.

II. Objetivos e Hipótesis

II. Objetivos e Hipótesis

A partir de los antecedentes previamente comentados en los anuros en general y en *R. arenarum* en particular, el objetivo general de esta tesis es estudiar la relación entre los estrógenos y la fisiología testicular.

La hipótesis general de trabajo que se plantea es que en los machos de *R. arenarum* los estrógenos se sintetizan en el órgano de Bidder y que tienen un rol fundamental en la regulación de la fisiología testicular, inhibiendo la producción de andrógenos y regulando la espermatogénesis.

Para llevar a cabo el objetivo principal y poner a prueba la hipótesis de trabajo, la tesis está organizada en tres partes:

En el Capítulo I se aborda el estudio de las variaciones estacionales en las concentraciones de estradiol plasmático y la producción de esta hormona por parte del órgano de Bidder. Los objetivos específicos de esta sección son:

- Determinar las variaciones estacionales en los niveles de estradiol plasmático.
- Evaluar la capacidad del órgano de Bidder de producir estradiol a partir de sustratos endógenos.
- Estudiar la relación entre la actividad total de la enzima aromatasa del órgano de Bidder y los niveles de estradiol plasmáticos.

Teniendo en cuenta que en *R. arenarum* los testículos no producen estradiol y considerando que el órgano de Bidder posee enzimas esteroideogénicas, las hipótesis de trabajo vinculadas a estos objetivos, que se ponen a prueba en este capítulo son:

- Existen variaciones estacionales en las concentraciones de estradiol plasmático.
- El órgano de Bidder es capaz de producir estradiol a partir de sustratos endógenos.
- Existe correlación entre las concentraciones plasmáticas de estradiol, la actividad de la enzima aromatasa y la producción de estradiol por parte del órgano de Bidder.

En el Capítulo II se estudia la localización del receptor de estrógenos en el testículo y en el órgano de Bidder así como también las variaciones estacionales en la espermatogénesis y en la proliferación celular de ambos órganos. Los objetivos específicos de esta parte son:

- Determinar la presencia del receptor de estrógenos en el testículo y en el órgano de Bidder.
- Estudiar las variaciones estacionales en la apoptosis testicular.
- Identificar cuáles son los tipos celulares que sufren apoptosis.
- Analizar las variaciones estacionales en la proliferación de las espermatogonias.
- Analizar las variaciones estacionales en la proliferación de las células foliculares de los folículos bidderianos.

Las hipótesis de trabajo vinculadas a estos objetivos y que se ponen a prueba en esta tesis son:

- Tanto el testículo como el órgano de Bidder expresan el receptor de estrógenos.
- La apoptosis en el testículo, a lo largo del año, ocurre principalmente en los estadios más avanzados de la espermatogénesis y no en los estadios tempranos.

- La apoptosis testicular y la proliferación de las espermatogonias son mayores en el período con máximos niveles de estradiol plasmático.
- La proliferación de las células foliculares en el órgano de Bidder es mayor cuando los niveles de estradiol plasmático aumentan.

En el Capítulo III se aborda el estudio del efecto de estradiol sobre algunos aspectos de la fisiología testicular. Los objetivos específicos de esta parte son:

- Evaluar el efecto de estradiol sobre la actividad enzimática y la expresión de la proteína CypP450c17.
- Analizar el efecto de estradiol sobre la actividad de la enzima 3 β HSD/I.
- Determinar el efecto de estradiol sobre la apoptosis testicular.
- Estudiar el efecto de estradiol sobre la proliferación de la línea germinal.

Las hipótesis de trabajo vinculadas a estos objetivos y que se ponen a prueba en esta tesis son:

- El estradiol regula negativamente la esteroidogénesis testicular al inhibir la actividad de las enzimas esteroidogénicas.
- El estradiol regula la espermatogénesis, estimulando la apoptosis y promoviendo la proliferación espermatogonial.

III. Capítulo 1

El órgano de Bidder y la producción de estradiol.

III. El órgano de Bidder y la producción de estradiol

Materiales y Métodos

Animales

Para llevar a cabo los experimentos se emplearon 70 sapos machos adultos de la especie *R. arenarum*. Los individuos fueron recolectados en zonas no agrícolas de la Provincia de Buenos Aires a lo largo del año. La madurez sexual de los individuos se corroboró observando el tamaño y las características típicas de los machos adultos como el canto y la presencia del callo nupcial. Los animales se mantuvieron en un predio con vasta vegetación y libre acceso a agua en el Bioterio de Animales No Tradicionales de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires en condiciones naturales de luz y temperatura. Se los alimentó con grillos y zofobas (*Zophobas morio*) (Hadfield y col., 2006). El día anterior a cada experimento se los trasladó al laboratorio, donde se los acondicionó en un cubil a temperatura ambiente y libre acceso a agua. Todos los ensayos se realizaron durante los períodos pre reproductivo (PreR, mayo a agosto), reproductivo (R, septiembre a diciembre) y post reproductivo (PostR, enero a abril) (Denari y Ceballos, 2006) de los años comprendidos entre el 2010 y el 2012.

Los individuos fueron anestesiados por inmersión en 1% de solución acuosa de tricaina metano sulfonato (MSS, Sigma-Aldrich, EEUU) neutralizada con bicarbonato de sodio de acuerdo con Gentz (2007) y su muerte fue consecuencia de los procedimientos quirúrgicos. Los experimentos se realizaron siempre en el mismo horario del día, entre las 10 am y las 12 am, con el objetivo de excluir la posible variabilidad en los resultados debido a los cambios circadianos en la producción de hormonas. Este protocolo está en concordancia con los principios establecidos en "Guiding Principles for the Care and Use of Research Animals promulgated by the Society of the Study of Reproduction" y cuenta con la aprobación de la "Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" (Protocolo N° 21), Facultad de

Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Obtención y procesamiento de plasma y tejidos

De todos los individuos utilizados se extrajeron rápidamente los BO por disección ventral, se pesaron y se procesaron de acuerdo con las características de cada protocolo, tal como se detalla más adelante. En todos los casos se extrajeron también los testículos, que fueron pesados con el objetivo de realizar los análisis que se detallan más adelante. Además, de cada ejemplar se extrajo aproximadamente 1 ml de sangre por punción cardíaca utilizando jeringas heparinizadas y se la centrifugó a 4°C en tubos heparinizados a 3500 rpm durante diez minutos para la obtención de plasma. Para determinar los niveles circulantes de testosterona y estradiol (E₂), se trataron alícuotas de 10 o 20 µl de plasma durante toda la noche con diez veces el volumen de metanol con el objetivo de precipitar las proteínas. Luego de evaporar el metanol las muestras se resuspendieron en el buffer RIA correspondiente a la determinación de cada hormona.

Tratamientos de los órganos de Bidder

Con el objetivo de analizar la producción de E₂ *in vitro* por parte de los BO obtenidos durante todo el año, se incubaron individualmente en 1 ml de medio Krebs-Ringer-Glucosa-Hepes (KRGH) en placas multipocillo durante 2 hs a 28°C en agitación. Para ello se emplearon órganos de 47 animales de distintos períodos (16 animales del período PreR, 17 del R y 14 correspondientes al PostR). Al cabo de las 2 hs se retiraron los medios de incubación y se almacenaron a -20°C. Se emplearon alícuotas de 200 µl de estos medios para determinar mediante radioinmunoensayo (RIA) la cantidad de E₂ producido.

Cuantificación de hormonas mediante radioinmunoensayo (RIA)

RIA de E₂

Las muestras se resuspendieron en 750 µl de Buffer RIA E₂, pH 7,4. La cuantificación de E₂ plasmático se llevó a cabo mediante radioinmunoensayo, utilizando el marcador radioactivo [2,4,6,7-³H]-E₂ (70,0 Ci/mmol; Perkin-Elmer Life Science, MA, USA) y un anticuerpo policlonal anti-E₂ preparado en oveja (Universidad de Colorado, CO, USA). Dicho anticuerpo presenta una muy baja reactividad cruzada (< 1%) con estrona, progesterona, 17-hidroxiprogesterona y 5α-pregnan-3-20 diona, y niveles de reacción cruzada menores al 0,01% con testosterona y 5α-dihidrotestosterona. La dilución final del anticuerpo anti-E₂ fue de 1:250.000. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron, respectivamente, de 6,7% y 11,5%. Los límites de sensibilidad del ensayo estuvieron entre 0,625 y 80 pg.

La curva de calibración se obtuvo incubando en buffer RIA concentraciones crecientes de E₂ frío (6,25 y 800 pg/ml) con una cantidad fija de E₂-H³ (4,54 nCi) y del anticuerpo. La radioactividad total se calculó incubando el marcador radioactivo (E₂-H³) en ausencia del anticuerpo y de carbón-dextrano. La unión inespecífica se determinó incubando el radioisótopo en ausencia de anticuerpo. El unido máximo se calculó en presencia de E₂-H³ y anticuerpo, en ausencia de masa radioinerte. Todos los puntos de la curva, así como los tres parámetros mencionados, se realizaron por triplicado. Luego de 20-22 hs a 4°C, la reacción se detuvo con el agregado de 300 µl de carbón:dextrano (0,5:0,05% en PBS). A continuación, los tubos se dejaron en reposo durante 20 minutos y luego se los centrifugó durante 10 minutos a 3500 rpm a 4°C. El pellet de carbón-dextrano contiene los esteroides libres mientras que en el sobrenadante se encuentra el complejo anticuerpo-esteroide. Se midió la radioactividad presente en una alícuota de 400 µl del sobrenadante usando líquido de centelleo OptiPhase-Hi ´safe 3´ (Wallac Co., Turku, Finlandia) y un contador de centelleo líquido 1409 DSE de Wallac con corrección automática de "quenching" en cada muestra.

Una vez obtenidos los valores de E_2 -H³ unido, se calculó la concentración plasmática de E_2 mediante la curva de calibración obtenida en el mismo ensayo. Los resultados fueron expresados como pmoles de E_2 por ml de plasma.

RIA testosterona

Las muestras se resuspendieron en 500 μ l de Buffer RIA Testosterona, pH 7,4. La cuantificación de esta hormona se llevó a cabo de manera semejante a lo descrito hasta aquí. Se utilizó el marcador radioactivo [1,2,6,7-³H]-testosterona (80,4 μ Ci/mmol; Perkin-Elmer Life Science, MA, USA) y un anticuerpo policlonal anti-testosterona preparado en oveja (Universidad de Colorado, Colorado, USA). Este anticuerpo se utilizó en una dilución final de 1:125000 y posee una reacción cruzada del 6,8% con 5 α -dihidrotestosterona. La curva de calibración abarcó un rango de concentraciones entre 60 y 3840 pg/ml. El esteroide radioinerte y el radioactivo se prepararon en buffer RIA Testosterona. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 8,2% y 9,5%, respectivamente. La curva de calibración se obtuvo incubando en buffer RIA concentraciones crecientes de testosterona radioinerte (10 y 1000 pg/ml) con una cantidad fija de testosterona-H³ (4,54 nCi) y del anticuerpo. Los niveles de testosterona circulante fueron expresados como pmoles de testosterona por ml de plasma.

Medición de la actividad de la enzima aromatasa

Además de analizar si el BO es capaz de sintetizar E_2 a partir de sustratos endógenos, se midió la actividad de la enzima aromatasa en condiciones de saturación de sustrato. Para ello, ambos órganos de cada animal se pesaron y homogeneizaron en forma conjunta, en frío, en buffer aromatasa en una proporción de 500 μ l de buffer por cada 30 mg de tejido. Se analizó un total de 23 animales (PreR: n=12; R: n=7, PostR: n=4). La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Bradford (1976).

La determinación de la actividad de la enzima aromatasa se realizó incubando 200 μg de proteínas durante 30 minutos a 28°C. Se utilizó un volumen final de 1 ml de buffer aromatasa con 5 μM de testosterona- H^3 y un sistema regenerante de cofactor que contiene NADPH (0,25 mM), NADP^+ (0,25 mM), glucosa-6-fosfato (5 mM) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (1 UI/ml) (Fernández Solari y col., 2002). Cada determinación se realizó por duplicado o triplicado, dependiendo de la cantidad de proteínas totales obtenidas en cada caso. La reacción se detuvo colocando los tubos en hielo y agregando 2 ml de diclorometano (Cl_2CH_2). Los esteroides se extrajeron y evaporaron tres veces con el mismo solvente y la fase orgánica se transfirió a tubos de hemólisis y se evaporó a sequedad a 37°C. Los residuos obtenidos se resuspendieron en 50 μl de Cl_2CH_2 .

Separación y cuantificación de sustrato y producto

Con el objetivo de cuantificar el E_2 producido durante la incubación, las hormonas fueron separadas mediante cromatografía en capa delgada (TLC), empleando placas de sílica gel GF₂₅₄ (Merck). Antes de sembrar las muestras, se sembraron los estándares radioinertes de E_2 (15 μg) y testosterona (3 μg). Cabe destacar que la cantidad sembrada en cada caso fue determinada en estudios preliminares llevados a cabo para cada esteroide. El sistema de solventes empleado fue Cl_2CH_2 :acetona (75:5, v/v). Una vez concluida la cromatografía, la posición de los estándares se determinó utilizando luz de longitud de onda apropiada según las características propias de los grupos funcionales en cada caso. La testosterona se visualizó por incidencia de luz con una longitud de onda de 254 nm, mientras que el E_2 se visualizó con 365 nm luego de rociar las placas con una solución de primulina (Wright, 1971). Las áreas correspondientes a cada estándar fueron raspadas y se determinó la radioactividad asociada a cada una de ellas utilizando el líquido de centelleo y el contador de centelleo líquido ya descritos. De este modo, mediante la radioactividad asociada al estándar de E_2 se determinó la producción de E_2 . La actividad total de la enzima aromatasa de ambos BOs de cada animal se expresó como pmoles de producto por minuto.

Análisis estadístico de los resultados

Las concentraciones de hormonas se expresaron como las medias \pm EE. Los datos correspondientes a las variaciones estacionales en el E₂ plasmático y en la producción de E₂ se transformaron mediante log₁₀, ya que no cumplían el supuesto de homocedasticidad. Los valores se analizaron y compararon mediante ANOVA de un factor y un contraste *a posteriori* mediante Tukey (Steel y Torrie, 1980). Las variaciones estacionales en la actividad de la enzima aromatasa se analizaron mediante contrastes *a priori*. Los datos también se analizaron mediante la Correlación de Pearson, con el objetivo de estudiar la relación entre las siguientes variables: la actividad total de aromatasa y los valores de E₂ plasmático, los pesos totales de los BO y los valores de E₂ plasmático, la actividad total de la enzima aromatasa y los pesos totales de los BO, y los valores de E₂ plasmático y el E₂ producido en el medio. Para este análisis, los datos fueron normalizados mediante la transformación log₁₀. Se optó por analizar los datos mediante Correlación de Pearson ya que permite evaluar la relación lineal entre dos variables continuas para determinar la covarianza entre ambas variables. Para analizar la potencia de las correlaciones se utilizó en todos los casos un $p \leq 0,05$.

Medios de incubación y soluciones buffer utilizadas

Buffer para radioinmunoensayo (RIA) de E₂: Buffer fosfato salino 10 mM (PBS), gelatina, 0,1 % p/v, NaCl 140 mM, azida sódica 0,1 % p/v, pH 7,4.

Buffer para radioinmunoensayo (RIA) de testosterona: Buffer fosfato salino 10 mM (PBS), gelatina, 0,1 % p/v, NaCl 140 mM, azida sódica 0,1 % p/v, EDTA 20 mM, pH 7,4.

Medio Krebs Ringer Glucosa Hepes (KRGH): NaCl 0,9 %, KCl 1,15 %, Cl₂Ca 1,22 %, H₂KPO₄ 2,11 %, MgSO₄.7H₂O 3,8 %, Glucosa 0,3 M, Hepes 0,026 M, pH 7,4.

Buffer para actividad de la enzima aromatasa: Buffer fosfato de sodio 50 mM, EDTA 0,1 mM, MgCl₂ 3 mM, pH 7,4.

Solución de primulina: Primulina 0,1 % en acetona:agua, 80:20, v/v.

Resultados

Variaciones estacionales en las concentraciones de esteroides sexuales

Como se mencionó en la *Introducción*, las variaciones estacionales en las concentraciones plasmáticas de E₂ fueron descritas en algunas especies de anfibios, la mayoría pertenecientes a la familia Ranidae. La información existente en otras familias, como los bufónidos en general y *R. arenarum* en particular, es prácticamente inexistente. Es por ello que se determinaron las concentraciones plasmáticas de E₂ y de testosterona en animales capturados durante los períodos PreR, R y PostR. La Figura 6 muestra que las concentraciones mínimas de E₂ se observan en los animales recolectados en junio (205 ± 41 pg/ml) y que los niveles plasmáticos aumentan gradualmente en animales capturados durante los siguientes meses, hasta alcanzar valores máximos en abril (1291 ± 188 pg/ml). Por otra parte, las menores concentraciones de andrógenos plasmáticos se observaron en animales correspondientes a los meses de octubre, noviembre y diciembre (3,6 ± 0,6 ng/ml; 2,9 ± 0,6 ng/ml; 3,6 ± 0,4 ng/ml), con un incremento sostenido durante los meses siguientes, alcanzando valores máximos en agosto (44,1 ± 3,8 ng/ml, Figura 6).

Al analizar estadísticamente el patrón estacional de las concentraciones plasmáticas de E₂, se observó que las concentraciones de esta hormona son significativamente menores durante el período PreR (mayo-agosto) que durante los períodos R (septiembre-diciembre) y PostR (enero-abril) (PreR: 414 ± 43; R: 727 ± 77; PostR: 1039 ± 117 pg/ml, $p < 0,0001$, Figura 7). Es decir que el patrón anual en los niveles de E₂ plasmático parece ser opuesto al de testosterona, ya que los niveles de E₂ comienzan a aumentar durante el período R, cuando los niveles de andrógenos disminuyen marcadamente. Sin embargo, durante el período PostR se observa un aumento aun mayor de E₂ que no está relacionado con una disminución más marcada de testosterona, sugiriendo que el patrón anual de ambas hormonas no es exactamente opuesto.

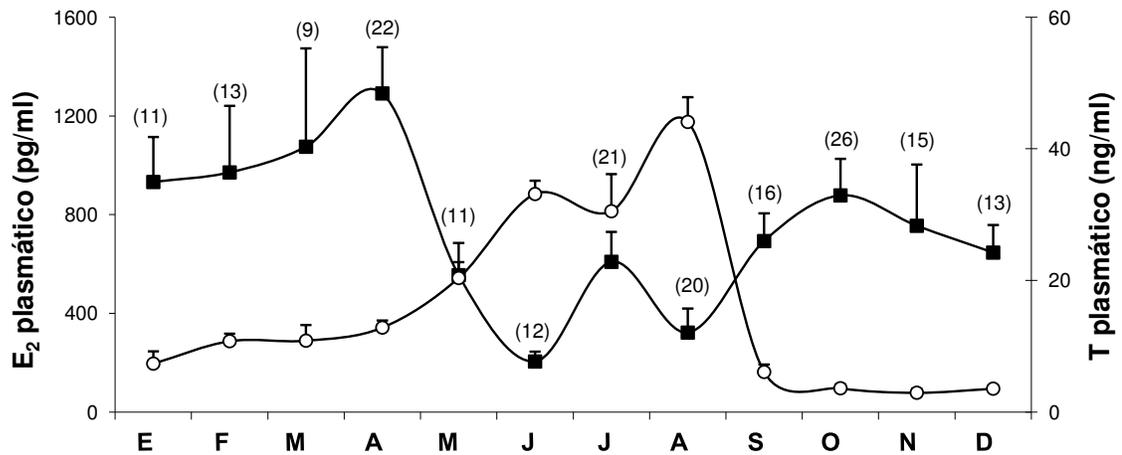


Figura 6. Variaciones anuales en las concentraciones de estradiol (E₂ ■) y de testosterona (T○) plasmáticos. El número de individuos colectados en cada mes está indicado entre paréntesis. Los valores de E₂ plasmático están expresados en pg de hormona por ml de plasma mientras que los de T están expresados en ng de hormona por ml de plasma. Cada punto de la curva representa la media ± EE.

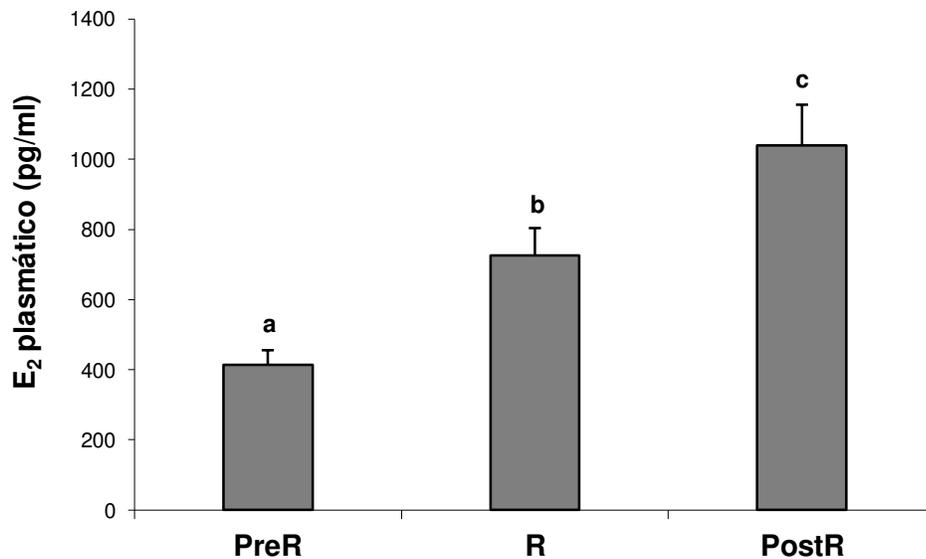


Figura 7. Concentración de E₂ plasmático en sapos colectados durante los períodos pre-reproductivo (PreR, n=64), reproductivo (R, n=70), y post-reproductivo (PostR, n=55). Los valores están expresados como la media ± EE. Las letras distintas indican diferencias significativas, con un p < 0,0001.

Actividad de aromataasa en el órgano de Bidder y síntesis de E₂

Dado que el BO expresa varias enzimas esteroideogénicas, entre las cuales se encuentran CypP450scc, 3 β -HSD/I, CypP450c17 y aromataasa, y con el objetivo de analizar la capacidad del BO de sintetizar E₂ a partir de sustratos endógenos, se incubaron los órganos en medio KRGH y se analizó la producción de E₂ mediante RIA. Los datos se expresaron como la cantidad total de E₂ producida por ambos BO de cada animal y no como producción de E₂ por mg de BO, enfatizando así la importancia del aporte total de ambos BO a la fisiología de cada animal. Como muestra la Figura 8, la producción de E₂ fue significativamente menor en los BO de los animales del período R mientras que la producción máxima se observó durante el PostR (PreR: 2539 \pm 240; R: 956 \pm 152; PostR: 5306 \pm 734 pg/ml, $p < 0,0001$). Sin embargo, en el período R la concentración plasmática de E₂ es mayor que durante el período PreR, lo cual no se observa cuando se analiza la producción de la hormona por los BO *in vitro* (comparar Figuras 7 y 8). Estos resultados demuestran que el BO es capaz de sintetizar E₂ a partir de sustratos endógenos durante todo el año pero no descartan que haya otra fuente de E₂ que podría aportar hormona a la circulación.

Teniendo en cuenta que los testículos de esta especie no producen E₂ y que el BO es capaz de sintetizar E₂ a partir de sustratos endógenos, el siguiente objetivo fue estudiar en qué grado este órgano contribuye a alcanzar los niveles circulantes de E₂. Para ello, se estudió si existe paralelismo entre la producción total de E₂ *in vitro* y los niveles plasmáticos de E₂ y se analizaron ambos valores de cada animal mediante la Correlación de Pearson. El análisis estadístico indica que existe una correlación significativa y positiva entre la producción total de E₂ por parte de los BO y los niveles de E₂ plasmático (Figura 9, $r = 0,54$; $p = 0,0016$). Estos resultados sugieren que la producción de E₂ por parte de los BO constituye un aporte significativo a los niveles circulantes de esta hormona.

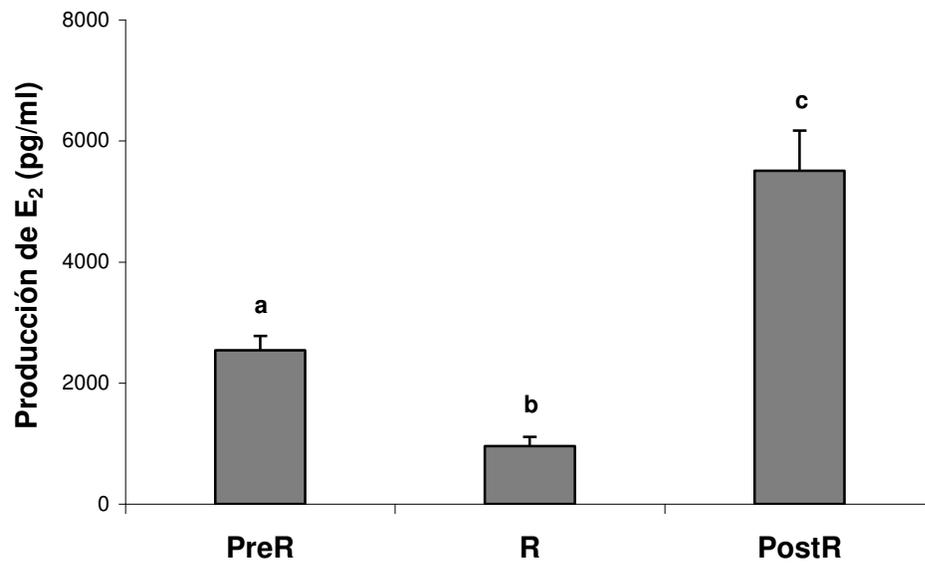


Figura 8. Producción *in vitro* de E₂ por los BOs de animales recolectados durante los períodos PreR (n= 16), R (n= 17) y PostR (n= 14). Los valores indican la cantidad total de E₂ producida durante 2hs, por ambos órganos de cada animal. Los valores están expresados como la media ± EE. Las letras distintas indican diferencias significativas, con un $p < 0,0001$.

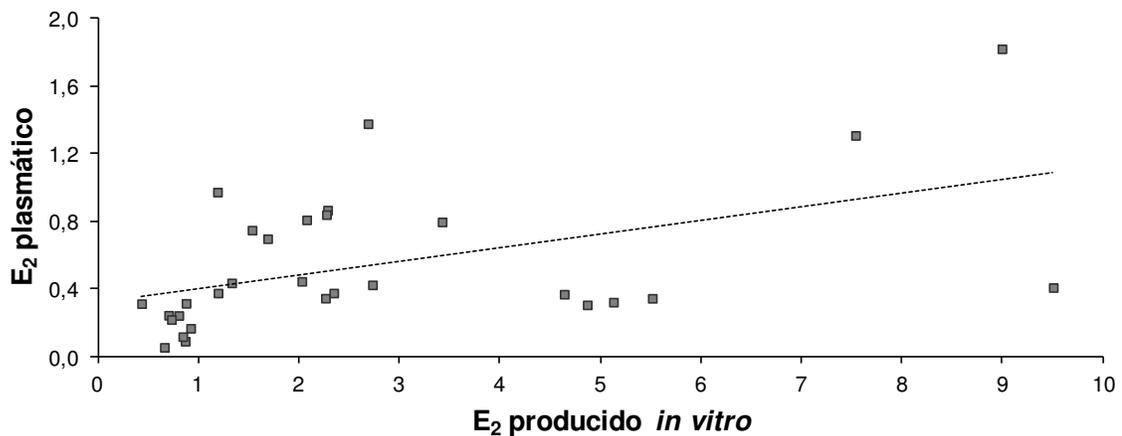


Figura 9. Correlación entre el E₂ plasmático y el E₂ total producido por ambos BOs de 29 individuos recolectados durante todo el año. Los niveles de E₂ están expresados como ng de hormona por ml de plasma o medio. El análisis de Correlación de Pearson se realizó teniendo en cuenta los valores transformados con \log_{10} . $r = 0,54$; $p = 0,0016$.

Además, se analizó si ambos BO de cada animal tienen la misma capacidad esteroidogénica. Para ello, la cantidad de E_2 sintetizada por cada BO del mismo animal se expresó como pg de E_2 producido por BO. La variabilidad de estos resultados se muestra en la Tabla 1, donde puede observarse que en algunos casos dos BO con pesos similares pueden producir cantidades similares de E_2 mientras que en otros la producción de E_2 en ambos órganos varía ampliamente. Cabe destacar también que en todos los animales que poseen BO de distinto peso, la producción de E_2 difiere en ambos órganos. En la Tabla 1 se informan los datos de nueve animales representantes de los períodos PreR, R y PostR y pueden distinguirse tres categorías: animales con ambos BO de similar peso y producción de E_2 , animales con ambos BO de similar peso pero distinta producción de E_2 y animales con BO de distinto peso y con distinta producción de E_2 . Para cada categoría, los animales se eligieron al azar. Estos resultados indican que algunos BO de menor peso tienen mayor capacidad para producir E_2 que otros órganos de mayor peso y, además, que la producción de E_2 de un BO mayor no necesariamente compensa la baja producción de E_2 de un BO menor. Estos resultados sugieren que el peso de los órganos no es un factor determinante en la producción de E_2 . Este aspecto se discutirá más adelante.

Sapo n°	Período	BO	Peso BO	Índice BO/Testículo	E ₂
1	PreR	Der	15	0,07	1581,0
		Izq	18	0,08	1855,8
2	PreR	Der	2	0,01	1175,0
		Izq	6	0,02	2201,4
3	PreR	Der	17	0,12	2191,3
		Izq	6	0,03	1233,0
4	R	Der	9	0,09	360,9
		Izq	8	0,06	342,4
5	R	Der	12	0,05	512,4
		Izq	14	0,05	218,4
6	R	Der	28	0,16	585,2
		Izq	5	0,04	291,0
7	PostR	Der	6	0,04	2782,2
		Izq	6	0,04	2734,8
8	PostR	Der	3	0,03	4874,4
		Izq	6	0,04	1954,8
	PostR	Der	8	0,04	3587,2
		Izq	14	0,06	1542,8

Tabla 1. Animales colectados durante los períodos PreR, R y PostR. Der: corresponde al órgano derecho. Izq: corresponde al órgano izquierdo. Los sapos n° 1, 4 y 7 poseen ambos BO con peso similar y producen similar cantidad de E₂, mientras que los sapos n° 2, 5 y 8 poseen ambos BO similares pero tienen diferente producción de E₂. En los sapos n° 3, 6 y 9, ambos BO tienen pesos distintos y también distinta producción de E₂. El peso de los BOs está expresado en mg y la producción de hormona se expresa como pg de E₂ por ml de medio por BO. El índice BO/Testículo corresponde a la relación de los pesos de ambos órganos.

La capacidad de los BO para sintetizar E_2 depende, al menos en parte, de la actividad de la enzima aromatasa y es por ello que se analizaron las variaciones estacionales en la actividad de la enzima aromatasa. Para esto, se comparó la actividad total de la enzima en los tres períodos utilizando contrastes *a priori*. Como ya se mencionara en la *Introducción*, diversas evidencias han llevado a sugerir que la inhibición de la oogénesis en el BO podría deberse a la presencia de un testículo funcional. Asimismo, si los andrógenos afectasen a la enzima aromatasa la comparación de la actividad enzimática del período PreR con la de los otros dos períodos podría aclarar aspectos de su regulación, sobre todo si se tiene en cuenta que en el período PreR hay elevados niveles de andrógenos plasmáticos (Canosa y Ceballos, 2002; Canosa y col., 2003; esta Tesis). Por lo tanto, al realizar contrastes ortogonales *a priori* se pone a prueba si la actividad total de aromatasa en el período PreR difiere significativamente de la actividad promedio de los períodos R y PostR (*Contraste 1*) y, además, si la actividad en el período R difiere del PostR (*Contraste 2*). Los resultados indican que la actividad total de la enzima aromatasa en el período PreR difiere significativamente del promedio de la actividad en los otros dos períodos (*Contraste 1*, $p=0,0178$). Por otra parte, el segundo contraste muestra que las actividades en los períodos R y PostR no difieren significativamente ($p=0,6835$) por lo cual es correcto promediarlos para realizar el *Contraste 1*. La Figura 10A muestra que la actividad total de la enzima aromatasa es significativamente menor durante el período PreR que durante los períodos R y PostR. Hay que tener en cuenta que aunque haya un incremento en la concentración plasmática de testosterona durante el período PostR podría no ser suficiente para evocar la inhibición de aromatasa.

Al realizar el mismo análisis estadístico con la actividad específica de la enzima aromatasa surgen ciertas diferencias. En este caso, el *Contraste 1* muestra que la actividad específica en el período PreR no difiere significativamente de las actividades de los otros dos períodos ($p=0,0597$). El segundo contraste indica que las actividades específicas en los períodos R y PostR tampoco difieren significativamente ($p=0,6415$), por lo cual es correcto

promediarlos para realizar el *Contraste 1*. Estos resultados señalan que si bien en la Figura 10 A y B se observa que tanto la actividad enzimática total como la específica son menores en el PreR, estas diferencias sólo serían significativas en el caso de la actividad enzimática total. En ambos casos, al analizar los resultados mediante un ANOVA tomando como factor fijo "Período" no se observan diferencias significativas ($p= 0,0562$ para la actividad de aromatasa total, $p= 0,1629$ para la actividad específica). Esto podría explicarse porque este último análisis posee menor potencia que los contrastes ortogonales.

En conjunto, estos resultados sugieren que la baja actividad total de la enzima aromatasa observada en el período PreR coincide con elevados niveles de andrógenos plasmáticos y constituyen una evidencia indirecta de que los andrógenos podrían tener un efecto inhibitorio sobre la actividad total de la mencionada enzima en los BOs.

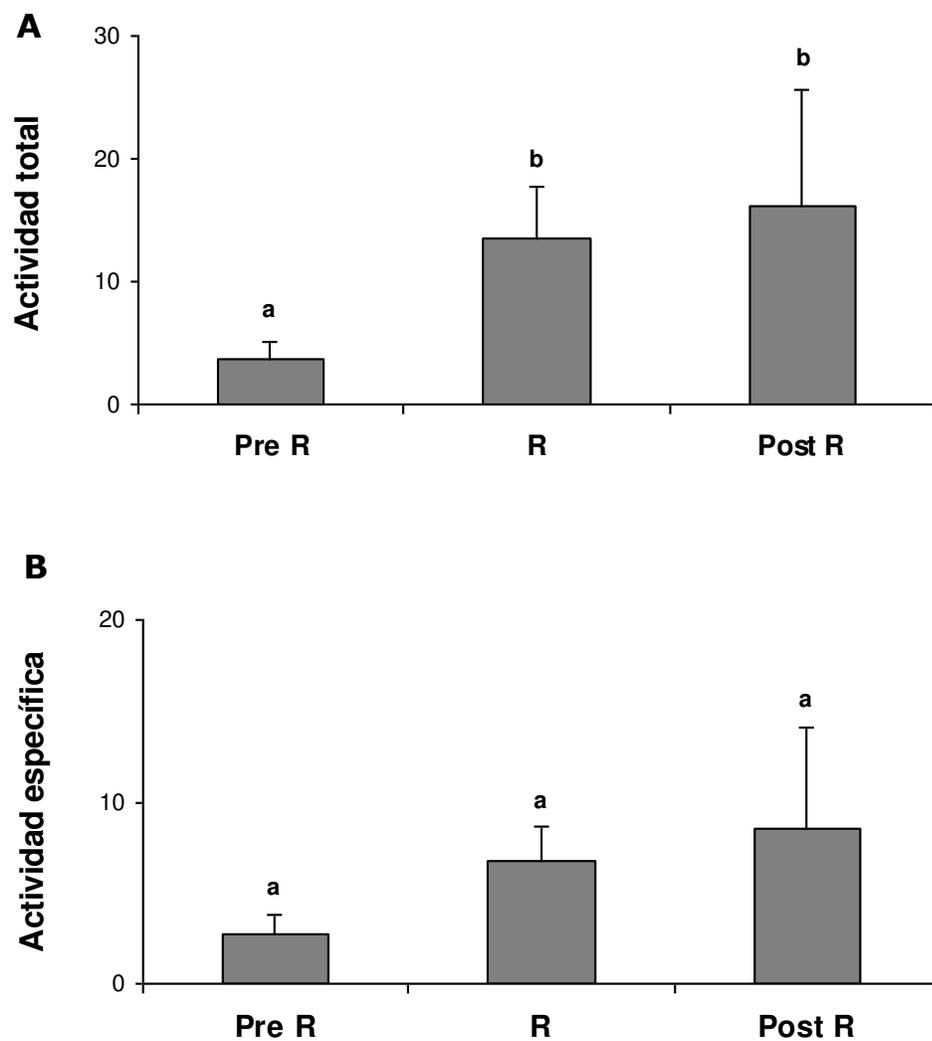


Figura 10. Actividad de la enzima aromatasa. Las determinaciones se realizaron como fuera descrito en *Materiales y Métodos*, en los períodos pre reproductivo (PreR), reproductivo (R) y post reproductivo (PostR). (A) Actividad enzimática total. La actividad enzimática está expresada como pmoles de E₂ por minuto por órgano. (B) Actividad enzimática específica. La actividad enzimática está expresada como pmoles de E₂ por minuto por mg de proteínas. Se grafica la media ± EE.

Además, estos resultados indican que tanto los niveles plasmáticos de E_2 (Figuras 6 y 7) como la actividad total de la enzima aromatasa (Figura 10) alcanzan valores mínimos durante el período PreR. Con el objetivo de estudiar el aporte que tendría la actividad de la enzima aromatasa de los BO a los niveles plasmáticos de E_2 , se analizó la existencia de un posible paralelismo entre ambas variables. Para ello, se examinaron los datos de la actividad total de la enzima en ambos BO y los valores plasmáticos de E_2 de cada animal mediante la Correlación de Pearson, observándose una correlación positiva y significativa entre ambas variables ($r= 0,5$, $p=0,04$, Figura 11). Esto indica que aquellos animales con mayor concentración plasmática de E_2 son aquellos en los cuales los BO tienen mayor actividad total de la enzima aromatasa, sugiriendo que esta actividad enzimática podría ser un aporte significativo para explicar la variabilidad en las concentraciones plasmáticas de E_2 .

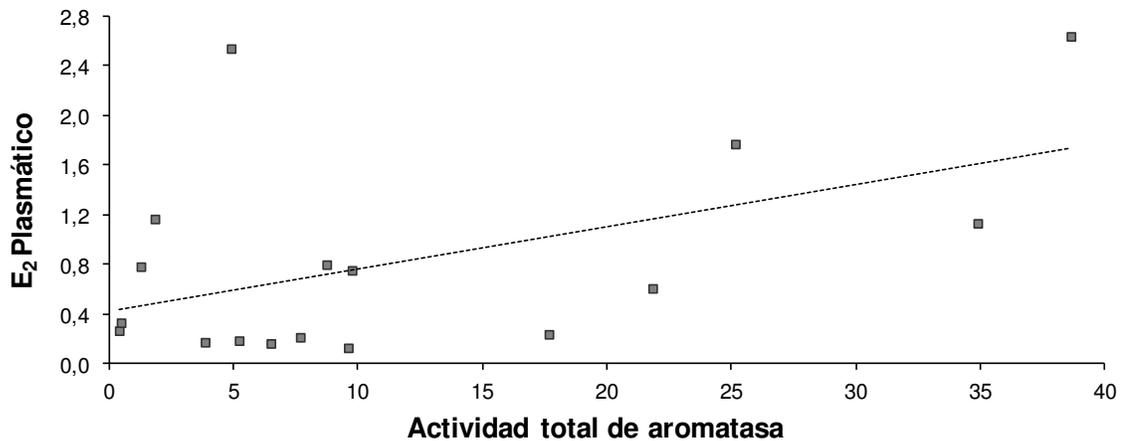


Figura 11. Correlación entre la concentración de E_2 plasmático y la actividad total de la enzima aromatasa. Los niveles de E_2 se expresan como ng de hormona por ml de plasma mientras que la actividad enzimática total se expresa como pmoles de E_2 producido por minuto. Este análisis se realizó teniendo en cuenta 17 animales. $r= 0,5$, $p= 0,04$.

Dado que, como se mencionó en la *Introducción*, el peso de los BOs es menor durante el período PreR, se analizó un posible paralelismo entre los valores plasmáticos de E₂ y los pesos de los BOs mediante la Correlación de Pearson. El análisis estadístico indicó que no existe una correlación significativa entre los niveles plasmáticos de E₂ y el peso total de los BOs de cada individuo (Tabla 2A, $r = -0,02$, $p = 0,8$). Finalmente, se evaluó también el paralelismo entre la actividad total de la enzima aromatasa y el peso total de los BOs, y se observó que en este caso tampoco existe una correlación significativa (Tabla 2B, $r = 0,09$, $p = 0,73$). Esto sugiere que el aporte de los BOs a las concentraciones plasmáticas de E₂ no está relacionado con el peso total de los órganos sino probablemente con otros factores como por ejemplo la cantidad de células foliculares en cada folículo bidderiano.

A.	Log10 E2 plasmático	Log10 Peso total BO
Log10 E2 plasmático	1,00	0,8
Log10 Peso total BO	-0,02	1,00
B.	Log10 Actividad total de Aromatasa	Log10 Peso total BO
Log10 Actividad total de Aromatasa	1,00	0,73
Log10 Peso total BO	0,09	1,00

Tabla 2. (A) Análisis de correlación entre los valores de E₂ plasmático y el peso total de los BOs de 137 individuos colectados durante el año. El peso total se calculó como la suma de los pesos del órgano derecho e izquierdo. $r = -0,02$, $p = 0,8$. (B) Análisis de correlación entre la actividad total de la enzima aromatasa y el peso total de los BOs. $r = 0,09$, $p = 0,73$. Los datos fueron transformados mediante Log10 para cumplir el supuesto de normalidad.

Discusión

Tanto los andrógenos como los estrógenos son hormonas fundamentales en la regulación de la reproducción de todos los vertebrados. En el caso de los anfibios, las variaciones plasmáticas en las concentraciones de testosterona fueron descritas en diversas especies de anuros tales como *L. catesbeianus* (Licht y col., 1983), *P. esculentus* (Varriale y col., 1986), *A. dacnicolor* (Rastogi y col., 1986), *P. perezii* (Delgado y col., 1989), *Bufo japonicus* (Itoh y col., 1990), *R. italica* (Guarino y col., 1993), *Hoplobatrachus rugulosus* (Kao y col., 1993) y *R. arenarum* (Canosa y col., 1998; Denari y Ceballos, 2005). Sin embargo, existe poca información disponible acerca de las variaciones plasmáticas en las concentraciones de E₂ en los machos de las diversas especies. En machos de *P. esculentus*, una de las pocas especies estudiadas, se observaron altos niveles de E₂ plasmático en el período PostR y esto está asociado a bajas concentraciones de andrógenos plasmáticos (Polzonetti-Magni y col., 1984). Además, la descripción de las variaciones estacionales en machos de esta especie refleja que los niveles de E₂ son máximos cuando las concentraciones de andrógenos comienzan a disminuir (Varriale y col., 1986). Sin embargo, hasta el momento no existían estudios acerca de las variaciones estacionales en los niveles de E₂ plasmático en machos de la familia Bufonidae.

Como se mencionó en la *Introducción*, los bufónidos se caracterizan por tener el BO, una estructura que ha sido históricamente comparada con un ovario no desarrollado. En *R. arenarum*, el E₂ plasmático no es de origen testicular y su origen podría ser el BO, ya que en esta especie expresa varias enzimas esteroidogénicas incluyendo la aromatasa y, consecuentemente, podría producir E₂ (Scaia y col., 2011).

El BO es un órgano muy sensible a las condiciones ambientales. En *R. marina* se observó que las anomalías encontradas en los BO parecen responder a la intensidad de la actividad desarrollada en las zonas agrícolas en donde son capturados (McCoy y col., 2008). Además, los disruptores endocrinos y el efecto que tienen sobre la reproducción de especies tradicionales y no tradicionales han cobrado gran relevancia en los últimos

años. Algunos autores proponen que ciertos agentes químicos utilizados como herbicidas o pesticidas, como por ejemplo la atrazina, tienen un efecto estrogénico en diversas especies de anfibios, ya que aumentan la actividad de la enzima aromatasa y provocan la feminización de los machos (Hayes y col., 2002; Fan y col., 2007; Hayes y col., 2010). A pesar de que estos estudios tienen resultados contundentes, otros investigadores sostienen firmemente que estos agentes no afectan la actividad de la enzima aromatasa (Hecker y col., 2004, 2005 b; Coady y col., 2005). En este contexto, resulta fundamental estudiar la producción de E_2 y la actividad de esta enzima por parte del BO, así como también el efecto que tienen los estrógenos sobre la función gonadal en diversas especies de anfibios, entre ellas los miembros de la familia Bufonidae como *R. arenarum*.

Los resultados expuestos en este capítulo profundizan el estudio de las variaciones estacionales de los estrógenos plasmáticos en machos de *R. arenarum* así como también su producción por parte del BO. Como se muestra en las Figuras 6 y 7, las concentraciones plasmáticas de E_2 son menores en el período PreR, cuando las concentraciones de andrógenos plasmáticos son máximas. Los niveles de E_2 aumentan gradualmente durante el período R y alcanzan valores máximos en el PostR, de manera similar a lo que ocurre en *P. esculentus*. Además, las variaciones estacionales descritas en este capítulo son similares al patrón estacional descrito en hembras de esta misma especie, en las cuales los niveles de E_2 también son mínimos durante el período PreR y aumentan gradualmente durante los meses siguientes (Medina y col., 2004). Sin embargo, el patrón estacional en ambos sexos se diferencia en el mes en el cual las concentraciones de E_2 son máximas ya que en los machos esto ocurre hacia finales del período PostR mientras que en hembras esto ocurre hacia finales del período R y comienzos del PostR.

Con respecto al origen del E_2 , en *P. esculentus* se propuso que el E_2 plasmático se sintetiza en el testículo (Varriale y col., 1986; Fasano y col., 1989). Sin embargo, como ya se mencionó, en *R. arenarum* esto no ocurre debido a que en esta especie los testículos no expresan la enzima aromatasa y

en ningún estudio de biosíntesis, utilizando diversos precursores radioactivos, fue posible aislar E₂ como producto testicular (Canosa y col., 1998; Canosa y Ceballos, 2001). En individuos bidderiectomizados de *D. melanostictus*, la función testicular se ve afectada, lo cual se revierte luego de la administración de E₂, sugiriendo que los estrógenos podrían tener su origen en el BO (Ghosh, 1991). Además, el BO de *R. arenarum* expresa las enzimas esteroideogénicas necesarias para la síntesis de E₂, entre ellas Cyp450scc, 3β-HSD/1, CypP450c17 y aromatasa, sugiriendo que este órgano es una de las fuentes de E₂ (Scaia y col., 2011). La presencia de enzimas esteroideogénicas en el BO ha sido también registrada en otras especies, como *D. melanostictus*, *A. woodhousii* y *Bufo bufo* (Colombo y Colombo Belvedere, 1980; Ghosh y col., 1984; Pancak-Roessler y Norris, 1991). Sin embargo, en ninguno de los trabajos se demostró si dicho órgano es capaz de producir E₂ a partir del colesterol o si, por el contrario, la enzima aromatasa utiliza sustratos producidos por el testículo, como los andrógenos aromatizables androstenediona y testosterona. La Figura 8 muestra que en *R. arenarum* los BO son capaces de producir E₂ a partir de sustratos endógenos durante todo el año. Además, se encontró una correlación significativa y positiva entre los niveles de E₂ producido *in vitro* por ambos BO y las concentraciones plasmáticas de E₂ de cada individuo (Figura 9). Estos resultados sugieren no solo que el BO es capaz de sintetizar E₂ a partir de sustratos endógenos sino que además la producción de E₂ sería un gran aporte a las concentraciones plasmáticas de esta hormona. Sin embargo, no se puede descartar que la aromatasa bidderiana utilice también andrógenos aromatizables producidos por el testículo.

Con respecto a la regulación del BO, algunos autores propusieron que la oogénesis en este órgano es inhibida por algún producto testicular (Deb and Chatterjee, 1963; Calisi, 2005). Por otra parte, en *A. woodhousii* la administración de hCG exógena no estimula el desarrollo del BO, sugiriendo que la inhibición de la oogénesis en este órgano no se debe a una "competencia" con el testículo por las gonadotrofinas ni a una falta de gonadotrofinas circulantes sino que podría estar relacionada con la inhibición

ejercida por alguno de los productos del testículo (Pancak-Roessler y Norris, 1991). Sin embargo, las conclusiones de Pancak-Roessler y Norris (1991) sólo pueden ser aplicadas a hCG ya que no utilizaron ni LH ni FSH, la gonadotropina que sería candidata a regular el crecimiento del BO. En *A. woodhousii*, el volumen del BO es mayor en aquellos animales que se encuentran en el período no reproductivo en comparación con aquellos de animales de la estación reproductiva. De manera opuesta, como se mencionó en la *Introducción*, en los machos de *R. arenarum* el ciclo anual del BO está caracterizado por la proliferación en la primavera, e hipertrofia y degeneración durante los meses de otoño e invierno (Echeverría, 1990). Además, los pesos de los BO son menores durante el período PreR y mayores en el R (Scaia y col., 2011). La diferencia observada en el ciclo anual del BO puede ser debida a que *A. woodhousii* es una especie con patrón reproductivo asociado a andrógenos mientras que *R. arenarum* tiene un patrón reproductivo disociado de andrógenos. Como ya se explicó anteriormente, el patrón reproductivo disociado en *R. arenarum* implica que las concentraciones de andrógenos son bajas en la estación en la que se produce el apareamiento y la espermiación (Canosa y Ceballos 2002; Fernández Solari y col., 2002; Canosa y col., 2003; Denari y Ceballos 2005). De este modo, tanto en *A. woodhousii* como en *R. arenarum*, los elevados niveles de testosterona coincidirían con una degeneración o reducción del BO, sugiriendo que los andrógenos de origen testicular podrían regular el desarrollo del BO.

El hecho de que el BO en *R. arenarum* exprese la enzima aromatasa y sea capaz de producir E_2 a partir de sustratos endógenos durante todo el año, lleva a plantearse si existen variaciones estacionales en la actividad de la enzima aromatasa que expliquen las variaciones estacionales en los niveles plasmáticos de E_2 . Como se mostró en la Figura 10A, la actividad total de la enzima aromatasa de los BO es menor durante el período PreR que durante el R y el PostR, lo cual sugiere una relación opuesta entre los niveles plasmáticos de andrógenos y la actividad total de la enzima. Sin embargo, dado que no se encontraron variaciones estacionales significativas en la actividad específica de la enzima aromatasa (Figura 10B), los valores mínimos de la actividad

enzimática total durante el período PreR podrían explicarse debido a que los órganos son de menor tamaño durante este período. Teniendo en cuenta que las altas concentraciones plasmáticas de andrógenos durante el período PreR coinciden con BO de menor tamaño y con bajas actividades enzimáticas totales, se podría sugerir que en los machos de *R. arenarum* los andrógenos inhiben la producción de E₂ probablemente regulando el crecimiento del órgano y no específicamente la expresión de aromatasa. Sin embargo, el tratamiento de BO *in vitro* con 5 α -DHT provoca una disminución de la actividad de la enzima aromatasa (Tesis de Licenciatura, Lic. M. F. Scaia). Estos resultados preliminares pueden servir como antecedentes para investigaciones futuras acerca del rol de los andrógenos en la regulación del crecimiento del BO.

Los resultados expuestos en este capítulo también reflejan un marcado paralelismo entre los valores plasmáticos de E₂ y la actividad de aromatasa del BO. Como muestran las Figuras 7 y 10A, tanto las concentraciones plasmáticas de E₂ como la actividad total de aromatasa son mínimas durante el período PreR. Se observó también una correlación significativa y positiva entre ambas variables (Figura 11), sugiriendo que en los sapos machos el BO es una de las principales fuentes de E₂ plasmático. Sin embargo, al no haber una correlación significativa entre la actividad total de la enzima aromatasa y el peso de los órganos, ni tampoco entre los niveles plasmáticos de E₂ y el peso de los BO, se podría pensar que la contribución de este órgano al E₂ en circulación no estaría relacionada con el peso de los órganos sino, por ejemplo, con la cantidad de folículos y/o la cantidad de células foliculares en cada folículo bidderiano.

A partir de estos resultados, cabe destacar que si bien el BO en esta especie podría ser una de las principales fuentes de E₂ plasmático y que la actividad total de la enzima aromatasa en este órgano tendría un rol central en la producción de E₂, la regulación de la expresión de StAR (*Steroidogenic Acute Regulator*), de los receptores de gonadotrofinas y de otras enzimas esteroideogénicas tales como Cyp450scc, 3 β -HSD/I y CypP450c17, podría también estar involucrada en las variaciones estacionales del E₂. Además, otros órganos podrían contribuir a la producción de E₂ plasmático, aunque en esta

especie ni el hígado ni los cuerpos grasos, uno de los principales candidatos, producen estrógenos (Tesis de Licenciatura de M. F. Scaia).

Ahora bien, surge la siguiente pregunta: ¿Cuál es la importancia de estudiar las variaciones estacionales en los niveles de E_2 plasmático en el contexto de la fisiología reproductiva de los machos de anfibios? Los andrógenos juegan un rol fundamental en la regulación testicular de algunas especies de anuros de zonas templadas, en las cuales los máximos niveles de testosterona encontrados durante el invierno están asociados a la formación de espermátidas mientras que las bajas concentraciones correspondientes al verano están asociadas a los estadios tempranos de la espermatogénesis (desde espermatogonias I a espermátocitos II, Rastogi y col., 1976; Rastogi y Iela, 1980; Delgado y col., 1989; Guarino y col., 1993; Pierantoni y col., 2002). En *R. arenarum* las concentraciones de testosterona también son máximas durante el invierno y están asociadas a los estadios tardíos de la espermatogénesis (Burgos y Mancini, 1948). Sin embargo, como se mencionó en la *Introducción*, la espermatogénesis es un proceso que está regulado por diversas hormonas y en el caso de los anuros tanto las gonadotrofinas como el E_2 regulan la proliferación de las espermatogonias (Minucci y col., 1986; Di Matteo y col., 1988; Cobellis y col., 1999). En *R. arenarum* la mayor cantidad de espermatogonias se observa durante el período PostR (Burgos y Mancini, 1948) y los resultados expuestos en este capítulo sugieren que esto coincide con las máximas concentraciones plasmáticas de E_2 . Por lo tanto, se podría pensar que, al igual que en *P. esculentus*, en *R. arenarum* el E_2 estimula la proliferación de las espermatogonias (Minucci y col., 1997). Sin embargo, la relación entre el E_2 y la espermatogénesis en *R. arenarum* no había sido estudiada aún.

Tomando en conjunto los resultados expuestos en este capítulo se podría concluir que los BOs de los machos de *R. arenarum* son capaces de producir E_2 a partir de sustratos endógenos y que tanto las concentraciones plasmáticas de E_2 como la actividad total de la enzima aromatasa son menores en el período PreR. El BO sería, por lo tanto, una de las principales fuentes de

E₂ plasmático que a su vez podría regular la espermatogénesis y la esteroidogénesis testicular.

IV. Capítulo 2

Variaciones estacionales en la apoptosis y la proliferación celular en el testículo y el órgano de Bidder. Presencia de receptores de estrógenos.

IV. Variaciones estacionales en la apoptosis y la proliferación celular en el testículo y el órgano de Bidder. Presencia de receptores de estrógenos.

Materiales y Métodos

Animales y obtención de tejidos

Se empleó un total de 59 sapos machos adultos de la especie *R. arenarum*, que fueron colectados entre 2012 y 2014. Los animales fueron mantenidos, alimentados y anestesiados tal como se describió en el *Capítulo 1*. La obtención de los BO y de los testículos se llevó a cabo como se detalló anteriormente y luego fueron procesados según las características de cada protocolo, como se detalla a continuación.

Procesamiento del material para histología e inmunohistoquímica

Tanto para histología convencional como para inmunohistoquímica los fragmentos de tejido se fijaron en solución de Bouin durante 2 hs a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche a 4°C. Finalizado el período de fijación se los traspasó a etanol 70% donde se mantuvieron hasta su procesamiento. La deshidratación de los fragmentos testiculares se llevó a cabo mediante dos pasajes de media hora por cada uno en los siguientes alcoholes: etanol 70%, 80%, 90% y 96%. A continuación las muestras se trataron por 45 minutos con xilol-etanol 96 % (50:50, v/v), luego con xilol 45 minutos y finalmente con xilol-parafina primero por 15 minutos en estufa a 58°C y luego durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente los tejidos se colocaron en parafina-histoplast (50:50, p/p) en estufa a 58°C durante 2 horas. El tratamiento se repitió una vez cambiando la mezcla de parafina-histoplast para finalmente realizar la inclusión de los fragmentos testiculares en la misma mezcla. Los cortes se realizaron a 7 micrones.

Previamente a realizar la inmunohistoquímica, el estado de los tejidos se analizó mediante histología convencional. Para ello, los cortes se desparafinaron en xilol durante 20 minutos y se hidrataron mediante una serie

de lavados sucesivos con etanol de concentración decreciente: etanol 96%, 90%, 80%, 70% y agua destilada. Luego se colorearon con hematoxilina de Carazzi durante diez minutos, se lavaron en agua destilada y se colorearon con eosina acuosa 0,1% durante pocos segundos. Para deshidratar los cortes se realizó un pasaje rápido por etanol 70%, luego por etanol 96%, se los secó brevemente en estufa a 58°C, se los colocó en xilol por 20 minutos y se realizó el montaje con bálsamo de Canadá sintético.

Estudio de apoptosis

Para estudiar las variaciones estacionales en la apoptosis de la línea germinal se analizaron los cortes histológicos de 4 individuos por período mediante la técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) con fluorescencia. Para ello, se empleó el kit ApopTag Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore, USA). La fijación, deshidratación e inclusión de los fragmentos testiculares en parafina-histoplast se realizaron del mismo modo que para la histología convencional. Los cortes también se desparafinaron del modo ya descrito, y a continuación se trataron con proteinasa K (20 µg/ml) durante 15 minutos para su permeabilización. Se realizaron dos lavados cortos de 5 minutos con PBS luego de lo cual se les agregó una mezcla de nucleótidos acoplados a digoxigenina y se los incubó en cámaras húmedas con la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt) durante 1 h a 37°C. Luego de frenar la actividad de esta enzima con el buffer comercial se realizaron dos lavados cortos en PBS y los cortes se incubaron en cámaras húmedas con el anticuerpo anti digoxigenina acoplado a fluoresceína, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de tres lavados cortos en PBS se realizó una contra tinción con yoduro de propidio. Para finalizar, se realizaron cuatro lavados cortos de 5 minutos en PBS después de los cuales los cortes se montaron en PBS-Glicerol (50:50, v/v) y se los protegió de la luz hasta el momento de la observación. Se realizaron tres controles:

-*Controles de Autofluorescencia*: corresponden a secciones solamente desparafinadas e hidratadas en alcoholes de graduación decreciente y montadas en PBS-Glicerol (50:50, v/v). Estas secciones no fueron procesadas con el kit ApopTag Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection.

-*Controles Negativos*: corresponden a secciones que fueron sometidas al ApopTag Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit pero no fueron incubadas con la enzima Tdt.

-*Controles Positivos*: corresponden a secciones que luego del tratamiento con proteinasa K fueron tratadas con una solución de DNAsa (1 U/ μ l) durante 30 minutos a 37°C.

Todos los cortes se analizaron mediante un microscopio Confocal (Olympus - FV300/BX61) y las imágenes fueron capturadas con una cámara digital incorporada al microscopio. Se cuantificaron los núcleos apoptóticos de cada sección con el programa ImageJ y los resultados se expresaron como la media de los animales en cada período \pm EE. La determinación de los estadios de la espermatogénesis se realizó según Rastogi y col. (1976).

Proliferación celular

Con el objetivo de analizar las variaciones estacionales en la proliferación celular en el BO y en el testículo, se trataron los fragmentos de con 1 mM de 5-Bromo-2'-Deoxyuridina (BrdU; Sigma-Aldrich, EEUU) durante 1h a 37°C. El tejido se fijó en Bouin, se realizó su inclusión en parafina-histoplast (50:50) y los cortes se desparafinaron e hidrataron como ya fuera descrito previamente. Luego, se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS y la actividad de peroxidasas endógenas se bloqueó con una solución 5% de peróxido de hidrógeno durante 8 minutos. Se realizaron tres lavados sucesivos de 5 minutos en PBS y se bloquearon las uniones inespecíficas con leche descremada (5% en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Los cortes se lavaron tres veces con PBS y se bloqueó la biotina endógena mediante el Sistema de Bloqueo de Avidina-Biotina (Vector

Laboratories Inc., CA, EEUU). Se realizaron tres nuevos lavados y los cortes se incubaron durante toda la noche a 4°C con una mezcla de DNAsa I y el anticuerpo primario monoclonal anti-Bromo-deoxyuridina (1:100, GE Healthcare, Gran Bretaña). Al día siguiente los cortes se lavaron tres veces con PBS, se incubaron con un anticuerpo secundario policlonal biotinilado anti IgG de ratón (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) durante 1 h a temperatura ambiente, se realizaron tres nuevos lavados y se incubaron con estreptavidina-peroxidasa (1:400; GE Healthcare, Gran Bretaña) durante 45 minutos. Luego de lavar tres veces más, la marcación se reveló con una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAKO North America, Inc., CA, EEUU). Los cortes se colorearon con Hematoxilina de Carazzi por 8 minutos, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y finalmente se montaron con bálsamo de Canadá (Biopack, Argentina). Los cortes histológicos se analizaron mediante un microscopio Leica DM2000 y las imágenes fueron capturadas con una cámara digital incorporada al microscopio. La proliferación celular se expresó como el porcentaje de cistos de gonias inmunomarcados sobre el total de cistos de gonias dentro de cada lóbulo. Se analizaron 5 lóbulos de 5 animales de cada período y los resultados se expresaron como la media \pm EE.

Inmunohistoquímica del receptor de estradiol

Se estudió también la presencia del receptor de E₂ (ER β s, similar al ER β) en el BO y en el testículo. La fijación, deshidratación e inclusión de los fragmentos de órganos en parafina-histoplast se realizaron como fuera descrito en la sección *Procesamiento del material para histología e inmunohistoquímica*. Los cortes se desparafinaron y el bloqueo de peroxidasa endógenas se realizó de la manera habitual. Se realizaron tres lavados sucesivos de 5 minutos en PBS y se bloquearon las uniones inespecíficas con seroalbumina bovina (BSA) 2% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Los cortes se lavaron tres veces con PBS y se bloqueó la biotina endógena mediante el sistema de bloqueo ya mencionado en el apartado anterior. Luego, se realizaron tres nuevos lavados y los cortes se

incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario policlonal realizado en conejo contra la proteína ER β de humano (sc-8974, Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU). Este anticuerpo fue utilizado ya en otra especie de anfibio anuro, *P. esculentus* (Stabile y col., 2006). Se utilizó una dilución 1:50 en PBS con 1,5% BSA. Al día siguiente los cortes se dejaron una hora más a temperatura ambiente y luego se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario policlonal biotinilado anti IgG de conejo (1:500, DAKOCytomation, Dinamarca). Se utilizó el mismo sistema de revelado ya descrito y los cortes fueron procesados del mismo modo que en el apartado anterior.

Análisis estadístico de los resultados

Con el objetivo de analizar las variaciones estacionales en la proliferación celular en testículo los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor (*Período*) y un contraste *a posteriori* mediante el test de Tukey (Steel y Torrie, 1980). Por otro lado, las variaciones estacionales en la apoptosis de la línea germinal, así como también las variaciones en la proliferación celular del BO se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis. Estos análisis debieron realizarse mediante estadística no paramétrica debido a que los datos no cumplían con el supuesto de homocedasticidad.

Medios de incubación y soluciones buffer utilizadas

Buffer de siembra: Tris-Cl 40 mM, dodecilsulfato sódico 2% p/v, glicerol 4% v/v, azul de bromofenol 0,001% p/v, β -mercaptoetanol 2 mM, pH 6,8.

PBS-T: Buffer fosfato salino 10 mM, tween-20 0,5% v/v.

Buffer de revelado: Luminol 1,25 mM, ácido cumárico 0,198 mM, peróxido de hidrógeno 0,038% v/v (100 volúmenes) en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 8,0.

Líquido de Bouin: Solución acuosa saturada de ácido pícrico 70% p/v, formaldehido 25% v/v, ácido acético 5% v/v.

Hematoxilina de Carazzi: Hematoxilina 0,1% p/v, sulfato doble de aluminio y potasio 5% p/v, iodato de potasio 0,02% p/v, glicerina 20% v/v.

Eosina acuosa: Eosina 0,1% p/v.

Resultados

Variaciones estacionales en la proliferación celular y en la apoptosis de la línea germinal

Teniendo en cuenta la progresión del ciclo espermatogénico descrita en la *Introducción*, surge el interrogante de qué ocurre con los espermatocitos que no alcanzan la madurez de los espermatozoides. Pueden plantearse al menos dos hipótesis: o bien su desarrollo queda latente para continuar con la espermatogénesis el año siguiente, o bien mueren por apoptosis y los espermatozoides del año siguiente provienen de la proliferación de nuevas espermatogonias. Considerando estos dos posibles escenarios, se analizaron las variaciones estacionales en la apoptosis y proliferación de la línea germinal.

Para estudiar las variaciones en la apoptosis mediante un kit de fluorescencia basado en el método de TUNEL, en primera instancia se analizaron los controles de la técnica. Los primeros ensayos demostraron que las secciones de testículo fijados en Bouin e incluidos en parafina poseen una elevada autofluorescencia, que es más intensa en el compartimento intersticial que en el germinal. Es por ello que se decidió analizar los cortes con microscopía confocal y no con un microscopio tradicional de fluorescencia, lo cual permitió ajustar los parámetros del equipo con un *Control de Autofluorescencia*, de modo tal de lograr que el compartimento germinal carezca de fluorescencia (Figura 12A). Por otra parte, también fue necesario realizar los *Controles Negativos* no incubados con la enzima Tdt (Figura 12B). Finalmente, como *Controles Positivos* se optó por realizar incubaciones de las secciones testiculares con una solución de DNAsa y los cortes exhibieron una marca de apoptosis contundente (Figura 12C).

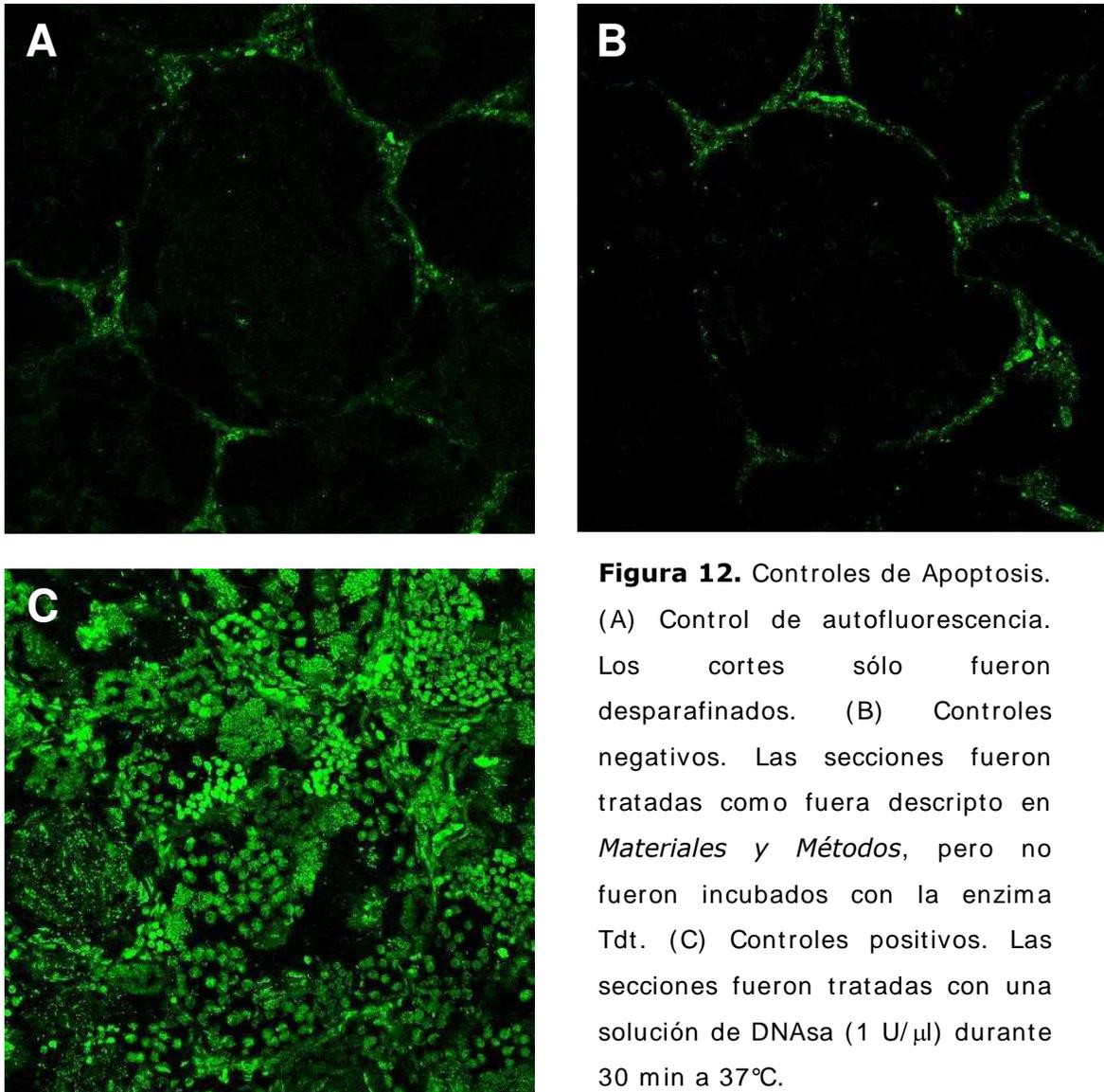


Figura 12. Controles de Apoptosis. (A) Control de autofluorescencia. Los cortes sólo fueron desparafinados. (B) Controles negativos. Las secciones fueron tratadas como fuera descrito en *Materiales y Métodos*, pero no fueron incubados con la enzima Tdt. (C) Controles positivos. Las secciones fueron tratadas con una solución de DNAsa (1 U/ μ l) durante 30 min a 37°C.

Al analizar cualitativamente las variaciones estacionales, los resultados indican que tanto en el período PreR como en el R, no hay prácticamente apoptosis de la línea germinal (Figuras 13 y 14). Sin embargo, en el período PostR se observa una elevada apoptosis en los cistos espermatoogénicos (Figura 15).

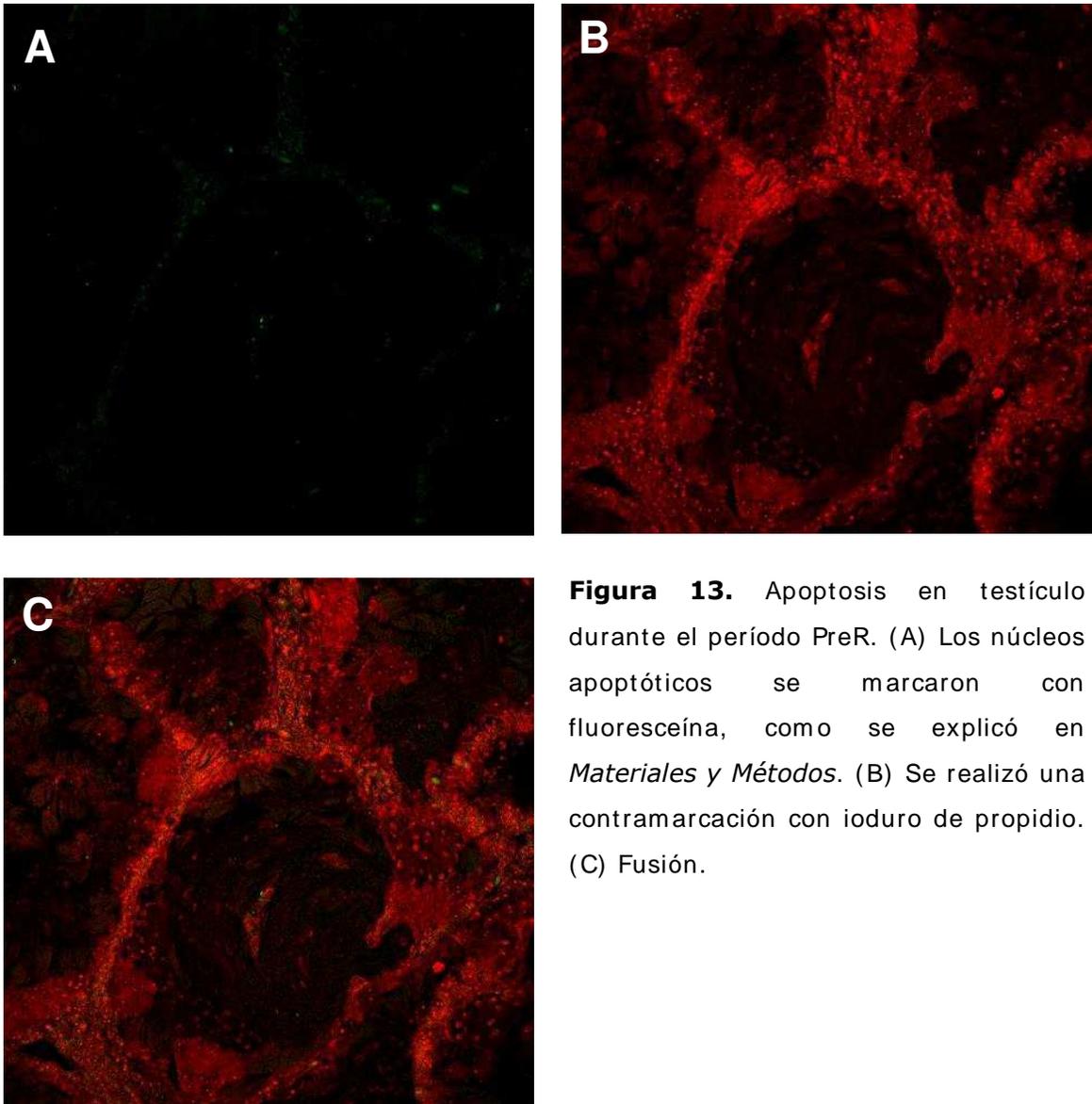


Figura 13. Apoptosis en testículo durante el período PreR. (A) Los núcleos apoptóticos se marcaron con fluoresceína, como se explicó en *Materiales y Métodos*. (B) Se realizó una contramarcación con yoduro de propidio. (C) Fusión.

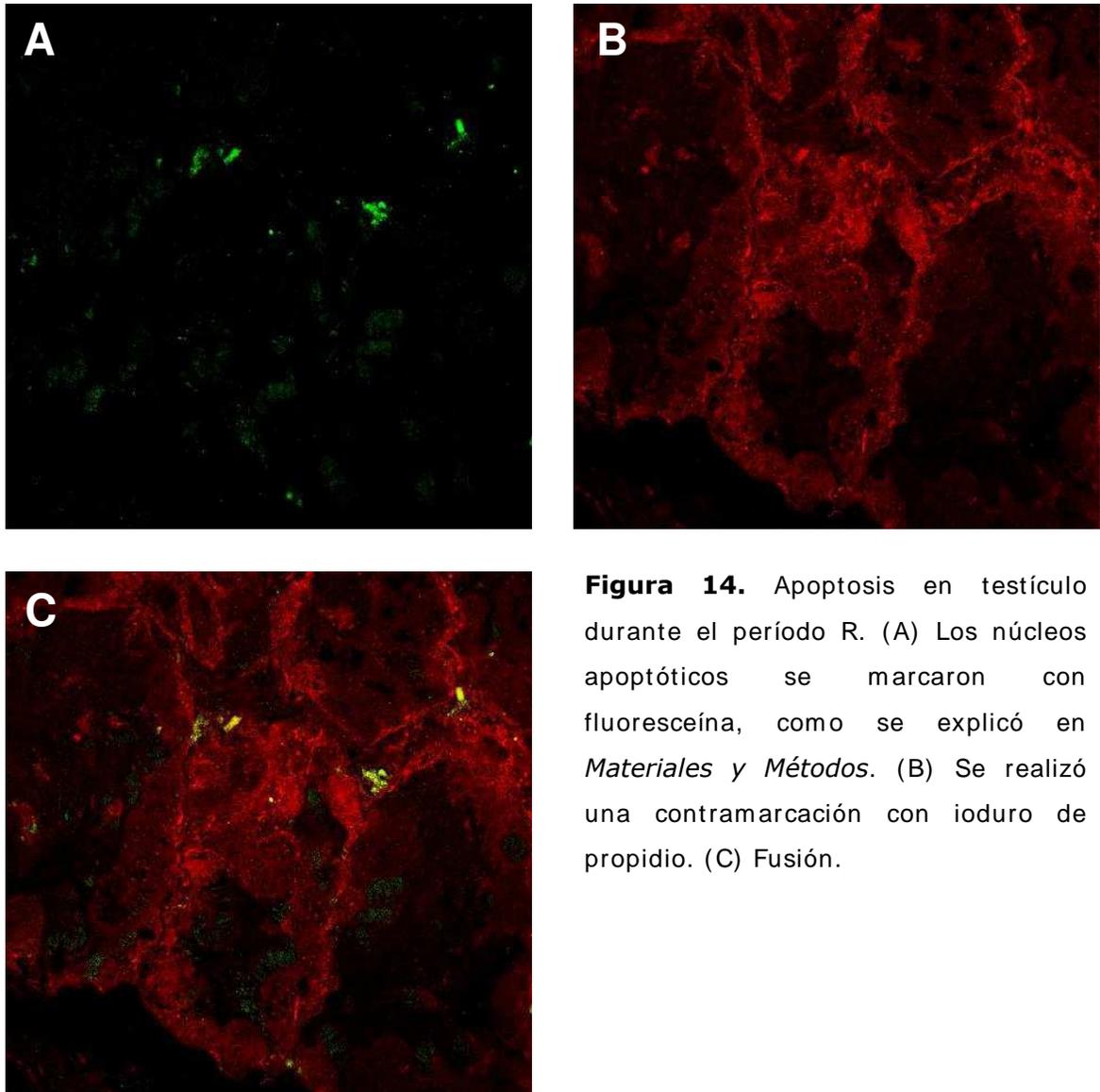


Figura 14. Apoptosis en testículo durante el período R. (A) Los núcleos apoptóticos se marcaron con fluoresceína, como se explicó en *Materiales y Métodos*. (B) Se realizó una contramarcación con yoduro de propidio. (C) Fusión.

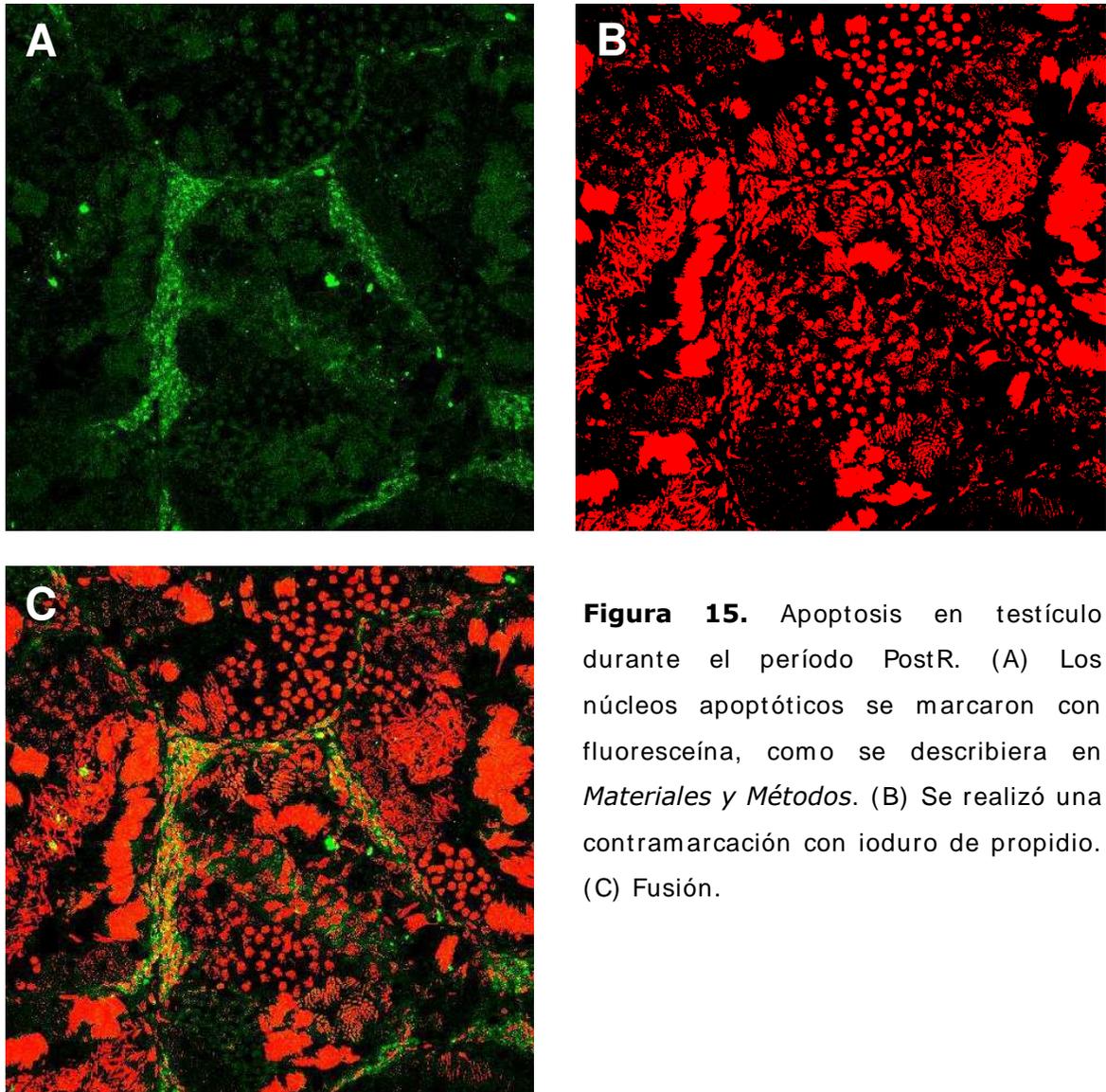


Figura 15. Apoptosis en testículo durante el período PostR. (A) Los núcleos apoptóticos se marcaron con fluoresceína, como se describiera en *Materiales y Métodos*. (B) Se realizó una contramarcación con yoduro de propidio. (C) Fusión.

Además, como muestra la Figura 16, al contar el número de núcleos apoptóticos se observó que la apoptosis es significativamente mayor en el período PostR que en el resto del año ($p= 0,0008$).

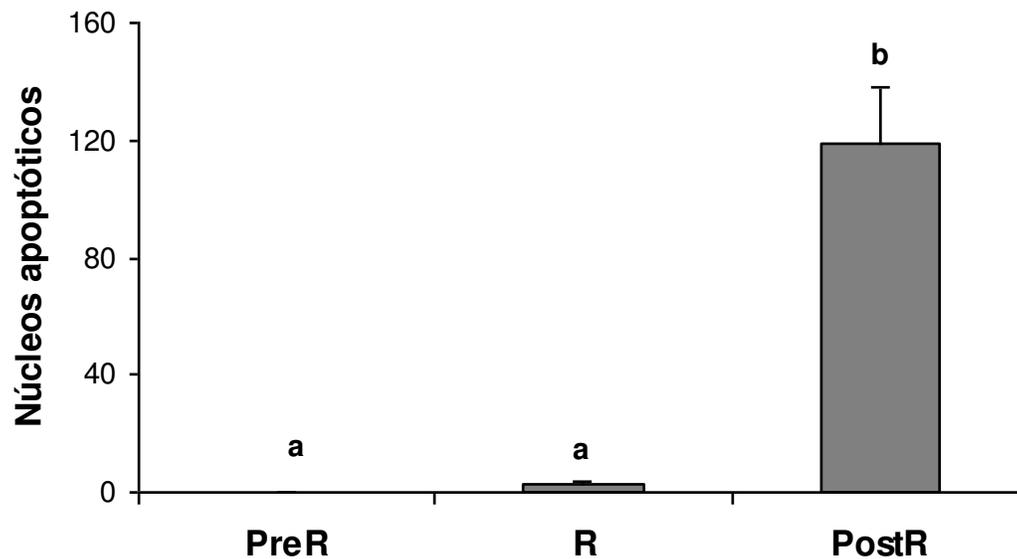


Figura 16. Variaciones estacionales en la apoptosis de la línea germinal. Se estudiaron 4 animales de cada período y el tejido se procesó como se detalla en *Materiales y Métodos*. La cuantificación de los núcleos apoptóticos se realizó con el programa ImageJ y los valores están expresados como la Media \pm EE. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,0008$).

Como consecuencia de estos resultados surge la siguiente pregunta: ¿A qué estadio de la espermatogénesis corresponden los núcleos apoptóticos observados durante el período PostR? Para contestarla se analizó la morfología de todos los núcleos apoptóticos mediante el uso de yoduro de propidio (Figura 17A) y se observó cuáles de ellos presentaban marca de apoptosis y cuáles no (Figura 17B). Se observó que los cistos de espermatogonias no sufren apoptosis mientras que la mayoría de los cistos que presentan marca corresponden a espermatocitos.

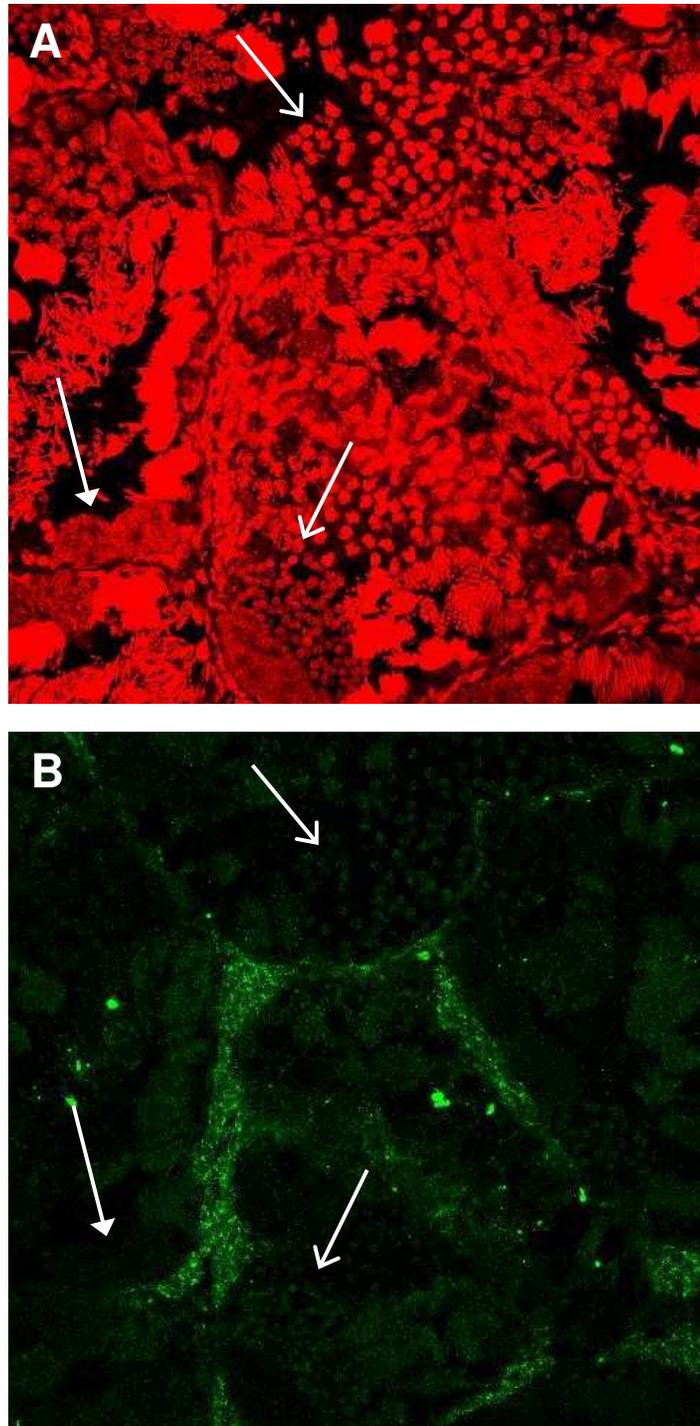


Figura 17. A. La contratinción con ioduro de propidio permite distinguir la morfología de los núcleos de cada cisto. **B.** Los cistos marcados con fluoresceína corresponden a núcleos apoptóticos y, mediante una comparación con la contratinción de ioduro de propidio, se logró distinguir a qué estadios corresponden. En ambos casos, la flecha cerradas (—▶) señalan ejemplos de cistos de espermatogonias mientras que las flechas abiertas (—➤) indican cistos de espermatocitos.

Luego de cuantificar los núcleos apoptóticos de cada estadio se verificó que en su gran mayoría corresponden a espermatocitos I y II, y sólo se observaron espermatídas apoptóticas en uno de los individuos (Figura 18). Además, no se observaron espermatogonias apoptóticas en ninguno de los individuos analizados.

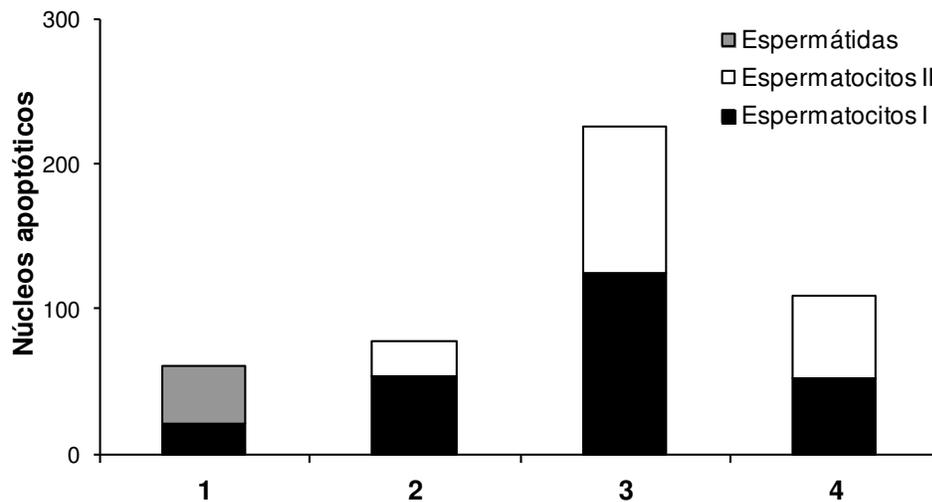


Figura 18. Apoptosis en el período PostR. La cuantificación de los núcleos apoptóticos se realizó con el programa ImageJ y la determinación de los estadios de la espermatogénesis se realizó según Rastogi y col (1976). 1-4 refieren al número de sapos estudiados.

Por otro lado, se analizaron las variaciones estacionales en la proliferación celular de la línea germinal. Para ello se incubaron los fragmentos testiculares con 1 mM de BrdU. En estudios preliminares se comparó la incorporación de BrdU evaluando dos concentraciones, 100 μ M y 1 mM de BrdU, y se observaron menos cistos inmunomarcados en los fragmentos testiculares incubados con la menor concentración. Por lo tanto, dado que la concentración de 100 μ M subestimaba la tasa de proliferación celular se optó por utilizar la concentración de 1 mM de BrdU. Luego de la incubación, la incorporación de BrdU se determinó mediante inmunohistoquímica, como se detalla en *Materiales y Métodos*. Se observó una gran proliferación de espermatogonias en el período R mientras que en los períodos PreR y PostR la proliferación es mucho menor (Figuras 19 y 20).

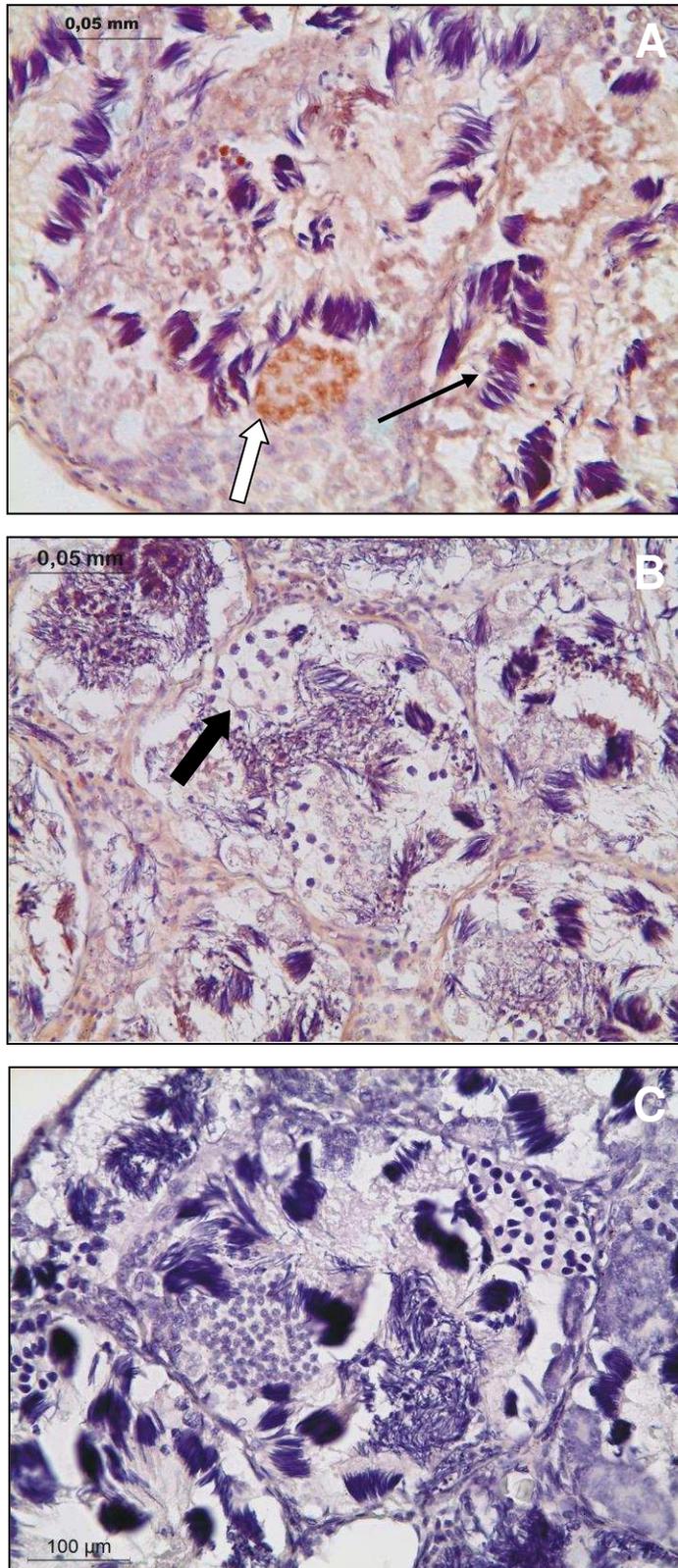
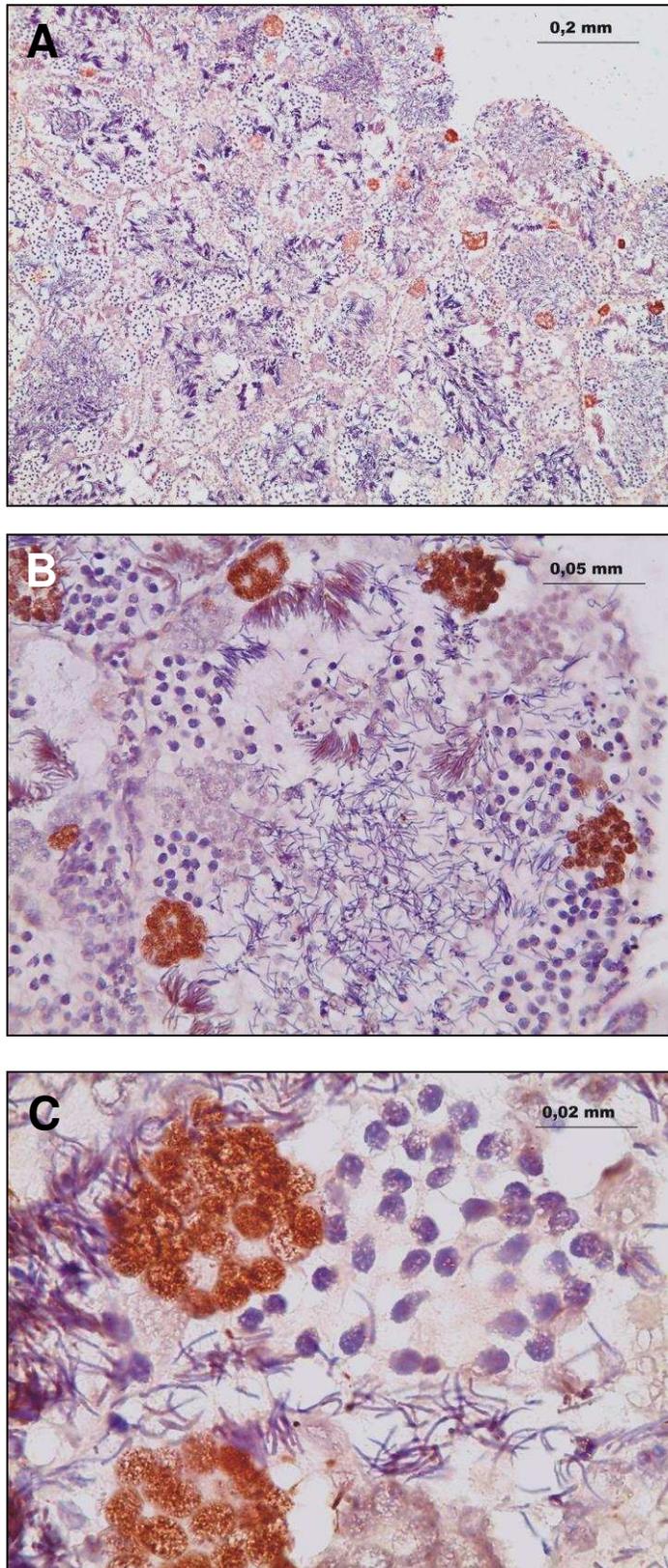


Figura 19.

Proliferación celular en fragmentos testiculares del período PreR y PostR. Los fragmentos testiculares se incubaron con BrdU. La proliferación celular se determinó mediante inmunohistoquímica como se detalla en *Materiales y Métodos*. (A) PreR. (B) PostR. (C) Control negativo. Las flechas señalan cistos de espermatogonias (⇨), cistos de espermatocitos (➡) y "penachos" o "matas" de espermatozoides (➔)

**Figura 20.**

Proliferación celular en testículos del período R. Los fragmentos se incubaron con BrdU. La incorporación se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*. (A) En esta imagen con bajo aumento puede observarse un gran número de cistos con inmunomarca. (B, C) Estas imágenes con mayor magnificación muestran que estos cistos son de espermatogonias.

Para analizar estadísticamente estos resultados, el porcentaje de espermatogonias en proliferación se expresó de dos modos: 1) considerando como 100% el número total de cistos de espermatogonias (Figura 21A); 2) considerando como 100% el número total de cistos en cualquier estadio de la espermatogénesis (Figura 21B). En ambos casos se observó que la proliferación es significativamente mayor en el período R ($p=0,0001$ para el caso 1, $p= 0,0016$ para el caso 2).

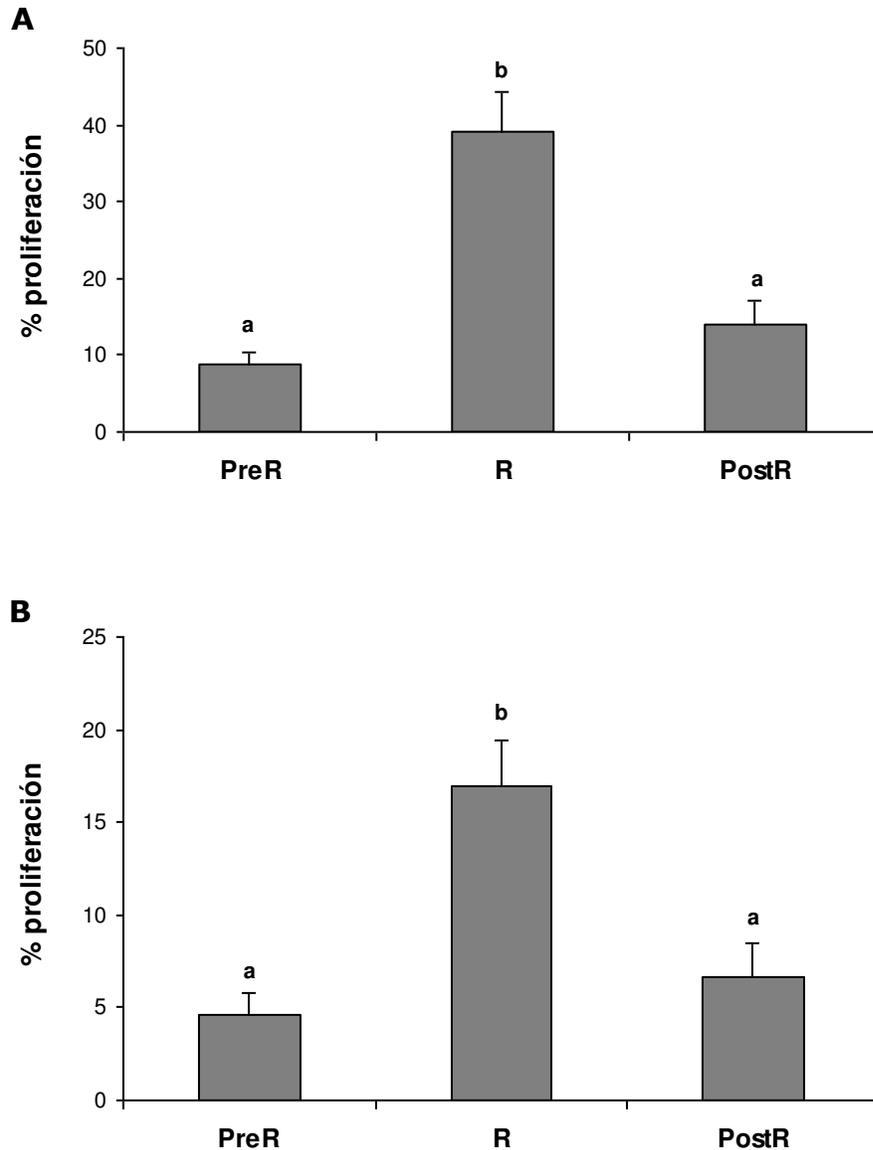


Figura 21. Variaciones estacionales en la proliferación celular de la línea germinal. Se analizaron 5 lóbulos de 5 animales correspondientes a cada período y los valores se expresaron como la Media \pm EE. (A) Los resultados están expresados como el porcentaje de cistos de espermatogonias inmunopositivas sobre el total de cistos de espermatogonias presentes en cada lóbulo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,0001$). (B) Los resultados están expresados como el porcentaje de cistos de espermatogonias inmunopositivas sobre el total de cistos en cada lóbulo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,0016$).

Tomados en conjunto, los resultados mostrados hasta aquí sugieren que los espermatoцитos que no alcanzan a diferenciarse en espermatozoides durante el período PreR y R mueren por apoptosis en el período PostR. De este modo, y dado que la proliferación de espermatogonias es máxima en el período R, los espermatozoides del año siguiente serían consecuencia de esta nueva onda espermatogénica. Como se mencionó en la *Introducción*, se ha demostrado que los estrógenos inducen la apoptosis de las células germinales en ciertos modelos de mamíferos pero esto aún no se ha estudiado en anfibios. Por otro lado, en ranas se ha observado que el E₂ estimula la proliferación de la línea germinal. Teniendo en cuenta estos antecedentes, y que la concentración plasmática de E₂ en esta especie aumenta en el período R y alcanza niveles máximos en el PostR, los resultados expuestos en este capítulo plantean el interrogante de si el E₂ regula la apoptosis y la proliferación de la línea germinal en *R. arenarum*.

Localización celular de los receptores de E₂ en el testículo y en el órgano de Bidder

En este contexto, se analizó la presencia del receptor de E₂ en el testículo de *R. arenarum* mediante inmunohistoquímica. Para ello se utilizó un anticuerpo anti ERβ que ya había sido utilizado para la descripción de las variaciones estacionales en la expresión del receptor en *P. esculentus* (Stabile y col., 2006). En ese trabajo se evaluó la especificidad de este anticuerpo mediante western blot, encontrándose una banda inmunorreactiva del peso molecular esperado (55 kDa). Sin embargo, y dado que no se realizó en *R. arenarum* ningún estudio farmacológico ni de otro tipo, de ahora en más nos referiremos al receptor de E₂ similar al ERβ (ERβs). Como muestra la Figura 22, se observó inmunomarca en el compartimento intersticial en el que se localizan las células de Leydig en testículos de algunos animales correspondientes al período R. Sin embargo, dado que el objetivo de la tesis no es analizar la distribución estacional del ERβs en las células de Leydig, los testículos de los individuos de los períodos PreR y PostR no fueron analizados en profundidad ni cuantitativamente.

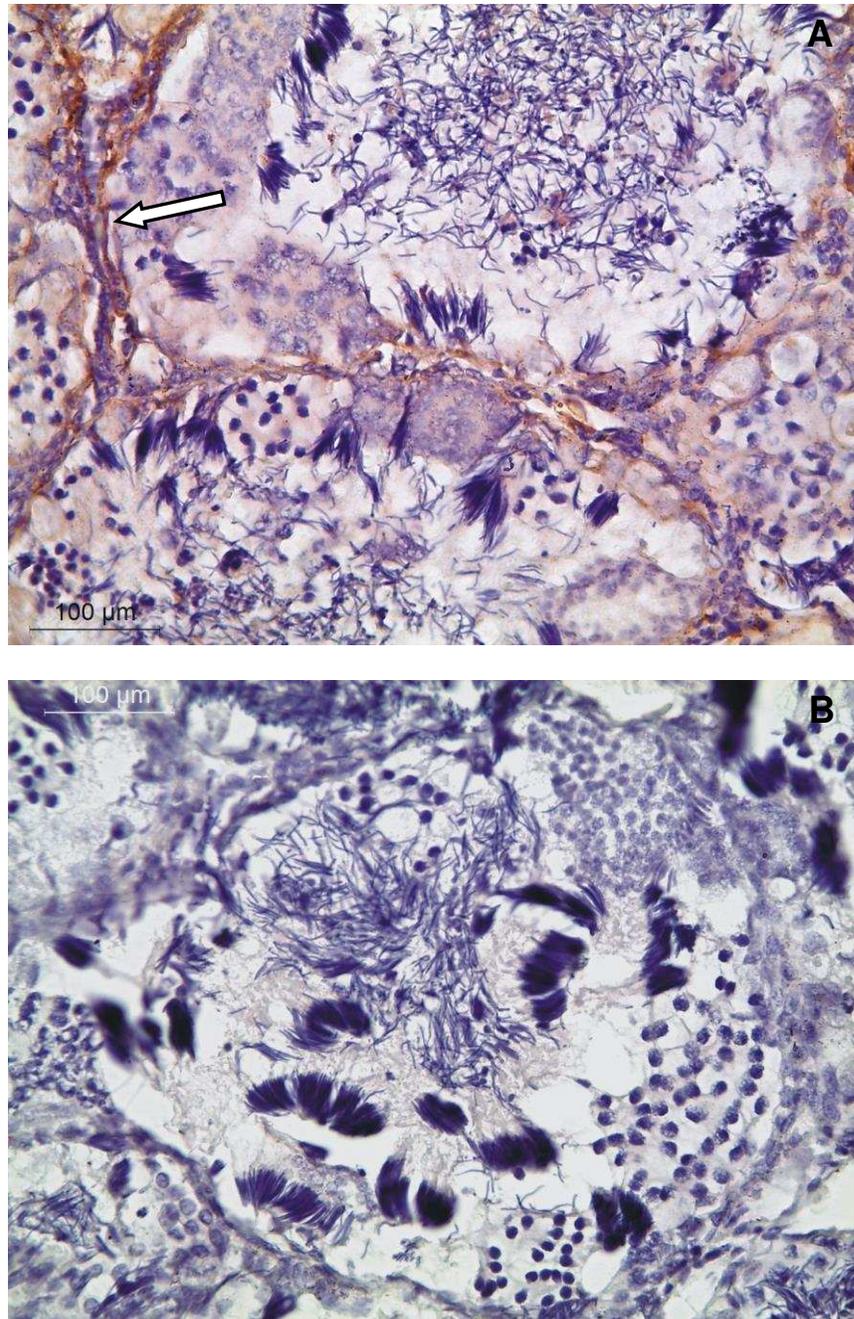


Figura 22. Inmunohistoquímica de ER β s en secciones de testículo. (A) Sección representativa de los testículos de un animal del mes de abril (período PostR). La flecha señala la inmunomarca en el compartimento intersticial. (B) Control negativo.

Se observó también inmunomarca contundente en las células de Sertoli próximas a los "penachos" de espermatozoides (Figura 23) y en las proyecciones citoplasmáticas de las células de Sertoli englobando cistos que, debido a su tamaño, podrían corresponder a cistos de espermatogonias (Figuras 24 y 26). En muy pocos individuos se detectó inmunomarca en los núcleos de las espermatogonias I, las espermatidas y los espermatoцитos (Figura 25). Cabe destacar que no se pudo establecer un patrón estacional diferencial en la localización del ERβs dado que luego de observar y comparar testículos de un total de 12 individuos (PreR: n=4, R: n=5, PostR: n=3), no se detectaron tendencias diferenciales entre un período y otro. Además, en ningún caso se observó inmunomarca en los controles negativos que no fueron incubados con el anticuerpo primario. De este modo, si bien en algunos casos se observó inmunomarca de ERβs en los núcleos de espermatogonias, de espermatoцитos o de espermatidas, en la mayoría de los individuos se observó ERβs en las células de Sertoli, ya sea concentrado en su citoplasma o en las proyecciones citoplasmáticas englobando los espermatoцитos. Estos resultados sugieren que si el E₂ efectivamente tuviese algún efecto en la apoptosis o la proliferación de la línea germinal, esto sería mayoritariamente mediante su acción sobre las células de Sertoli.

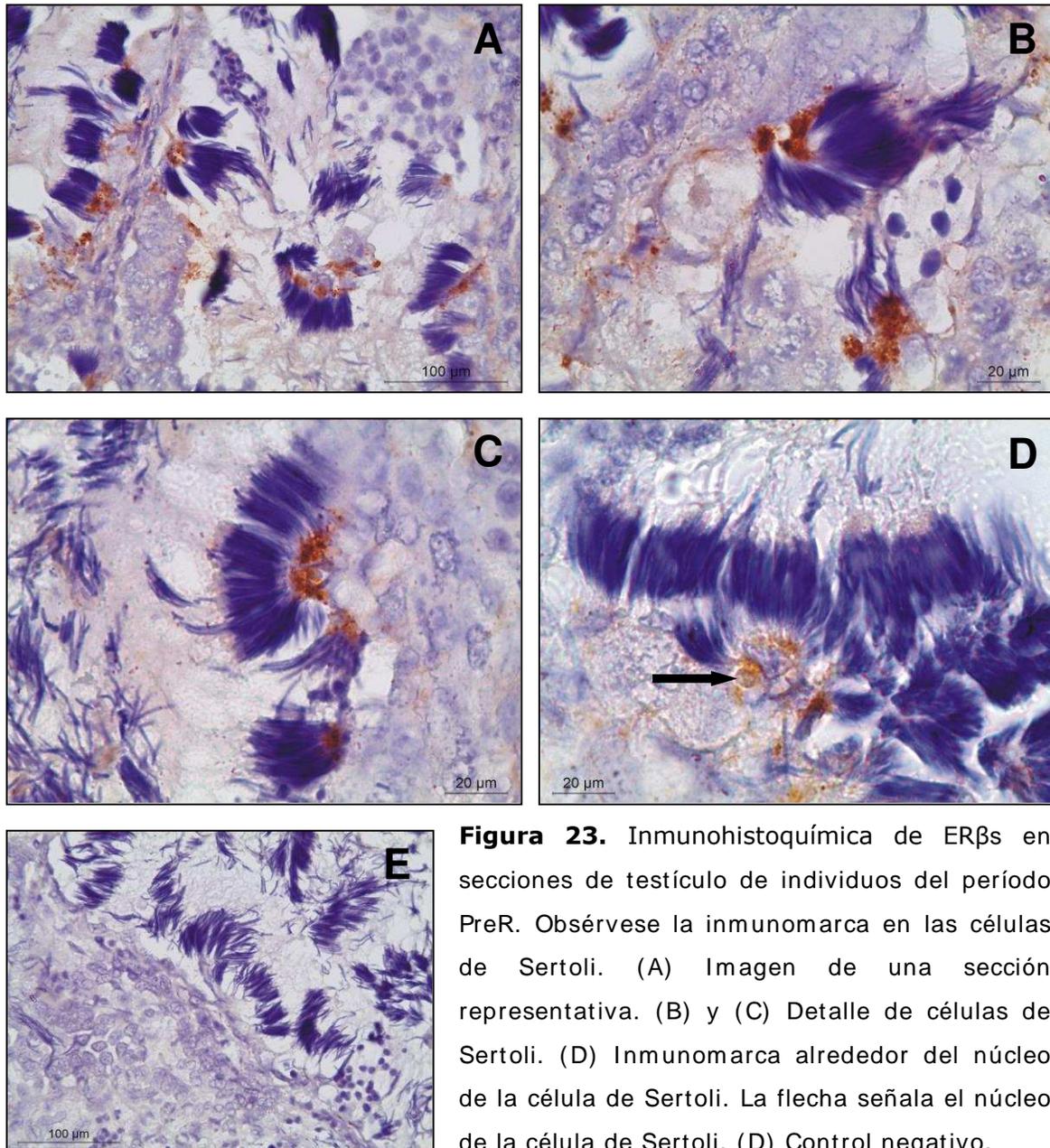


Figura 23. Inmunohistoquímica de ERβs en secciones de testículo de individuos del período PreR. Obsérvese la inmunomarca en las células de Sertoli. (A) Imagen de una sección representativa. (B) y (C) Detalle de células de Sertoli. (D) Inmunomarca alrededor del núcleo de la célula de Sertoli. La flecha señala el núcleo de la célula de Sertoli. (E) Control negativo.

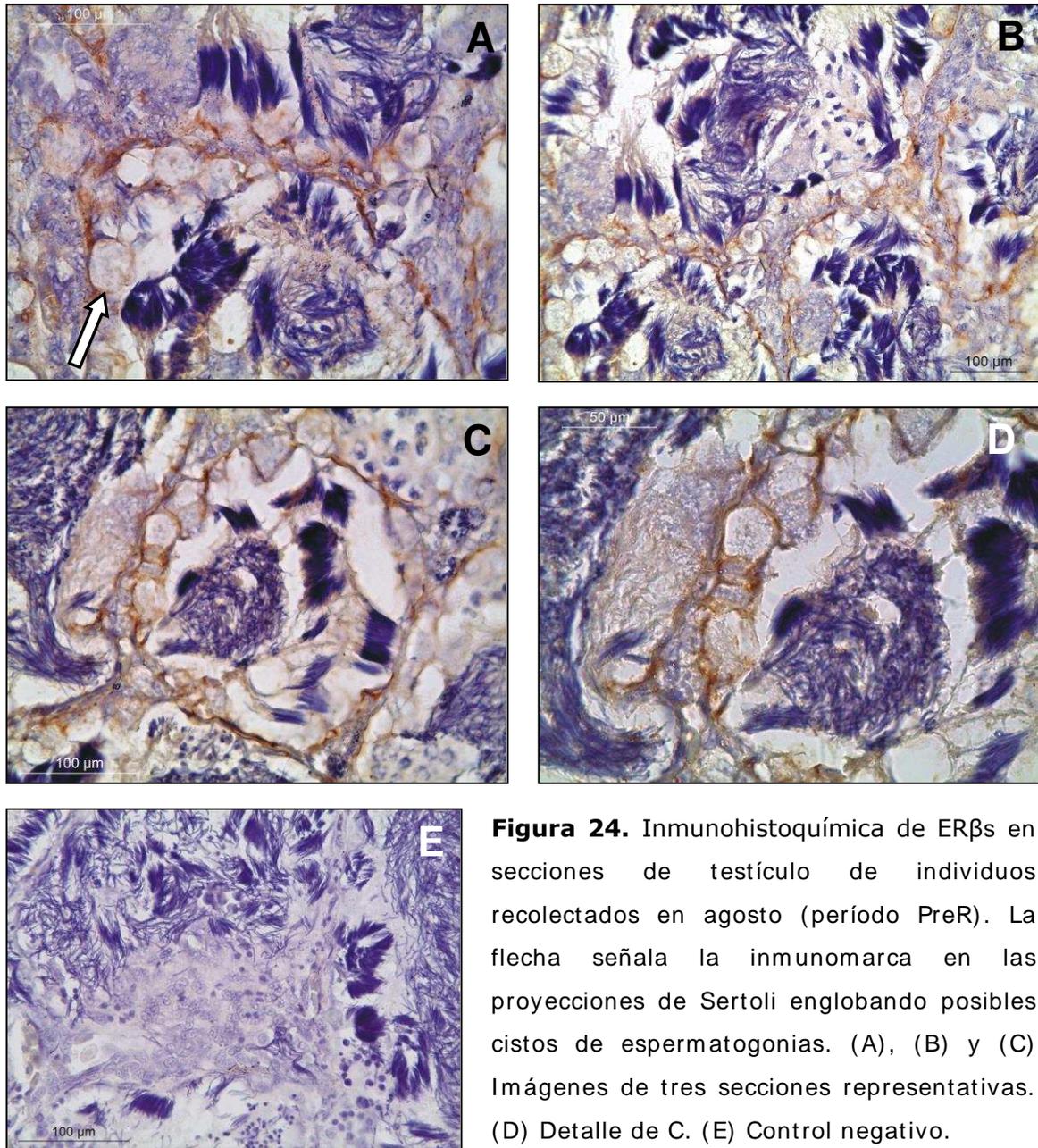


Figura 24. Inmunohistoquímica de ERβs en secciones de testículo de individuos recolectados en agosto (período PreR). La flecha señala la inmunomarca en las proyecciones de Sertoli englobando posibles cistos de espermatogonias. (A), (B) y (C) Imágenes de tres secciones representativas. (D) Detalle de C. (E) Control negativo.

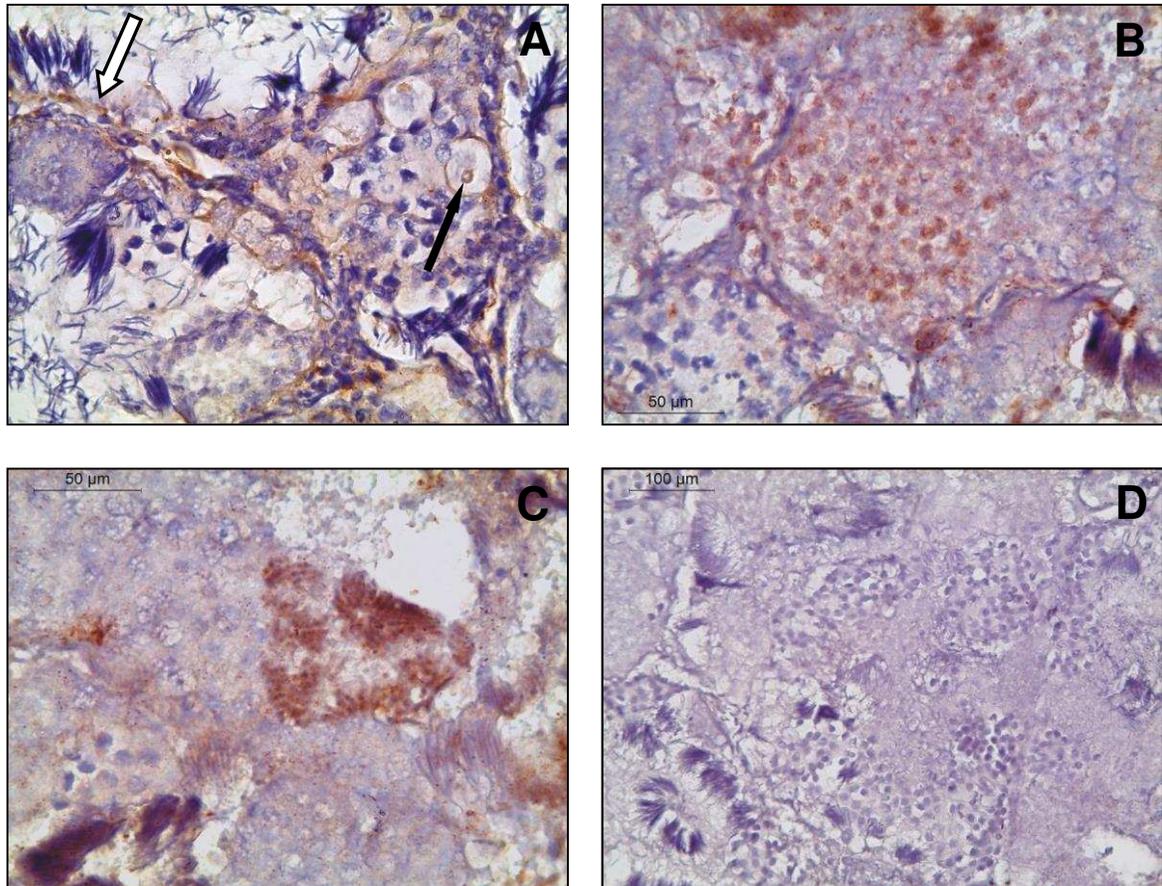
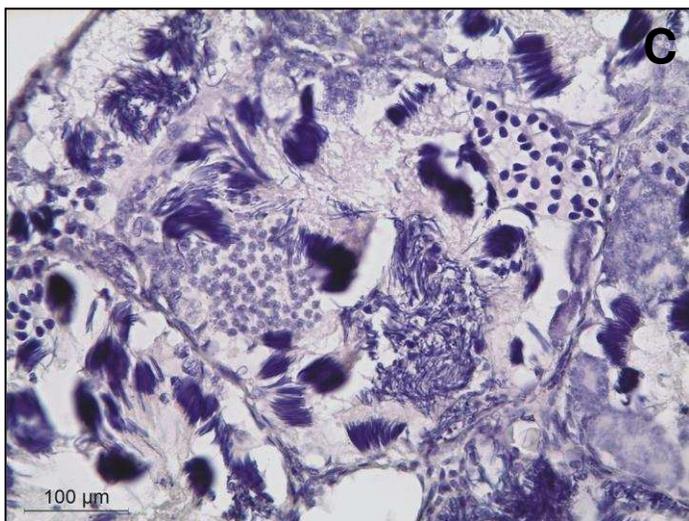


Figura 25. Inmunohistoquímica de ERβs en secciones de testículo. (A) Obsérvese inmunomarca en el compartimento intersticial (⇨) y en el núcleo de las espermatogonias I (→) en un individuo recolectado en noviembre (período R). (B), (C). En los testículos de este individuo del mes de diciembre (período R) puede observarse inmunomarca de ERβs en los núcleos de células en estadios más avanzados de la espermatogénesis, como espermatocitos (B) o espermátidas (C). (D) Control negativo.

**Figura 26.**

Imunohistoquímica de ER β s en secciones de testículo de un individuo recolectado en el mes de abril (período PostR). Las flechas señalan la inmunomarca en las proyecciones citoplasmáticas de las células de Sertoli, englobando los cistos de espermatogonias II. (A) Imagen de una sección representativa. (B) Detalle ampliado de A. (C) Control negativo.

Dado que algunas sustancias estrogénicas pueden estimular la expresión de aromatasas, al igual que E_2 , se evaluó la presencia del receptor de E_2 en los BO. Como muestra la Figura 27, se observa marca inmunorreactiva en folículos previtelogénicos y también en algunos vitelogénicos, aunque en este último caso la comparación con el control negativo no confirma que esto sea una inmunomarca específica del anticuerpo primario. Con respecto a los folículos previtelogénicos, las Figuras 28 y 29 muestran inmunomarca localizada en la periferia del ooplasma y no en las células foliculares. En otros animales se observó inmunomarca en el núcleo y en la periferia nuclear de los oocitos y también en el citoplasma de células foliculares (Figura 30). Luego de haber analizado un total de nueve individuos, no se encontró ningún patrón estacional con respecto a la inmunomarca e incluso en algunos órganos la localización de la inmunomarca varía de un folículo a otro (Figura 27 y 30). Sin embargo, cabe destacar que la localización nuclear únicamente se observó en los BO de individuos del período PreR pero no de los otros períodos. El haber localizado el receptor de E_2 del tipo similar al β en el testículo y en el BO sugiere que ambos órganos podrían ser regulados por el E_2 .

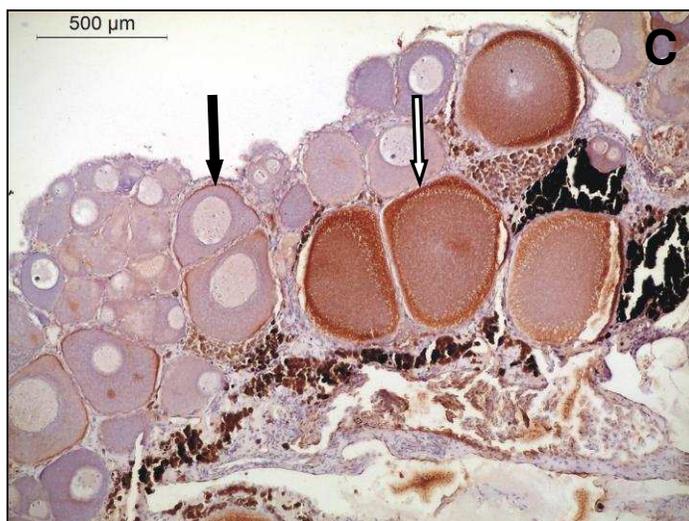
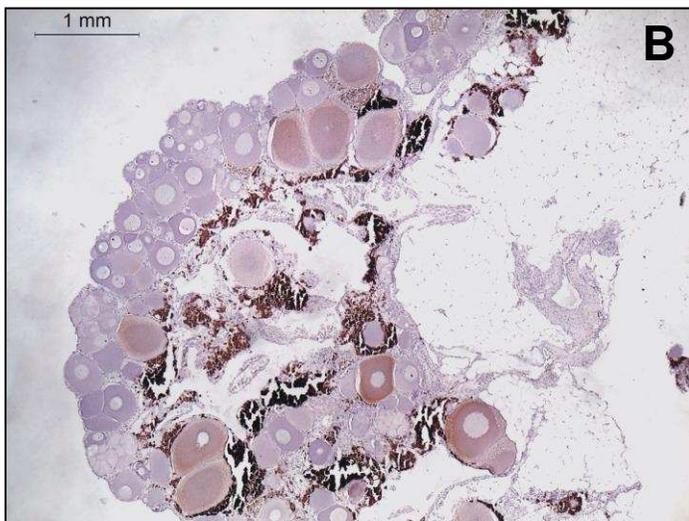


Figura 27.

Imunohistoquímica de ERβs en secciones del BO de un individuo recolectado en el mes de junio (período PreR).

(A) Inmunomarca en distintos folículos. (B) Control negativo. (C) Detalle ampliado de A. En esta imagen se muestran tanto folículos previtelogénicos (→) como vitelogénicos (⇨).

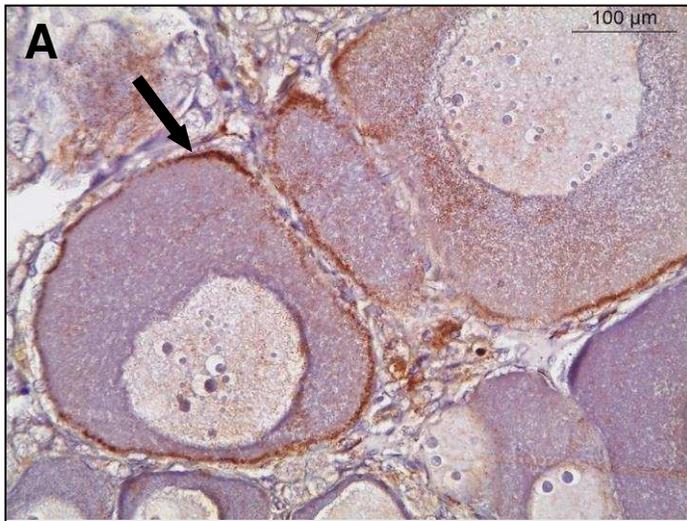
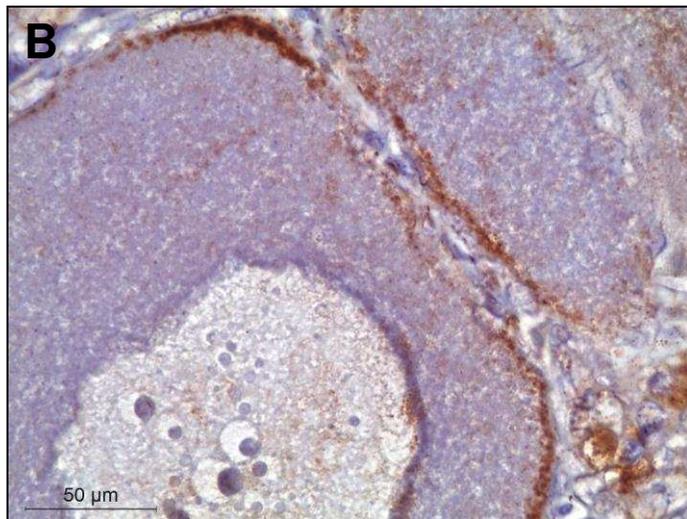
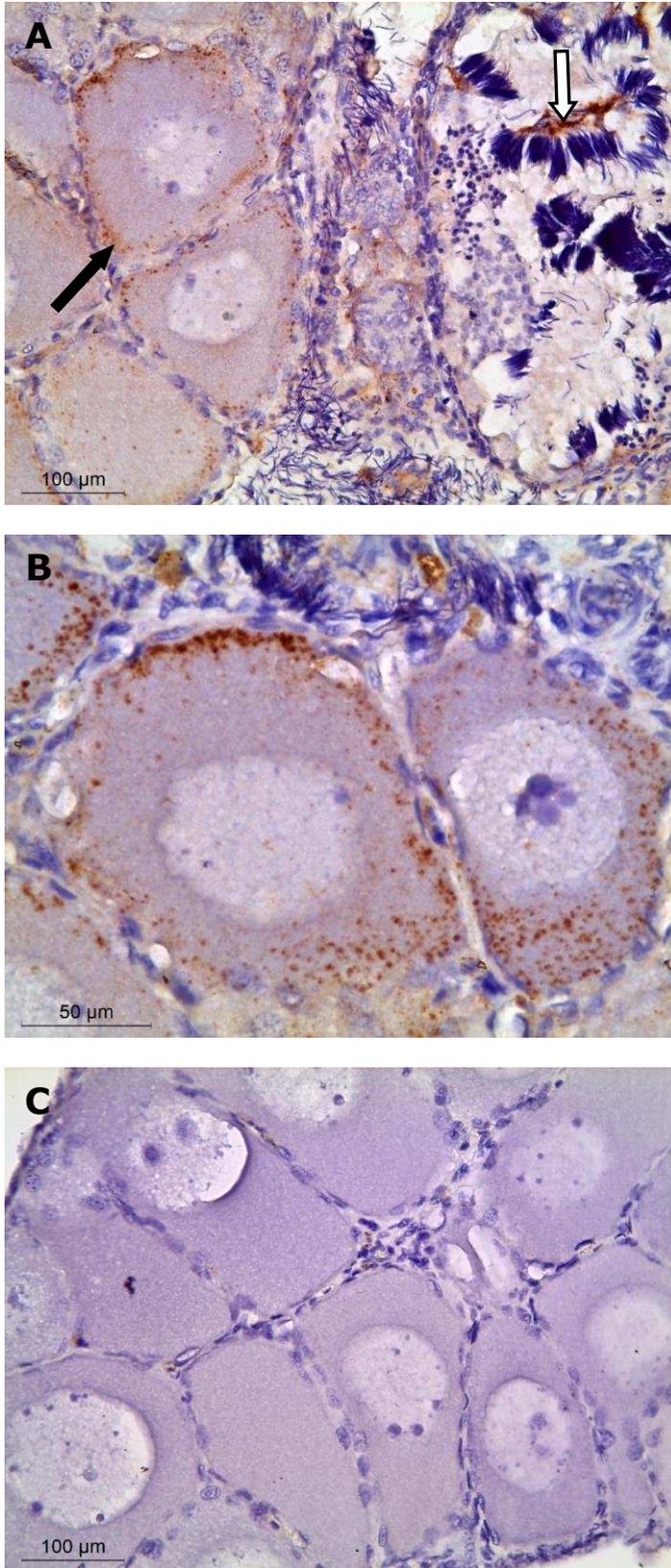


Figura 28.

Imunohistoquímica de ERβs en secciones de un BO de un individuo de junio (período PreR). (A) La flecha señala la inmunomarca en la periferia del ooplasma en los oocitos bidderianos. (B) Detalle ampliado de A. (C) Control negativo.



**Figura 29.**

Inmunohistoquímica de ERβs en secciones de BO y de testículo pertenecientes a un individuo recolectado en septiembre (período R). (A) Obsérvese la inmunomarca en la periferia del ooplasma en los oocitos bidderianos (→) y en el citoplasma de las células de Sertoli en la base de los "penachos" de espermatozoides (⇨). (B) Detalle ampliado de A. (C) Control negativo.

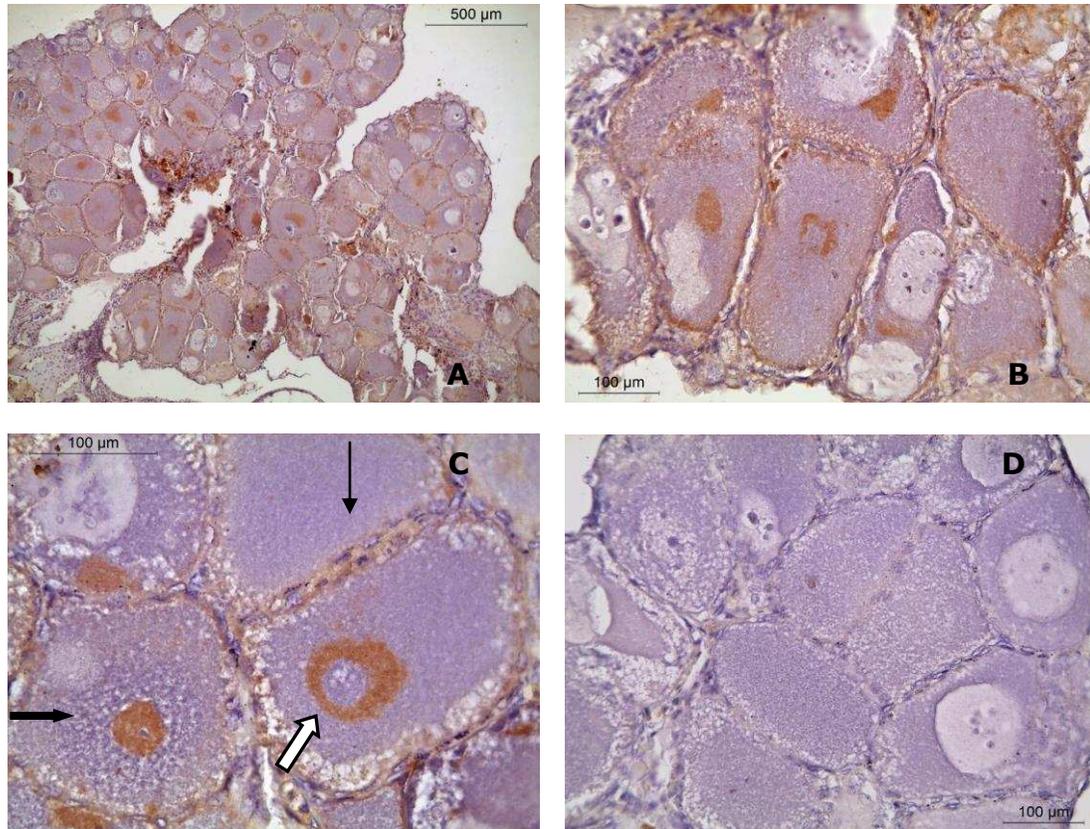


Figura 30. Inmunohistoquímica de ERβ en secciones de BO de un individuo recolectado en junio (período PreR). (A) Imagen de una sección representativa. (B) y (C) Detalles ampliados de (A). Obsérvese la inmunomarca nuclear (—→) o perinuclear (□→) en los oocitos y en el citoplasma de algunas células foliculares (—→). (D) Control negativo.

Variaciones estacionales en la proliferación celular en el órgano de Bidder

Como se mostró en el *Capítulo 1*, el BO es capaz de sintetizar E_2 a partir de sustratos endógenos y la contribución de este órgano al E_2 en circulación no estaría relacionada con el peso de los órganos sino, por ejemplo, con la cantidad de células foliculares por folículo o bien con el número de folículos. Es por ello que se analizaron las variaciones estacionales en la proliferación celular en los BO mediante la incorporación de BrdU. Como muestran las Figuras 31-33 se observó una marcada proliferación de las células foliculares tanto en los órganos del período R (Figuras 31 y 32) como del PostR (Figura 33). La Figura 32 muestra la relación del BO con el testículo adyacente y, en este contexto, puede observarse la proliferación tanto de las células foliculares como también de los cistos de espermatogonias. En cambio, en aquellos órganos de individuos del período PreR (Figura 34), la proliferación de las células foliculares no es tan marcada y, a diferencia de lo que ocurre en los otros períodos, en algunos de ellos se observa inmunomarca de BrdU en los núcleos de los oocitos.

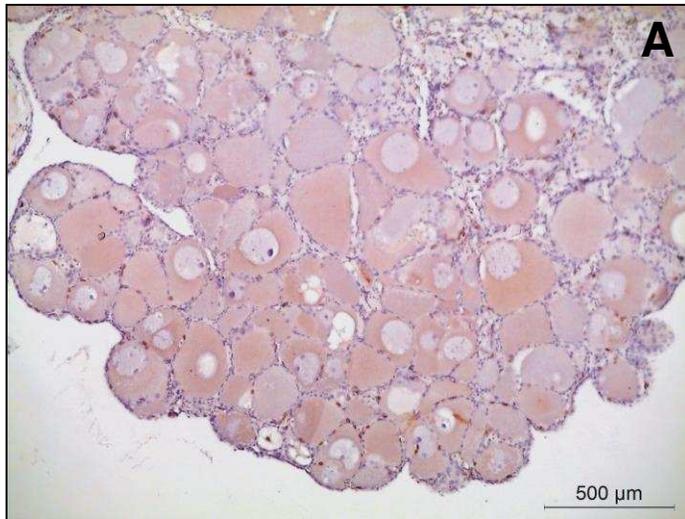
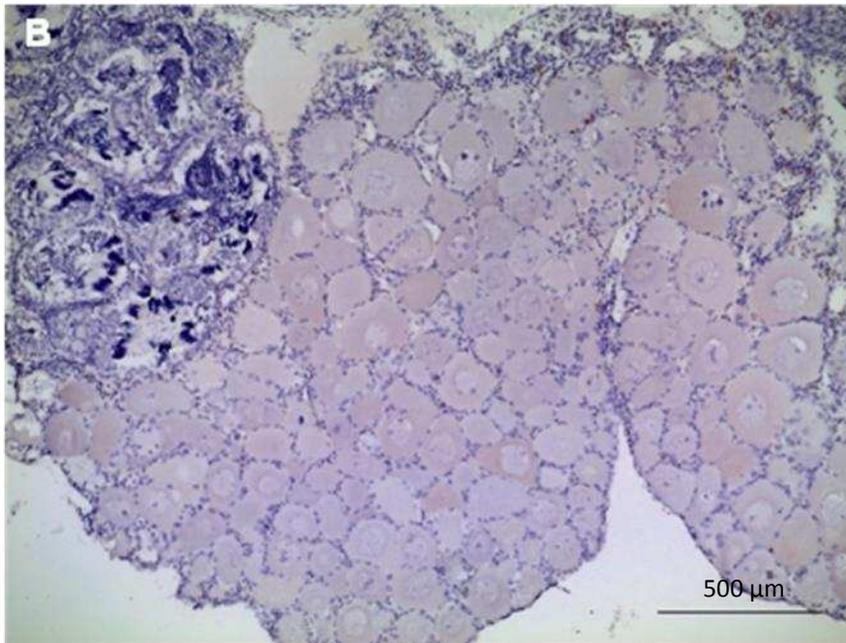
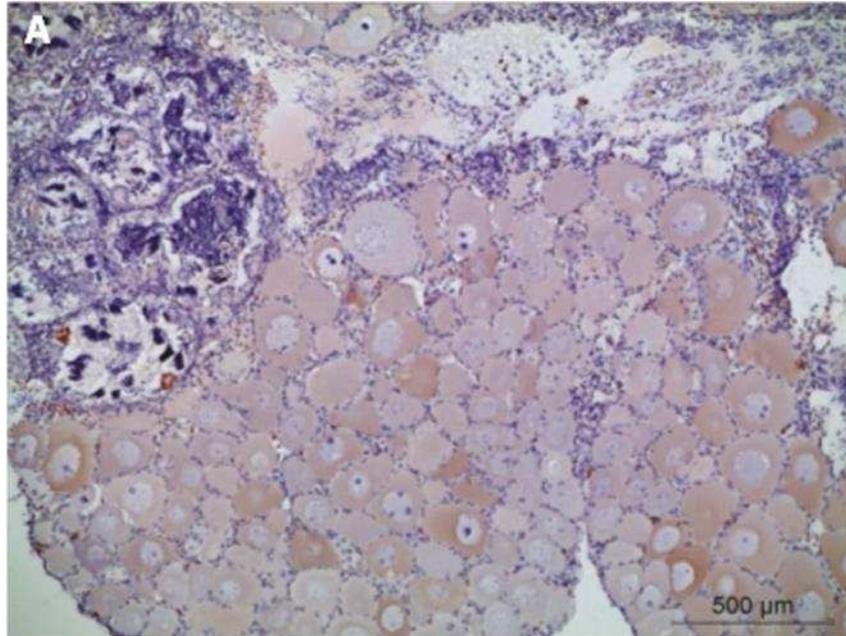


Figura 31.

Proliferación celular en el órgano de Bidder. Los fragmentos de órgano fueron incubados con BrdU, y la incorporación de BrdU se determinó mediante inmunohistoquímica como se detalla en Materiales y Métodos. (A) Imagen de una sección representativa. (B) Obsérvese la incorporación de BrdU en las células foliculares (➔). (C) Detalle de B.



Ver leyenda en la siguiente hoja

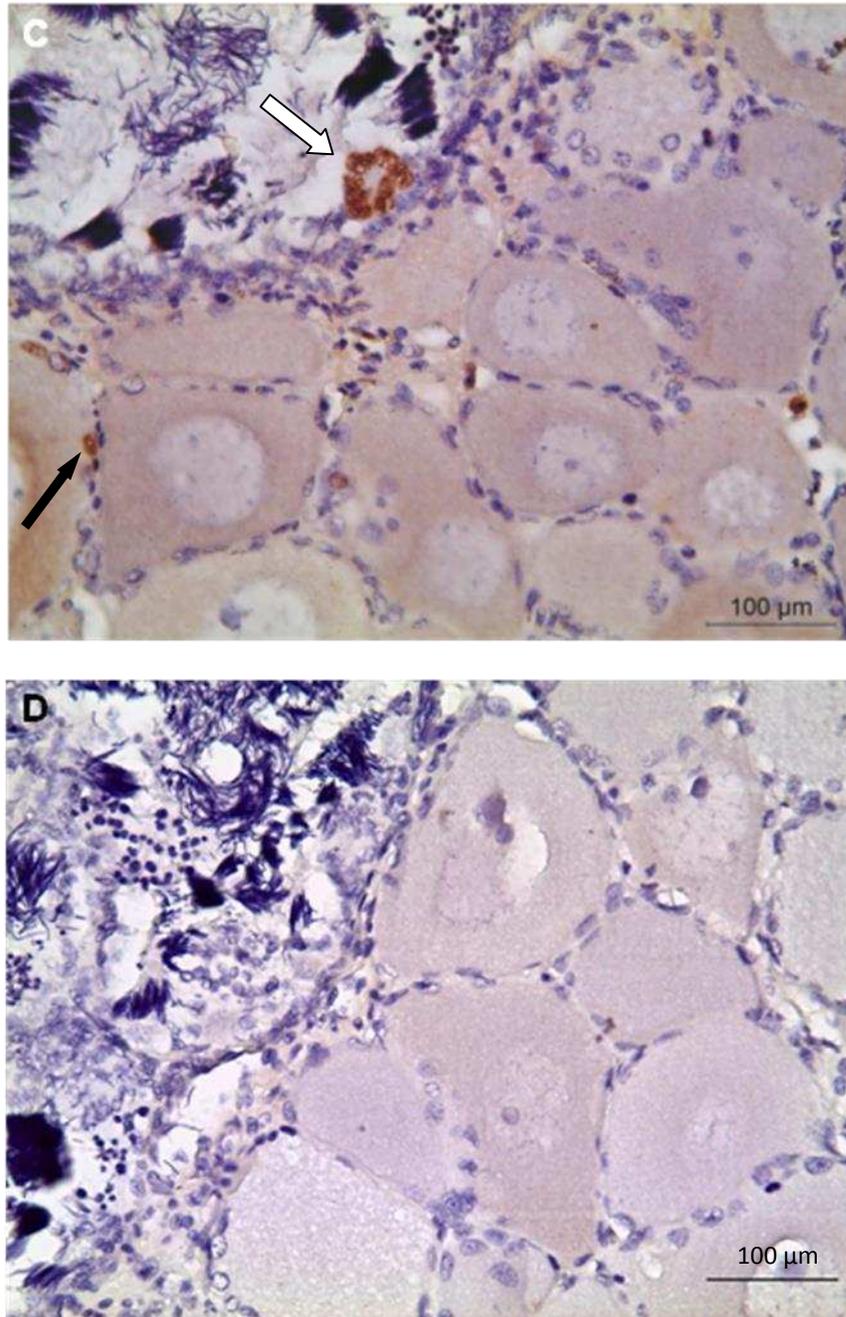


Figura 32. Proliferación celular en el BO y en el testículo de un individuo de septiembre (período R). (A) Imagen de una sección representativa. (B) Control negativo. (C) Detalle de A. Obsérvese inmunomarca en las células foliculares (→) y en cistos de espermatogonias (⇨). (D) Control negativo.

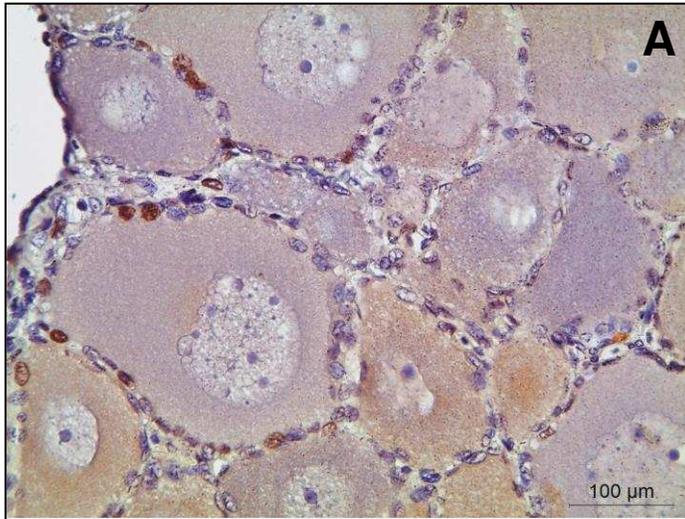
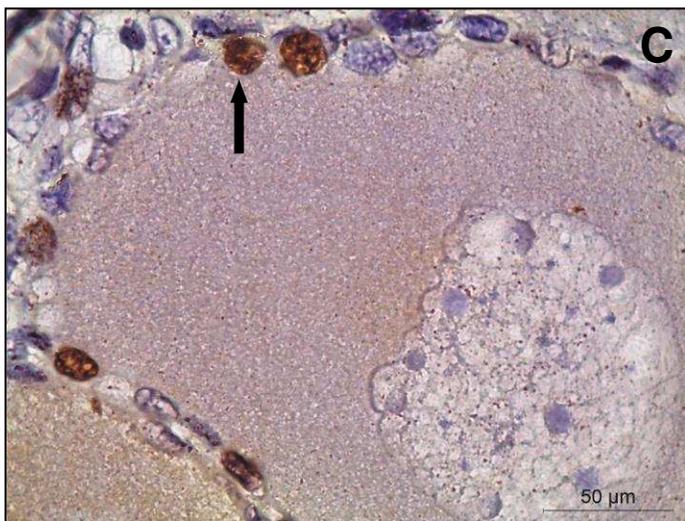
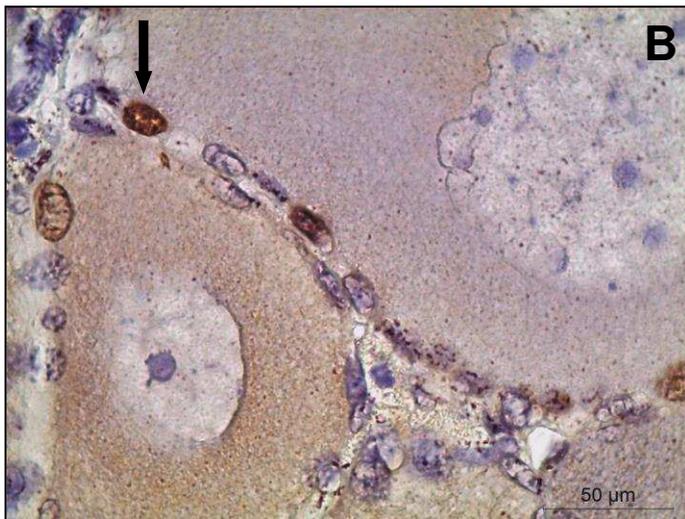


Figura 33.

Proliferación celular en BO en un individuo recolectado en abril (período PostR). (A) Imagen de una sección representativa. (B) y (C) Detalles ampliados de A. Obsérvese la proliferación en las células foliculares (➡).



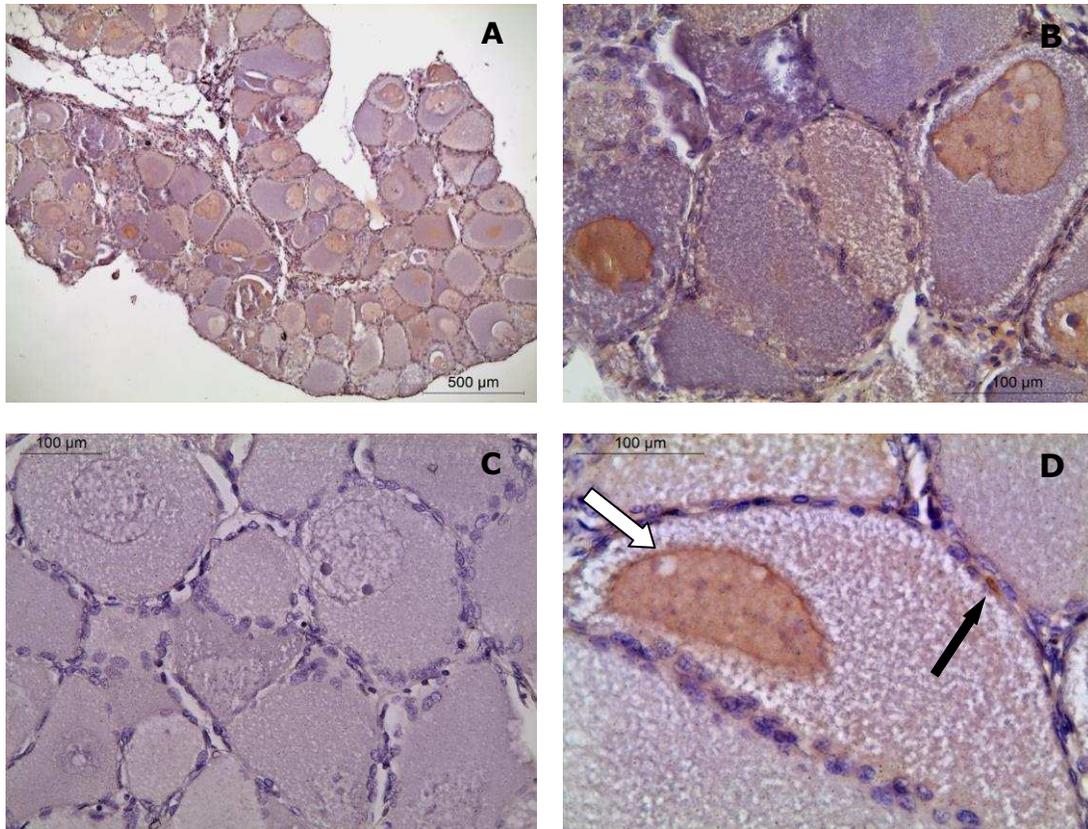


Figura 34. Proliferación celular en el BO en dos individuos recolectados en junio (período PreR). (A) Imagen de una sección representativa. (B) Obsérvese inmunomarca de BrdU en los núcleos de los oocitos. (C) Control negativo. (D) Detalle ampliado. Nótese inmunomarca de BrdU en el núcleo del oocito ($\square \rightarrow$) y de una célula folicular ($\blacksquare \rightarrow$).

Para cuantificar los resultados, la proliferación celular en el BO se expresó de dos modos: 1) como el porcentaje de células foliculares en proliferación sobre el total de células foliculares en cada folículo (% de células foliculares marcadas); 2) como el porcentaje de folículos con al menos una célula en proliferación sobre el total de folículos del campo óptico (% de folículos marcados). En el primer caso los datos no cumplían con el supuesto de homocedacea, por lo cual se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis. En cambio, en el segundo caso los datos sí cumplían con el supuesto y se analizaron mediante ANOVA de un factor seguido por contrastes *a posteriori*. Como muestra la figura 35, se observó que la proliferación es

significativamente mayor en el período R y PostR ($p= 0,05$ para '% de células foliculares marcadas', $p= 0,008$ para '% de folículos marcados').

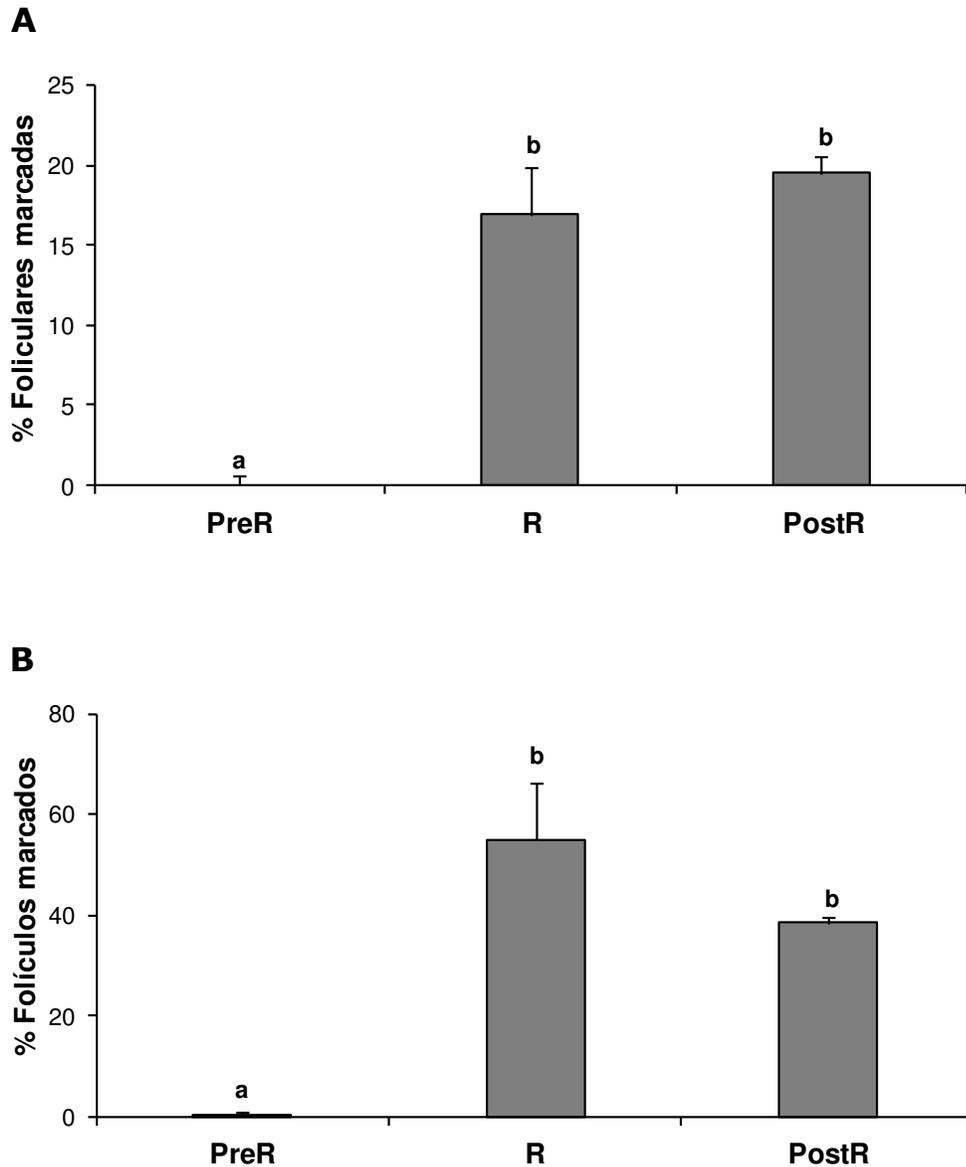


Figura 35: Variaciones estacionales en la proliferación celular de los BO de animales recolectados durante los períodos PreR ($n=5$), R ($n=3$) y PostR ($n=3$). En cada caso se analizaron 5 campos en cada sección y los valores se expresaron como la Media \pm EE. (A) Porcentaje de células foliculares inmunopositivas sobre el total de células foliculares de cada folículo observado. Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,05$). (B) Porcentaje de folículos con al menos una célula folicular inmunopositiva, sobre el total de folículos observados en el campo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,008$).

Estos resultados sugieren que el número de células foliculares en proliferación es significativamente mayor en los períodos R y PostR, cuando la actividad total de la enzima aromatasa y los niveles plasmáticos de E₂ son mayores que en el período PreR.

Discusión

Como se mencionó en la *Introducción*, los ciclos reproductivos de los anfibios pueden ser continuos o discontinuos (van Oordt, 1960). En los ciclos reproductivos continuos hay una producción constante de espermatogonias y de espermatocitos mientras que en los ciclos discontinuos las espermatogonias primarias pierden su capacidad mitótica en cierto momento del ciclo y, por lo tanto, los testículos solo poseen espermatozoides en un período particular del año. En general, las especies tropicales y subtropicales tienen un ciclo espermatogénico continuo mientras que las especies de zonas templadas poseen un ciclo discontinuo o potencialmente continuo (Rastogi y col., 1976; Lofts, 1987).

Las variaciones estacionales en la apoptosis de la línea germinal y en la proliferación celular durante la espermatogénesis se estudiaron en muy pocas especies de anfibios urodelos y anuros. En el primer caso, en *C. pyrrhogaster*, las espermatogonias secundarias entran en apoptosis durante el invierno y los testículos carecen de espermatozoides en el período de quiescencia, mientras que en *T. marmoratus* los espermatocitos primarios sufren apoptosis en el verano y las espermatogonias lo hacen en el invierno (Yazawa y col., 1999; Ricote y col., 2002). En el caso de los anuros, en *L. catesbeianus* se observa una elevada producción de espermatocitos durante el invierno seguida de meiosis, espermiogénesis y espermiación durante la primavera (Sasso-Cerri y col., 2004). En el mismo trabajo los autores observaron que la espermatogénesis se reiniciaba durante el verano. Sin embargo, en un trabajo posterior se detectó una elevada incidencia de apoptosis en los cistos testiculares durante el verano mientras que la apoptosis durante el invierno era mínima (Sasso-Cerri y col., 2006). Es importante señalar que estos estudios se realizaron en *L. catesbeianus* de áreas tropicales (Sasso-Cerri y col., 2004; 2006).

R. arenarum es una especie de anuro con un ciclo espermatogénico anual continuo. La onda espermatogénica comienza en octubre, mes en el que

se observa el máximo número de cistos de espermatogonias y finaliza en septiembre del año siguiente, cuando los testículos poseen el mayor número de matas de espermatozoides (Burgos y Mancini, 1948). Teniendo en cuenta que cuando los testículos poseen un máximo número de matas de espermatozoides los lóbulos testiculares también poseen cistos de espermatoцитos, existen al menos dos posibilidades: los espermatoцитos podrían mantenerse latentes hasta la próxima onda espermatogénica y continuar la espermatogénesis al año siguiente, o bien podrían ser eliminados por apoptosis.

En este contexto, y con el objetivo de contribuir al entendimiento de la regulación de la espermatogénesis en esta especie, se decidió estudiar las variaciones estacionales en la apoptosis de la línea germinal. En primera instancia, llamó la atención que las secciones testiculares que habían sido solamente desparafinadas, y que no habían sido sometidas al protocolo de la técnica utilizada para medir apoptosis, mostraban una autofluorescencia basal evidente en el compartimento intersticial. Este fenómeno podría estar relacionado con que diversos trabajos sugieren que las células de Leydig pertenecen al conjunto de células APUD (del inglés, '*Amine precursor uptake and decarboxylation system*'), muchas de las cuales se originan a partir de las células de la cresta neural (Angelova y col., 1991; Schulze y col., 1991; Davidoff y col., 1993; Ortega y col., 2004). Las células del sistema APUD son células neuroendocrinas que poseen descarboxilasas y que son capaces de captar sustancias precursoras de aminas. Algunos trabajos sugieren que las células APUD poseen una fluorescencia inducida por formaldehído (Sorokin y col., 1982; Rubin y Schwartz, 1984; Scheuermann y col., 1984; Sarikas y col., 1985) y por eso se podría pensar que la autofluorescencia en el compartimento intersticial es debida a la fijación empleada. Lamentablemente, la autofluorescencia del compartimento intersticial no permitió analizar si existen variaciones estacionales en la apoptosis de las células de Leydig, lo cual podría ser evaluado mediante otra aproximación experimental como por ejemplo TUNEL tradicional no asociado a fluorescencia. Debido a la autofluorescencia

observada, se decidió realizar en cada determinación, además de un control positivo y otro negativo, un '*Control de autofluorescencia*' a partir del cual se establecieron los parámetros del microscopio Confocal, de modo tal de fijar una autofluorescencia basal en el compartimento intersticial.

Los resultados expuestos en este capítulo muestran que la apoptosis en el testículo es significativamente mayor en el período PostR, que está comprendido entre los meses de enero y abril. De este modo, estos resultados coinciden con los observados en *L. catesbeianus*, ya que en ambas especies existe una alta incidencia de apoptosis en los testículos de individuos en los meses de verano mientras que los niveles de apoptosis durante el invierno son mínimos. Al analizar cuáles son los estadios de la espermatogénesis que sufren muerte celular, se observó que la apoptosis ocurre en los espermatocitos I, II y en las espermatidas. Cabe destacar que, a diferencia de lo que ocurre en los urodelos *T. marmoratus* y *C. pyrrhogaster*, en ningún individuo se observó apoptosis en las espermatogonias. De este modo, la apoptosis en esta especie ocurre en los estadios celulares más avanzados de la espermatogénesis y previos a la formación de espermatozoides. En urodelos, Ricote y col. (2002) propusieron que la ocurrencia de apoptosis en los períodos que no conducen a la espermiogénesis podría contrarrestar un exceso en la proliferación espermatogonial y en la mitosis. Además, podría ocurrir que haya una disminución de los factores regulatorios y de supervivencia y que las células de Sertoli no fueran capaces de mantener la homeostasis de los cistos. En este sentido, como propusieron Neubauer y col. (2004), la apoptosis podría actuar como un "mecanismo de control" para evitar, por ejemplo, la teratozoospermia. De todos modos, los resultados expuestos en este capítulo sugieren que los altos niveles de apoptosis en los espermatocitos y espermatidas durante el período PostR contribuyen a eliminar los cistos que no alcanzaron a formar matas de espermatozoides y, consecuentemente, las espermatogonias son las que continuarán con la espermatogénesis y formarán los estadios más avanzados de la siguiente onda espermatogénica.

Por otra parte, la espermatogénesis también está íntimamente relacionada con la proliferación de las células germinales. La proliferación de las espermatogonias se estudió en algunas especies de anfibios como *C. pyrrhogaster* y *P. esculentus* (Chieffi y col., 2000a, 2000b; Ferrara y col., 2004; Yuwen y col., 2008). Como se mencionó en la *Introducción*, la proliferación celular en la rana fue estudiada en numerosos trabajos, observándose una máxima proliferación durante el período reproductivo asociada a altos niveles de PCNA y de c-kit (Raucci y Di Fiore, 2007). En este capítulo se analizaron las variaciones estacionales en la proliferación de la línea germinal mediante la incorporación de BrdU y los resultados muestran que, al igual que lo que ocurre en *P. esculentus*, la proliferación de las espermatogonias es significativamente mayor durante el período R mientras que durante los períodos PreR y PostR la proliferación celular es baja. En consecuencia, durante el período R hay una baja incidencia de apoptosis y una elevada proliferación celular mientras que en el período PostR ocurre exactamente lo opuesto. Estos resultados, al igual que los observados en *P. esculentus*, concuerdan con la existencia de una correlación inversa entre la apoptosis y la proliferación de la línea germinal propuesta para algunas especies de mamíferos con ciclos reproductivos estacionales, como por ejemplo los ciervos y las liebres (Blottner y col., 1996; Strbenc y col., 2003). De este modo, la regulación y el equilibrio entre la apoptosis y la proliferación celular jugarían un rol esencial también en el ciclo espermatogénico de *R. arenarum*.

Los resultados expuestos en el *Capítulo 1* mostraron claramente que en esta especie los niveles plasmáticos de E₂ son elevados durante los períodos R y PostR, aunque alcanzan los valores máximos durante el período PostR. Esto coincide con la elevada proliferación de espermatogonias observada durante el período R y con los altos niveles de apoptosis testicular hallados en el período PostR descritos en este capítulo, sugiriendo un posible rol de los estrógenos en la regulación de la espermatogénesis de esta especie. Como se detalló en la *Introducción*, el control hormonal que ejercen los estrógenos sobre la espermatogénesis se estudió en diversas especies de anfibios, tales como *L.*

catesbeianus, *L. pipiens* y *P. esculentus*. Teniendo en cuenta estos antecedentes y que los resultados expuestos hasta aquí sugieren una posible relación entre el E_2 y la apoptosis testicular y la proliferación de la línea germinal, se evaluó la presencia del receptor de E_2 en el testículo mediante inmunohistoquímica. Como se mencionara en la *Introducción*, el receptor de estrógenos más conocido es un receptor nuclear del tipo I y tiene localización citoplasmática cuando no está unido a E_2 y nuclear luego de interactuar con el ligando. Por otra parte se han identificado dos isoformas, α y β . En nuestro modelo experimental se decidió analizar la presencia del receptor ER β debido a que esta isoforma ya había sido estudiada en relación a la actividad mitótica espermatogonial en *P. esculentus* y en *L. catesbeianus* (Stabile y col., 2006; Caneguim y col., 2013b). Para ello, se utilizó un anticuerpo anti ER β que había sido empleado para describir las variaciones estacionales en el ER β del testículo de *P. esculentus* (Stabile y col., 2006). En este último trabajo, se observó que la expresión del receptor en el testículo medida por westernblot es mayor en los meses correspondientes al período R. Con respecto a la localización celular, en el período R y PostR los autores describieron presencia de ER β en el compartimento intersticial y también en el germinal, particularmente en las espermatogonias, en los cistos de espermatocitos y espermátidas y en las células de Sertoli. Para el período PreR, los autores propusieron que en las espermatogonias, espermatocitos y espermátidas la inmunomarca era menos intensa que en los otros períodos. Los resultados expuestos en este capítulo también sugieren presencia de un receptor de E_2 similar al ER β en el compartimento intersticial y en el germinal, que fue analizado fundamentalmente en este último caso. Como muestra la Figura 23, las células de Sertoli asociadas a los penachos de espermatozoides exhiben una fuerte marcación con el anticuerpo. Además, se localizó el ER β s en las proyecciones citoplasmáticas de las células de Sertoli que rodean a los cistos de espermatogonias y de espermatocitos (Figura 24 y 26) así como también en los núcleos de algunas espermatogonias, espermatocitos y espermátidas (Figura 25). Sin embargo, a diferencia de lo observado en *P. esculentus*, estos últimos casos fueron mucho menos frecuentes que aquellos en los cuales la

inmunomarca se localiza en las células de Sertoli. Por otra parte, no se lograron establecer diferencias estacionales en la localización del receptor de E_2 . Estos resultados sugieren que cualquier rol que pudiera tener el E_2 en la regulación de la espermatogénesis sería principalmente mediante su acción sobre las células de Sertoli. De todos modos, si bien fueron muy pocos los casos en los que se observó $ER\beta$ s en los núcleos de las células germinales, no se puede descartar la posibilidad de algún efecto directo sobre ellas.

Como se explicó en el *Capítulo 1* de esta tesis, el BO es capaz de sintetizar E_2 a partir de sustratos endógenos y podría ser una de las principales fuentes de E_2 plasmático en esta especie. Teniendo en cuenta estos antecedentes, y con el objetivo de determinar si los estrógenos podrían regular también a este órgano, se analizó la presencia de $ER\beta$ s. Los resultados sugieren que el receptor de estrógenos se localiza en la periferia del citoplasma de los oocitos previtelogénicos del BO (Figuras 27-30). También se observó inmunomarca nuclear y perinuclear en algunos folículos en vitelogenénesis temprana en los BOs provenientes de sapos del período PreR (Figura 30). En los folículos vitelogénicos también se observó marca en el citoplasma de los oocitos y, mucho más intensamente, en la periferia asociada al vitelo. Sin embargo, dado que en el control negativo se observa cierta marca inespecífica, no se puede afirmar que esto corresponda al $ER\beta$ s (Figura 27). Finalmente, el $ER\beta$ s también se detectó en el citoplasma de las células foliculares (Figura 30). Este tipo celular es el encargado de producir estrógenos en la mayoría de los vertebrados y la presencia del $ER\beta$ s sugiere una posible regulación autocrina y justificaría la acción de sustancias similar E_2 en la regulación de dichas células. Además, como ya se dijera, las células foliculares expresan diversas enzimas esteroideogénicas (Scaia y col., 2011; Sassone y col., 2014) y la presencia de $ER\beta$ s en dichas células podría sugerir que los estrógenos participan en la regulación de la esteroideogénesis bidderiana. La presencia de $ER\beta$ s en el ooplasma y en los núcleos de los oocitos de los BO constituye un resultado sorprendente, si bien este no es el primer caso en el que se detectan receptores de hormonas esteroideas en el ooplasma de oocitos, aunque sean

ováricos. Se ha localizado el receptor de andrógenos en el citoplasma de oogonias y de oocitos en roedores, sugiriendo que los andrógenos pueden tener un rol importante en la regulación de la oogénesis (Galas y col., 2003, para una revisión acerca del rol de los andrógenos en el desarrollo de los oocitos ver Gervásio y col., 2014). También se encontró ER β en ovario de ratón y de cerdo, aunque sólo en el primer caso la inmunomarca se localizó en el citoplasma de los oocitos, sugiriendo que el ER β tiene diferentes roles en los ovarios de ambas especies (Zhao y col., 2008).

Por otro lado, la localización nuclear y perinuclear en los BO de machos de *R. arenarum* durante el período PreR sugiere que, en estos casos, el ER β s se encontraría unido a E₂. La localización nuclear en estos individuos del período PreR, pero no de los otros períodos, resulta sorprendente debido a que los niveles plasmáticos de E₂ en este momento del año son mínimos. Si se tiene en cuenta que las concentraciones de esta hormona son mayores en los períodos R y PostR, hubiera sido esperable hallar una localización nuclear del ER β s unido a su ligando en estos dos períodos. Sin embargo, los resultados de esta tesis sugieren una tendencia contraria. Una explicación posible surge de considerar el proceso vitelogénico. La localización nuclear del ER β s durante el período PreR se detecta en los oocitos vitelogénicos tempranos y podría ocurrir que el E₂ asociado a los componentes del vitelo que ingresan a los oocitos contribuya a un aumento en la concentración intra oocitaria de estrógenos. Si esto fuera así, el aumento de E₂ podría inducir un incremento en la translocación del receptor.

De todos modos, la presencia de ER β s en los oocitos del BO sugiere la posibilidad que el E₂ producido por este órgano participe en la regulación del crecimiento oocitario. Esto explicaría por qué el tratamiento con E₂ o con sustancias feminizantes símil E₂, como el herbicida atrazina, induce el crecimiento del BO. En individuos capturados en zonas con alta actividad agrícola y uso intensivo de herbicidas, los BO poseen oocitos vitelogénicos (McCoy y col., 2008). Los autores sugieren que esto es debido a que los testículos de estos animales no producen las sustancias responsables de inhibir la

vitelogénesis y en consecuencia el crecimiento de los oocitos. Sin embargo, ciertos agroquímicos poseen función estrogénica y, en vista de los resultados mostrados en este capítulo, se podría pensar que el mayor desarrollo de los BO en animales capturados en áreas agrícolas sea debido a la presencia de sustancias estrogénicas en el medio y al ER localizado en los oocitos bidderianos.

Cabe destacar que en esta tesis se analizó la localización del ER β s en testículo y en el BO debido a que es la principal isoforma estudiada en el testículo de anfibios. Sin embargo, sería importante evaluar también la presencia de ER α y de receptores de membrana tales como GPR30 (Nelson y Habibi, 2013; para una revisión sobre GPR30 y la espermatogénesis en mamíferos, ver Chimento y col., 2014).

En el *Capítulo 1* de esta tesis se mostró que no existe una correlación significativa entre los valores de E₂ plasmático y el peso de los BO, ni entre la actividad total de la enzima aromatasa y el peso de estos órganos. Por lo tanto, se propuso que la mayor o menor producción de E₂ por parte del BO no está relacionada con el peso o el tamaño total de estos órganos sino con otros factores, como por ejemplo la cantidad de células foliculares. Es por ello que en este capítulo se analizaron también las variaciones estacionales en la proliferación celular del BO mediante la incorporación de BrdU. Como se mencionara en la sección de *Materiales y Métodos*, los resultados se expresaron de dos maneras diferentes, como el porcentaje de células foliculares marcadas en cada folículo y como el porcentaje de folículos en proliferación, con al menos una célula folicular inmunomarcada. Esto se realizó con el objetivo de independizarse del número de células foliculares en cada folículo y el hecho de haber obtenido resultados similares con ambos modos de expresión otorga mayor verosimilitud a los resultados. Los resultados indican que la proliferación de las células foliculares es significativamente mayor en los períodos R y PostR (Figura 35). El hecho de que la proliferación celular en este órgano sea menor durante el período PreR, cuando los niveles plasmáticos de E₂ y la actividad total de aromatasa son también menores, constituye una

evidencia más de que el aporte de los BO a las concentraciones plasmáticas de E_2 no está relacionado con el peso o tamaño total de los órganos sino probablemente con la cantidad de células foliculares en cada folículo. Cabe destacar también que si bien durante el período PreR la proliferación de las células foliculares fue mucho menor, en este período se observó inmunomarca de BrdU en los núcleos de los oocitos de algunos sapos, lo cual no se observó en ningún individuo analizado durante los períodos R y PostR (Figura 34). Estos resultados sugieren que durante el período PreR habría síntesis de ADN en los oocitos del BO. Esto podría explicarse por la duplicación del ADN en los oocitos durante la interfase previa a la profase I. Si bien en esta tesis no se realizó un estudio exhaustivo de la morfología nuclear de los oocitos, estos resultados sugieren que ocurre replicación de ADN en oocitos de los BO de sapos recolectados durante el período PreR.

Independientemente de las variaciones estacionales en el BO, es importante mencionar que este es el primer trabajo en el cual se describe la presencia del ER β s en este órgano. Tampoco se había detectado proliferación en células foliculares ni en los oocitos del BO en ninguna de las especies de bufónidos estudiadas. Como se mencionó en la *Introducción*, el BO se desarrolla en larvas con anterioridad a la diferenciación gonadal y además es funcional en lo que respecta a la síntesis de estrógenos, lo cual le asigna un rol importante en la dirección de la diferenciación gonadal (Sassone y col., 2014). Además, en esta tesis se demuestra la presencia de ER β s y de células en activa proliferación en el BO y que este órgano no sólo es capaz de sintetizar E_2 a partir de sustratos endógenos sino que podría ser una de las principales fuentes de E_2 plasmático en machos de *R. arenarum*. Teniendo en cuenta estos antecedentes, resulta evidente que el BO no es un "ovario atrofiado" tal como se lo describió históricamente, ya que no se trata ni de un ovario ni de un órgano atrofiado.

V. Capítulo 3

*Efecto del estradiol sobre la
esteroidogénesis testicular y la
espermatogénesis.*

V. Efecto del estradiol sobre la esteroidogénesis testicular y la espermatogénesis

Materiales y Métodos

Animales y obtención de plasma y tejidos

Se emplearon 50 sapos recolectados entre los años 2012 y 2014. Los animales fueron mantenidos, alimentados y anestesiados tal como se describió en el *Capítulo 1*. La obtención de plasmas y tejidos se llevó a cabo como se detalló anteriormente. En este caso no se utilizaron los BO sino que se extrajeron sólo los testículos, que fueron procesados según las características de cada protocolo.

Tratamiento de los fragmentos testiculares con estradiol

Estos experimentos se llevaron a cabo con el objetivo de analizar el efecto del E_2 sobre algunos aspectos de la fisiología testicular de *R. arenarum* como la actividad de dos enzimas esteroidogénicas, la apoptosis y proliferación celular. Para ello, los testículos se cortaron en fragmentos homogéneos de aproximadamente 2 mm y se procesaron en condiciones de esterilidad. Se juntaron todos los fragmentos de ambos testículos y luego se separaron en tantos grupos como tratamientos, de modo tal que ambos testículos estuvieran representados en cada tratamiento. Los fragmentos testiculares se cultivaron en medio L15-Hepes por 24 hs, sin y con dos concentraciones de E_2 (Grupos experimentales: control, 2 nM E_2 y 20 nM E_2).

Medición de la actividad del CypP450_{c17}

Para estudiar el efecto del E_2 sobre la actividad de la enzima CypP450_{c17} se analizaron 20 animales (PreR: n=6, R: n=7, PostR: n= 7). La homogeneización del tejido y la cuantificación de las proteínas se llevaron a cabo tal cual fuera descripto para la medición de la actividad de aromatasa. Se trabajó en concentraciones de saturación de sustrato empleando para ello pregnenolona- H^3 10 μ M (y 300.000 dpm). El marcador radioactivo utilizado fue

[7(n)- H³] pregnenolona (18 Ci/mmol; NEN, Boston, Massachusetts, EEUU). Esta enzima, al igual que la enzima aromatasa, utiliza NADPH como cofactor, por lo cual se empleó el mismo sistema regenerante de NADPH que el detallado en el *Capítulo 1*. Como control del estado del sustrato radioactivo se realizó un blanco carente de tejido. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La incubación, extracción y separación de los esteroides se llevó a cabo como ya fuera descrito para la actividad de aromatasa en el *Capítulo 1*. En este caso, los estándares empleados fueron el sustrato pregnenolona y los dos productos secuenciales, 17-hidroxipregnenolona (17-P5) y dehidroepiandrosterona (DHE). Para la detección, se cromatografiaron además 25 µg de pregnenolona, 23 µg de DHE y 23 µg de 17-P5. El sistema de solventes utilizado, el revelado y la medición de la radioactividad se llevaron a cabo del mismo modo que para la medición de la actividad de aromatasa. La actividad de hidroxilasa se calculó sumando ambos productos secuenciales. Para calcular la actividad de liasa sólo se consideró la producción de DHE. La actividad enzimática se expresa en pmoles de producto por minuto por mg de proteínas.

Medición de la cantidad de proteína del CypP450_{c17} mediante Western Blot

Para evaluar los cambios en la cantidad total de la enzima CypP450_{c17} en los fragmentos de tejido sometidos a distintos tratamientos se realizó el Western blot con el homogenato completo. Se analizó el tejido proveniente de 15 animales (PreR: n=5, R: n=5, PostR: n=5). Los fragmentos de testículo se homogeneizaron en el Buffer de homogenización en una proporción aproximada de 1 ml de buffer por cada 150 mg de tejido. Los homogenatos se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C para precipitar el las células enteras. Se cuantificó el contenido proteico por el método de Bradford (1976). Los homogenatos se guardaron a -80°C hasta el momento de su análisis por western blot.

Para realizar el ensayo, se mezclaron 80 µg de proteínas con el buffer de siembra, se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a 12.000 g por 2 minutos. Las muestras se sembraron en un gel de poliacrilamida 10% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) junto con una mezcla de marcadores de peso molecular coloreados (SeeBlue, Invitrogen, EEUU) y se corrieron durante 160 minutos a 130 V. Luego de la electroforesis, las proteínas se transfirieron, utilizando un sistema de transferencia húmedo durante 90 minutos a 300 mA, a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Hybond LFP, Amersham, EEUU). La efectividad de la transferencia se corroboró por una tinción con rojo Ponceau. Luego de la transferencia, las membranas se colocaron en una solución de buffer PBS-T con 3% de peróxido de hidrógeno durante diez minutos y los sitios inespecíficos se bloquearon con 5% de leche en polvo descremada en PBS-T durante 90 minutos, realizando breves lavados con PBS-T entre ambos bloqueos. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación con anticuerpo primario policlonal realizado en conejo contra los aminoácidos 331-410 cercanos al extremo C-terminal de la proteína Cyp450c17 de ratón (Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU). Se utilizó una dilución de 0,4 µg/ml preparada en PBS-T con 2% leche descremada. Luego de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron incubadas con PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y luego con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a HRP (Chemicon Internacional, EEUU) en una dilución 0,152 µg/ml en PBST durante una hora a temperatura ambiente y se realizó un último lavado en PBST durante 45 minutos.

Considerando que existen diferencias de carga entre las calles, las bandas inmunoreactivas de CypP450c17 fueron relativizadas a la correspondiente banda de β-actina, que fue utilizada como control de carga. Para ello, se utilizó un anticuerpo primario monoclonal anti β-actina (Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU) en una dilución 0,125 µg/ml en PBS-T con 2% leche descremada y un anticuerpo secundario anti IgG de ratón acoplado a HRP 0,1 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU). Las bandas fueron visualizadas por un sistema de detección de quimioluminiscencia utilizando el buffer de revelado en un

detector de quimioluminiscencia Fujifilm LAS-1000 y las imágenes se obtuvieron mediante el equipo Fujifilm Luminiscent Image. El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el programa ImageGauge (Fuji photo film CO., LTD, Altura Software, Inc. EEUU).

Medición de la actividad 3 β HSD/I

Para evaluar el efecto del E₂ sobre la actividad de la enzima 3 β HSD/I se analizó un número total de 15 animales (PreR: n=6, R: n=4, PostR: n=5). La medición de esta actividad enzimática se realizó como fuera descrito por Pozzi y col. (1997). Brevemente, los fragmentos de testículo se homogeneizaron en buffer 3 β HSD/I en una proporción aproximada de 1 ml de buffer por 150 mg de tejido. El contenido proteico se cuantificó por el método de Bradford (1976). Dado que esta enzima emplea NAD⁺ como cofactor, en cada ensayo se utilizó NAD⁺ 0,5 mM. Para trabajar en condiciones de saturación, se empleó una concentración de 25 μ M de pregnenolona-H³ (y 300.000 dpm) como sustrato. El marcador radioactivo utilizado fue [7(n)- H³] pregnenolona (18 Ci/mmol; NEN, Boston, Massachusetts, EEUU). Se realizó un blanco sin tejido y cada muestra se analizó por triplicado. La incubación, extracción y separación de los esteroides se llevó a cabo como fue descrito anteriormente. En este caso, los estándares empleados fueron pregnenolona (25 μ g) y progesterona (4 μ g), respectivamente sustrato y producto de la enzima 3 β HSD/I. El sistema de solventes utilizado, el revelado y el conteo de radioactividad se llevó a cabo como se describió anteriormente. La actividad enzimática se expresa en nmoles de progesterona por minuto por mg de proteínas.

Procesamiento del material para histología e inmunohistoquímica

Tanto para histología convencional como para inmunohistoquímica se siguió el protocolo explicado en el *Capítulo 2*.

Estudio de apoptosis

Con el objetivo de determinar el efecto del tratamiento de E₂ sobre la apoptosis de la línea germinal, luego de las incubaciones con E₂ los fragmentos

testiculares se procesaron para inmunohistoquímica y luego se determinó la apoptosis mediante la técnica de TUNEL con fluorescencia tal como fuera detallado en el *Capítulo 2*. La determinación de los estadios de la espermatogénesis se realizó según Rastogi y col (1976).

Proliferación celular

Con el objetivo de determinar el efecto del tratamiento con E_2 sobre la proliferación celular, luego de las incubaciones ya descriptas se trataron los fragmentos testiculares con 1 mM de 5-Bromo-2'-Deoxyuridina (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 1 hora a 37°C y se procesaron tal cual fuera descripto en el *Capítulo 2*. La proliferación celular se expresó como el porcentaje de cistos de gonias inmunomarcados sobre el total de cistos de gonias dentro de cada lóbulo, y también sobre el total de cistos en todos los estadios de la espermatogénesis. Se analizaron 5 lóbulos de 5 animales de cada período, y los resultados se expresaron como la media \pm EE.

Análisis estadístico de los resultados

Las actividades enzimáticas y la cantidad de proteína del CypP450c17 se expresan como una relación entre los valores post tratamiento y los correspondientes al tiempo cero. Los datos de las actividades de la enzima CypP450c17 y la cantidad de la proteína se analizaron y compararon mediante ANOVA de dos factores fijos (*Período* y *Tratamiento con E_2*). Con el objetivo de analizar si los distintos perfiles de respuesta al tratamiento con E_2 tienen relación con los niveles de E_2 plasmático, se compararon las concentraciones hormonales de cada grupo mediante el test de Kruskal-Wallis, en el caso que hubiere tres grupos de perfiles de respuesta, o el test Wilcoxon, en el caso en que hubiere dos grupos de perfiles de respuesta. Este análisis debió realizarse mediante estadística no paramétrica debido a que los datos no cumplían con el supuesto de homocedasticidad. La actividad de la enzima 3β -HSD/I en los tres períodos se comparó mediante un ANOVA de un factor (*Período*). El efecto de E_2 sobre la actividad de la enzima 3β -HSD/I se analizó mediante ANOVA de un factor (*Tratamiento con E_2*) para cada período, corregido mediante Bonferroni,

y un contraste *a posteriori* mediante el test de Tukey (Steel y Torrie, ,80). Para analizar si los distintos perfiles de respuesta de 3 β -HSD/I al tratamiento con E₂ tienen relación con los niveles de E₂ plasmático se realizó un test t-Student en el período PreR, dado que hay un solo grupo de perfiles de respuesta en cada uno de los otros períodos. El efecto de E₂ sobre la apoptosis y la proliferación celular se analizó mediante ANOVA de un factor fijo (*Tratamiento*) para cada período y un contraste *a posteriori* mediante el test de Tukey.

Medios de incubación y soluciones buffer utilizados

Medio DMEM (Invitrogen-GIBCO, EEUU): estéril, con el agregado de 10% de suero fetal bovino tratado con carbón-dextrano, Hepes 10 mM, antibióticos (1000 UI/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina) y antimicótico (0,25 mg/ml de anfotericina B), pH 7,4. El suero fetal bovino fue inactivado a 55 °C durante una hora previo a la extracción de los esteroides mediante una mezcla de carbón dextrano (2 %:0,2 % p/v) en PBS.

Medio L15 (de Leibovitz, Sigma-Aldrich, EEUU): estéril, con el agregado de 10% de suero fetal bovino tratado con carbón-dextrano, Hepes 10 mM, glucosa 60 mM, antibióticos (1000 UI/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina) y antimicótico (0,25 mg/ml de anfotericina B), pH 7,4.

Buffer para actividad de la enzima CypP450c17: Buffer fosfato de sodio 50 mM, EDTA 0,1 mM, MgCl₂ 3mM, pH 7,4.

Buffer de homogenización para medición de la proteína CypP450c17por westernblot: Buffer fosfato de sodio 50 mM, EDTA 0,1 mM, MgCl₂ 3mM, PMSF 0,1 mM, pH 7,4.

Buffer para actividad de la enzima 3βHSD/I: Buffer Tris-Cl 10 mM, EDTA 0,1 mM, sacarosa 0.25 M, β-mercaptoetanol 0.4 mM, pH 7,4

Buffer para radioinmunoensayo de E₂: Buffer fosfato salino 10 mM (PBS), gelatina 0,1 % p/v, NaCl 140 mM, azida sódica 0,1 % p/v, pH 7,4.

Buffer de siembra: Tris-Cl 40 mM, dodecilsulfato sódico 2% p/v, glicerol 4 % v/v, azul de bromofenol 0,001 % p/v, β-mercaptoetanol 2 mM, pH 6,8.

PBS-T: Buffer fosfato salino 10 mM, tween-20 0,5 % v/v.

Buffer de revelado: Luminol 1,25 mM, ácido cumárico 0,198 mM, peróxido de hidrógeno 0,038 % v/v (100 volúmenes) en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 8,0.

Líquido de Bouin: Solución acuosa saturada de ácido pícrico 70 % p/v, formaldehído 25 % v/v, ácido acético 5 % v/v.

Hematoxilina de Carazzi: Hematoxilina 0,1 % p/v, sulfato doble de aluminio y potasio 5 % p/v, iodato de potasio 0,02 % p/v, glicerina 20 % v/v.

Eosina acuosa: Eosina 0,1 % p/v.

Resultados

Efecto del E₂ sobre las enzimas esteroideogénicas testiculares

Para analizar el efecto de E₂ sobre la esteroideogénesis testicular, se incubaron fragmentos de testículo con o sin E₂ (2 nM y 20 nM) durante 24 hs y luego del tratamiento se realizaron las determinaciones enzimáticas, tal como se describió en *Materiales y Métodos*. La dosis de 2 nM corresponde a los valores de E₂ plasmáticos del período reproductivo mientras que la dosis de 20 nM corresponde a la concentración a la cual los receptores de esta hormona alcanzan la saturación, tal cual lo establecen resultados previos del laboratorio. Debido a la gran variabilidad entre los individuos, los valores enzimáticos se expresaron relativos al valor de la actividad enzimática inicial. En primer lugar se analizó la enzima CypP450c17 ya que, como se explicó en la *Introducción*, esta enzima es fundamental para la producción de andrógenos y su regulación es la que determina, al menos en parte, la caída de andrógenos plasmáticos durante el período R de *R. arenarum*.

En primer lugar, y para disminuir la variabilidad, se intentó realizar un análisis factorial por bloques, en el cual *Individuo* era la variable de bloqueo. Esto no fue posible debido a que en todos los casos se observó una interacción significativa, es decir que los individuos respondieron de modo distinto al tratamiento con E₂. Es por ello que se estudiaron los datos con mayor detenimiento y se analizó si la dispersión en los datos podía estar relacionada con distintas concentraciones de E₂ plasmático en los individuos estudiados. Si los animales difirieran en la concentración de E₂ podría entonces ocurrir que la respuesta estuviera más o menos saturada al extraer el tejido. Como muestran las Figuras 36 (actividad de 17-hidroxilasa) y 37 (actividad de liasa), dentro de cada período los perfiles de respuesta pueden separarse en dos o tres poblaciones de datos, según el caso. Se analizaron entonces los valores de E₂ plasmático dentro de cada población de datos mediante el análisis de Kruskal-Wallis o Wilcoxon, según correspondiera. Cabe destacar que no se realizó un análisis paramétrico debido a que los datos no cumplían con el supuesto de

homocedasticidad. En todos los casos se observó que los valores de E_2 plasmático de los distintos grupos dentro de cada período no variaban significativamente (Tabla 3). Es decir, la variabilidad en la respuesta de los distintos individuos al tratamiento con E_2 no parecería estar relacionada con las distintas concentraciones de E_2 plasmático. Esto indica que otras variables no contempladas en esta tesis influyen en los perfiles de respuesta de la enzima CypP450c17 de cada individuo al tratamiento con E_2 . Cabe destacar que no resulta sorprendente que los animales hayan mostrado distintos perfiles de respuesta al tratamiento. Es importante recordar que en esta tesis se trabajó con animales adultos provenientes de poblaciones naturales y que si bien se los mantiene en un bioterio antes de realizar los experimentos, pueden haber estado expuestos a distintos factores y condiciones ambientales a lo largo de su vida. Esta exposición diferencial podría afectar en mayor o menor medida a su sensibilidad al tratamiento. Por lo tanto, era posible que los individuos mostrasen una distribución en la respuesta y que los datos no fuesen tan homogéneos como podría ser una población de ratas o ratones concebidos y criados en un bioterio en condiciones controladas.

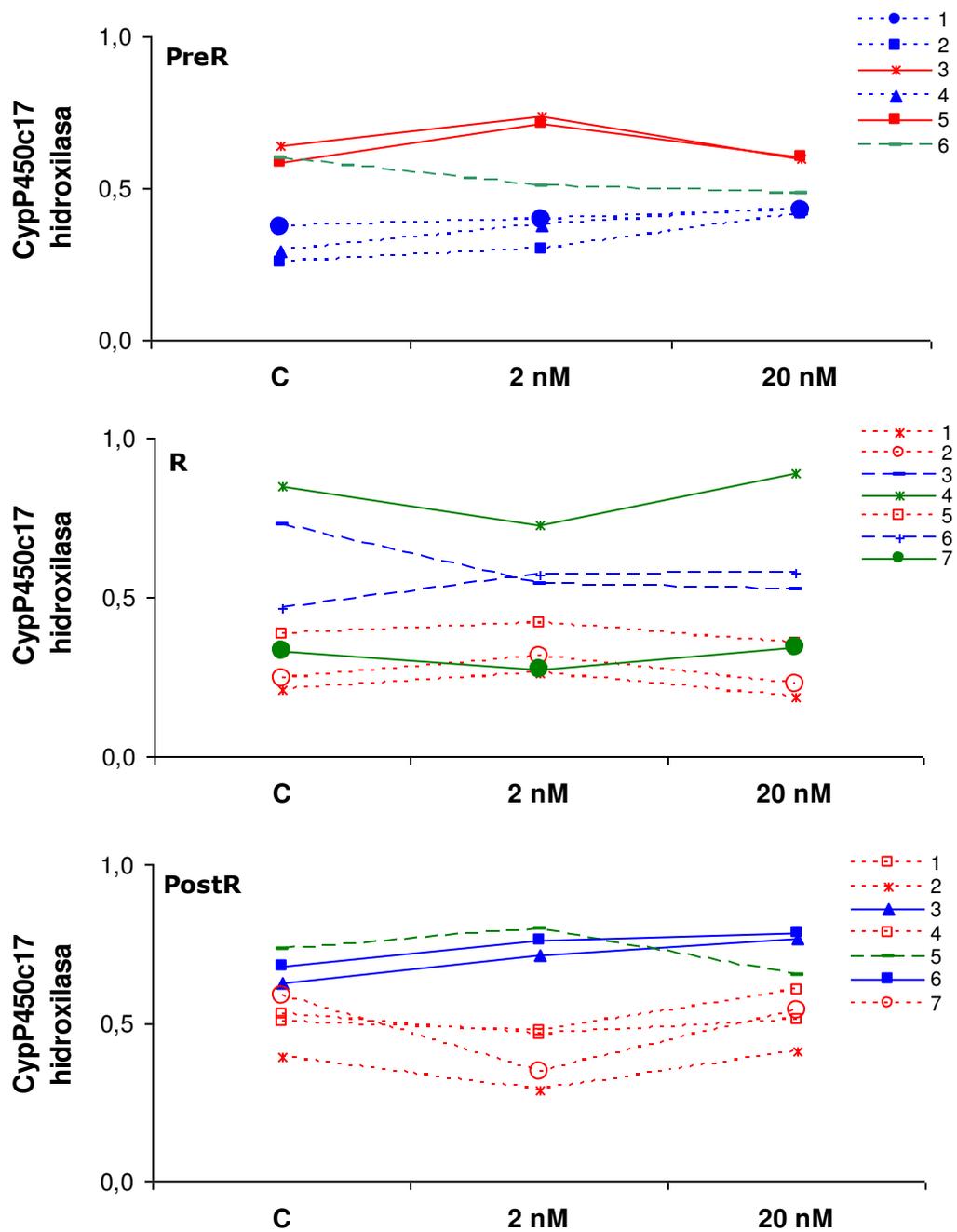


Figura 36. Efecto de E₂ sobre la actividad de hidroxilasa del CypP450c17 en cada período del año. En estos gráficos se representan todos los animales estudiados. Dentro de cada gráfico puede observarse claramente la separación de perfiles de respuesta al tratamiento en distintos grupos.

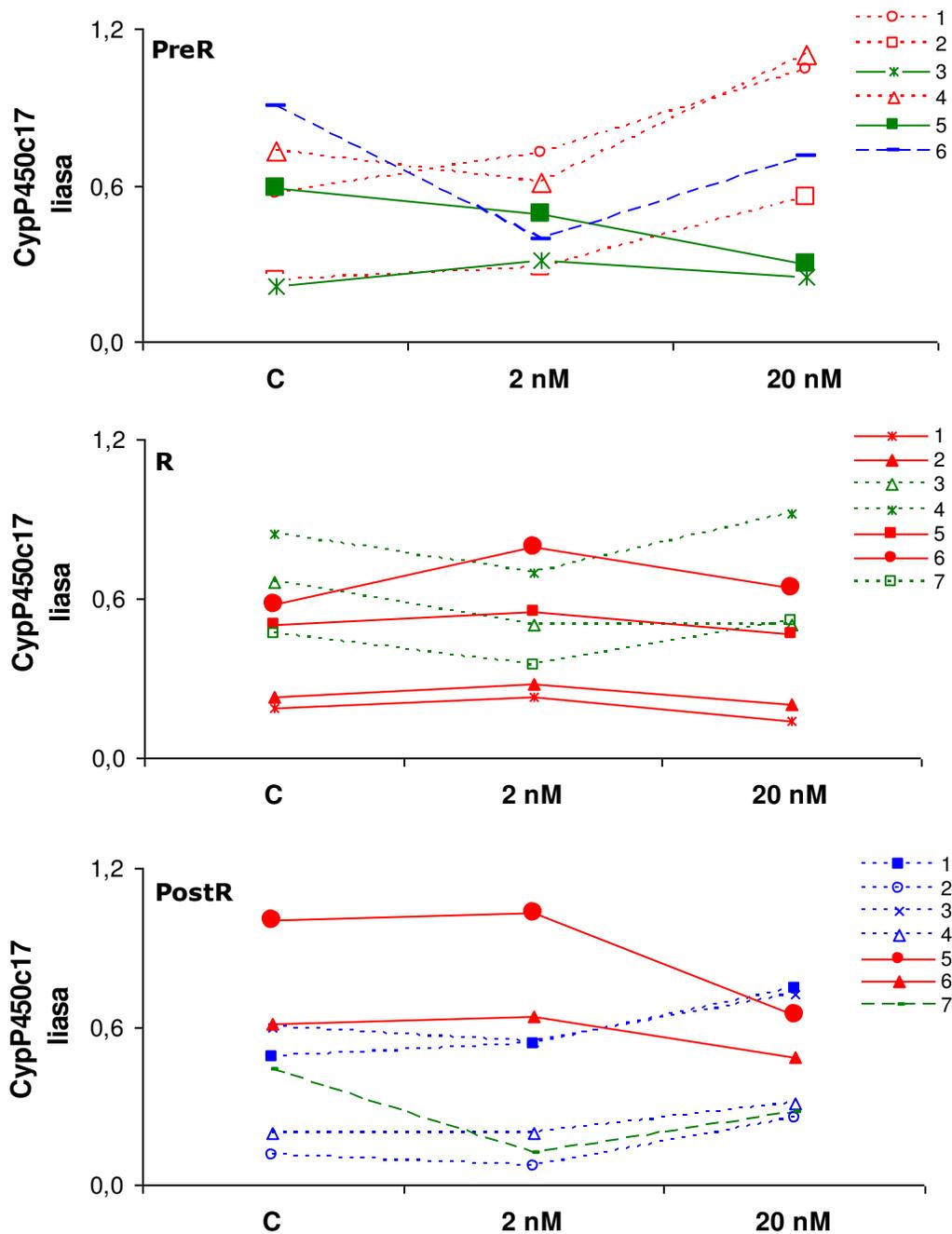


Figura 37. Efecto de E₂ en la actividad de liasa del CypP450c17 en cada período del año. En estos gráficos se representan todos los animales estudiados. Dentro de cada gráfico puede observarse claramente la separación de perfiles de respuesta al tratamiento en distintos grupos.

A	Período	Grupo	Individuos	E₂ plasmático	p
	PreR	1	3, 5	406,4	> 0,9999
		2	1, 2, 4	424,8	
		3	6	419,11	
	R	1	1, 2, 5	457,0	0,7333
		2	4, 7	663,7	
		3	3, 6	396,0	
	PostR	1	5	296,3	0,7810
		2	3, 6	478,9	
		3	1, 2, 4, 7	509,6	
B	Período	Grupo	Individuos	E₂ plasmático	p
	PreR	1	1, 2, 4	424,8	0,3333
		2	3, 5	619,1	
		3	6	419,1	
	R	1	1, 2, 5, 6	457,0	0,8
		2	3, 4, 7	574,5	
	PostR	1	1, 2, 3, 4	568,7	0,1714
		2	5, 6	374,3	
		3	7	269,2	

Tabla 3. Concentraciones plasmáticas de E₂ en cada grupo de perfiles de respuesta de la actividad de CypP450c17 hidroxilasa (A) y liasa (B) al tratamiento con E₂. Las concentraciones plasmáticas se determinaron mediante radioinmunoensayo y se expresan como pg de E₂ por ml de plasma. En esta tabla se expresan las medias para cada grupo y los valores se analizaron mediante Kruskal-Wallis o Wilcoxon, según corresponda.

Finalmente, y dado que no fue posible realizar un análisis factorial mediante bloques, se optó por realizar un ANOVA de dos factores (*Tratamiento con E₂* y *Período*). En el caso de la actividad de hidroxilasa se observó una interacción no significativa entre ambos factores ($p= 0,9896$) y los efectos principales también fueron no significativos ($p= 0,9955$ para *Tratamiento*; $p= 0,0986$ para *Período*). En el caso de la actividad de liasa se observaron los mismos resultados, solo que con distinta significancia ($p= 0,8850$ para

Interacción, $p= 0,4566$ para *Tratamiento*, $p= 0,1359$ para *Período*). Como se observa en la Figura 38, estos resultados sugieren que el tratamiento con E_2 no tiene efecto sobre ninguna de las actividades de la enzima CypP450_{c17} testicular a lo largo de todo el año.

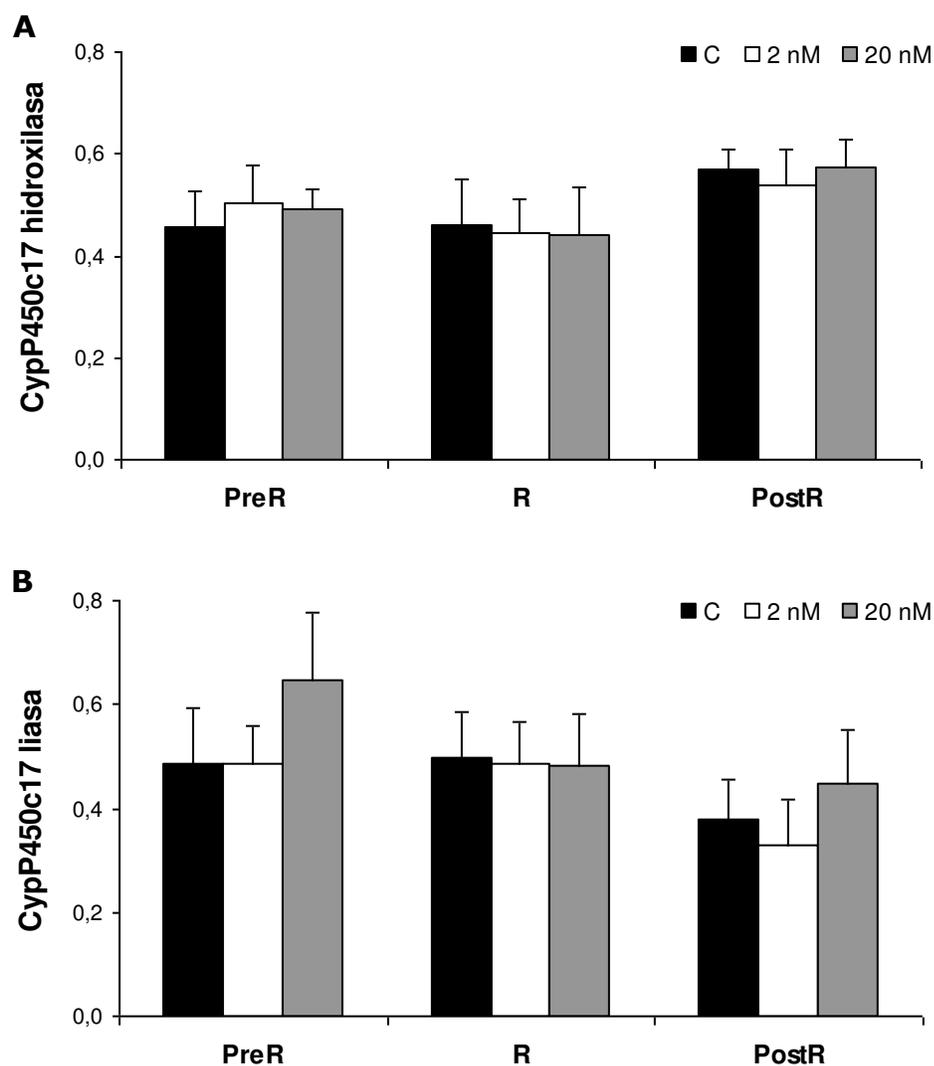


Figura 38. Valores de las actividades de la enzima CypP450c17 luego del tratamiento con E_2 . Las determinaciones se realizaron como fuera detallado en *Materiales y Métodos*. Los resultados de la actividad enzimática luego del tratamiento se expresaron como una proporción referida a la actividad enzimática inicial y los resultados se expresan como la Media \pm EE. (A) Actividad de hidroxilasa. (B) Actividad de liasa.

Se analizó también el efecto de E_2 sobre la expresión de la proteína CypP450c17 mediante la técnica de Western blot. Para ello se empleó un anticuerpo policlonal hecho contra los aminoácidos 331-410, cercanos al extremo C-terminal de la proteína CYP17A1 de ratón. Estudios anteriores de nuestro laboratorio analizaron que esta secuencia de ratón posee alta homología con diversas especies de anfibios (*X. laevis*, *Silurana tropicalis*, *R. rugosa*, *Rana dybowskii*). En el análisis del Western blot se realizó un control positivo utilizando homogenato de ratón y se detectó una banda inmunorreactiva de un peso molecular de aproximadamente 60 KD, que es similar al peso molecular reportado para esta proteína en ratón (Figura 39 C).

Al igual que los datos de actividad de CypP450c17, los resultados de la cantidad de proteína del CypP450c17 se expresaron referidos al tiempo cero y se analizaron mediante ANOVA de dos factores (*Período* y *Tratamiento con E_2*). La Figura 39 muestra que la cantidad de CypP450c17 no varía en los distintos períodos y que, además, el tratamiento con E_2 no afecta la expresión de esta enzima ($p= 0,9917$ para *Período*, $p= 0,6209$ para *Tratamiento con E_2*).

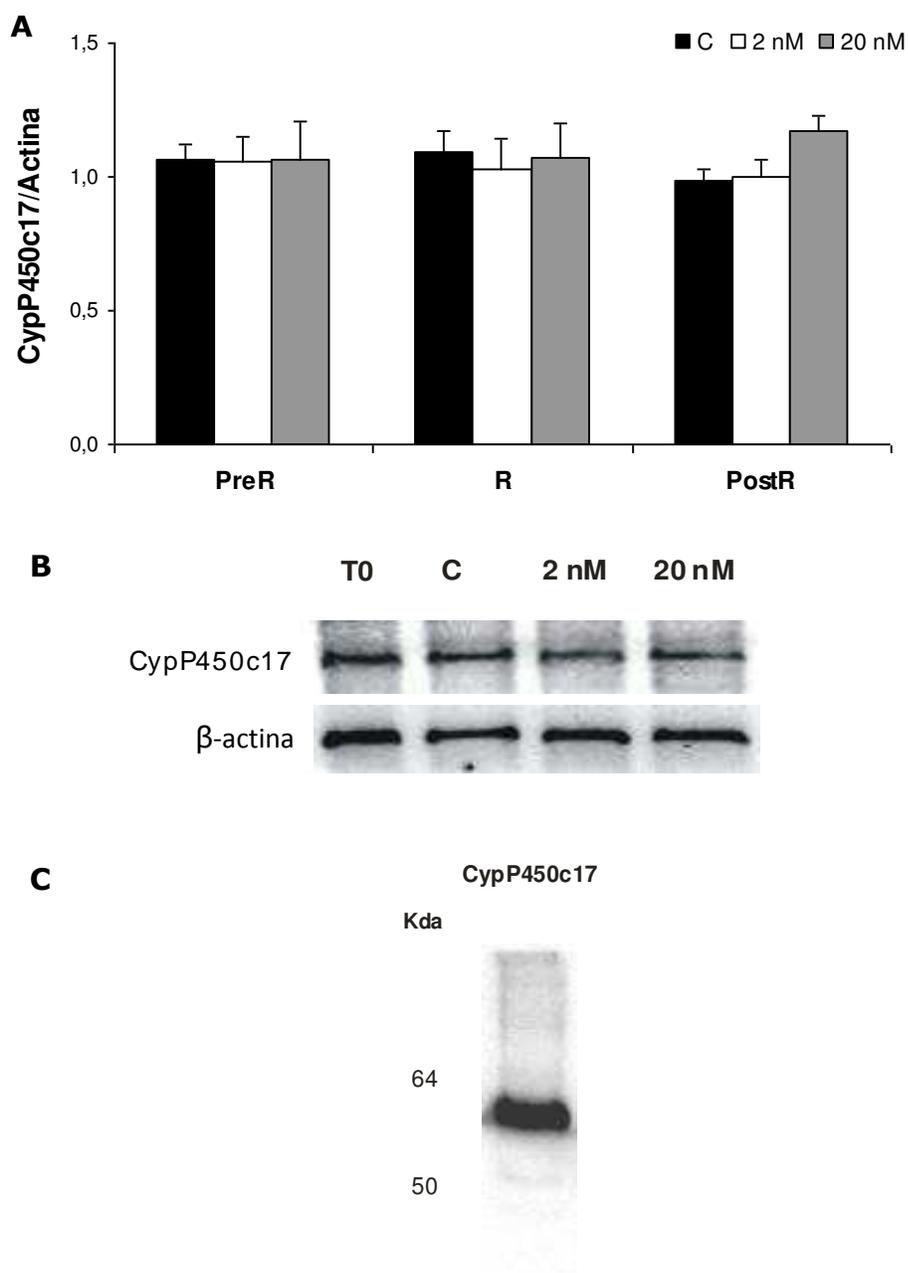


Figura 39. Efecto del tratamiento con E_2 sobre la expresión de la proteína CypP450c17 determinada por Western blot, como se indica en *Materiales y Métodos*. (A) El análisis densitométrico se realizó con el programa ImageGauge. La cantidad de proteína CypP450c17 se expresó como una proporción sobre los valores iniciales a tiempo cero y como control de carga se utilizó β -actina. Los resultados se expresan como la Media \pm EE. PreR: n=5, R: n=5, PostR: n=5. (B) Esta figura muestra la membrana correspondiente a un experimento representativo. (C) Control positivo utilizando homogenato de ratón.

Por otra parte, se analizó el efecto de E_2 sobre la actividad de la enzima 3β -HSD/I. Al igual que para el CypP450c17, debido a la variabilidad de los datos se intentó realizar un ANOVA por bloques pero esto no fue posible dado que en este caso también se observó una interacción significativa, es decir, los individuos respondieron de modo distinto al tratamiento con E_2 . Nuevamente, esto no resulta sorprendente debido a que se trata de animales adultos provenientes de poblaciones naturales que probablemente tengan mayor o menor sensibilidad al tratamiento y, por lo tanto, era esperable que los individuos muestren una distribución en la respuesta.

Por otra parte, como se muestra en la Figura 40, los perfiles de respuesta al tratamiento para la actividad de 3β -HSD/I pueden separarse en dos poblaciones de datos solo en el período PreR, dado que en el R y PostR los sapos responden al tratamiento de un modo más homogéneo. Al analizar estos datos mediante estadística paramétrica, se observó que el E_2 no varía significativamente entre los individuos de ambos grupos aunque se observa una clara tendencia al incremento de los niveles plasmáticos de E_2 en los animales del grupo que más responden, lo cual resulta difícil de explicar (Tabla 4). Por lo tanto, al igual que en el caso del CypP450c17, esta variabilidad en la respuesta al tratamiento con E_2 no parecería estar relacionada con los distintos niveles de E_2 plasmático, por lo menos significativamente.

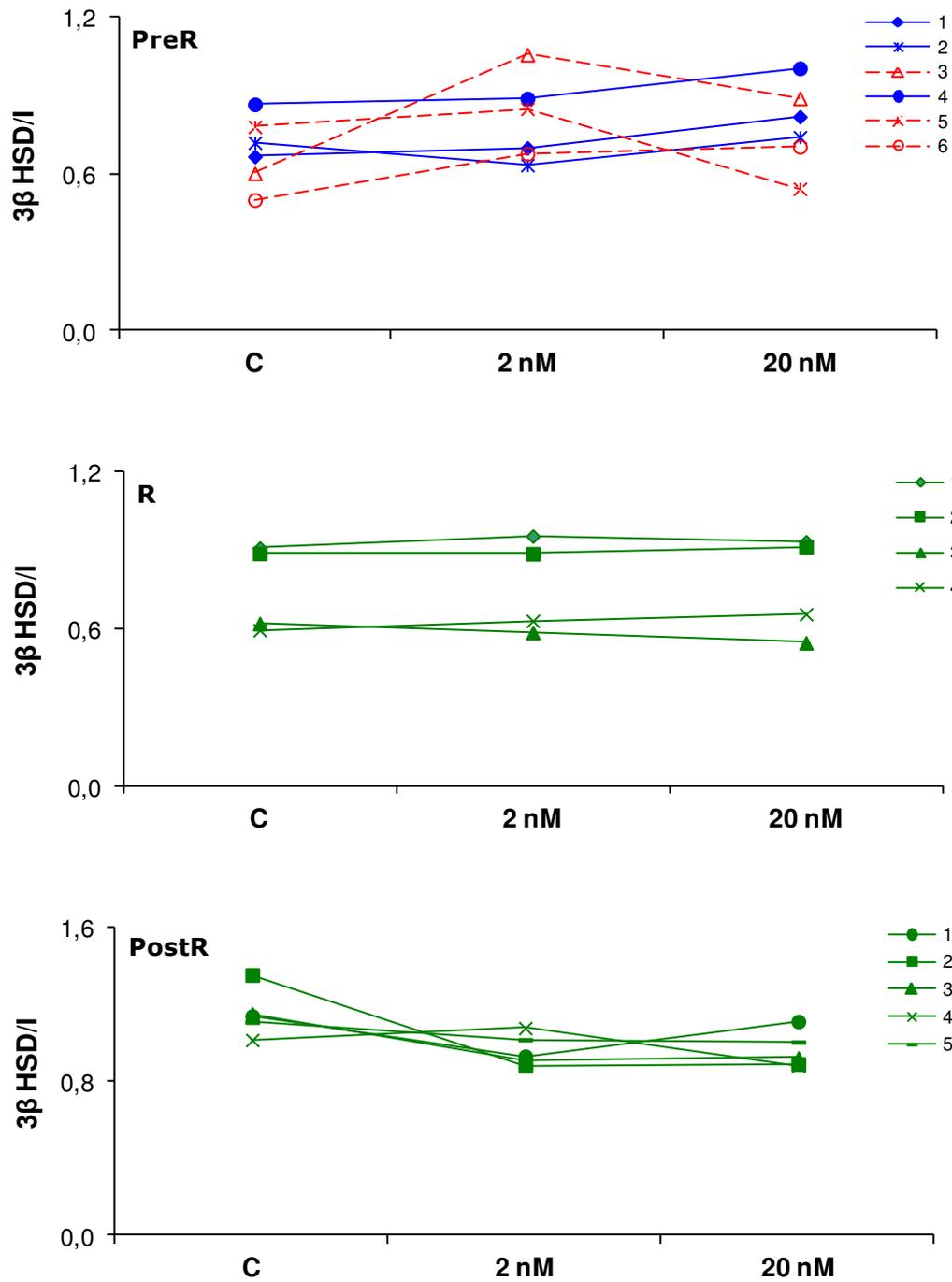


Figura 40. Efecto de E₂ sobre la actividad enzimática de 3β-HSD/I en cada período del año. En estos gráficos se realizaron con todos los animales estudiados.

Período	Grupo	Individuos	E ₂ plasmático	p
PreR	1	1, 2, 4	372,7 ± 118,1	0,2273
	2	3, 5, 6	645,6 ± 227,0	

Tabla 4. Concentraciones de E₂ plasmático en cada grupo de perfiles de respuesta al tratamiento. Las concentraciones plasmáticas se determinaron mediante radioinmunoensayo y se expresaron como pg de E₂ por ml de plasma. En esta tabla se expresan las medias y los DE para cada grupo y los valores se analizaron mediante la prueba t-Student.

En primer lugar, se analizaron los resultados del mismo modo que para CypP450c17 mediante ANOVA de dos factores. Con este diseño estadístico se observó una interacción no significativa entre ambos factores ($p= 0,1312$). La actividad de 3 β -HSD/I relativizada a los valores enzimáticos iniciales es significativamente mayor en el período PostR ($p<0,0001$) y no se detectó significancia en el factor *Tratamiento* ($p= 0,8502$). Sin embargo, estos resultados fueron llamativos dado que los valores individuales de cada animal analizado reflejan una tendencia a la disminución de las actividades enzimáticas, al menos en el período PostR (Figura 40). Es por ello que se decidió realizar otro diseño estadístico, analizando la actividad en cada período mediante ANOVA de un factor (*Período*) y el efecto del tratamiento con E₂ mediante ANOVA de un factor para cada período (*Tratamiento con E₂*), corregido por Bonferroni y acompañado por contrastes *a posteriori* mediante Tukey. Se observó que, al igual que en el análisis de dos factores, la actividad de 3 β -HSD/I relativizada a los valores enzimáticos iniciales es significativamente mayor en el período PostR (PreR: $0,760 \pm 0,035$; R: $0,762 \pm 0,047$; PostR: $1,030 \pm 0,034$, $p<0,0001$). Por otra parte, con respecto al tratamiento con E₂, se observó que no hay efecto significativo en los períodos PreR ni R ($p= 0,4076$ y $p= 0,9953$, respectivamente). Sin embargo, en el período PostR se observó que el tratamiento con E₂ disminuye

significativamente la actividad de la enzima 3β -HSD/I (C: $1,158 \pm 0,062$; 2nM: $0,966 \pm 0,041$; 20nM: $0,966 \pm 0,048$, $p= 0,017$). De este modo, el análisis mediante ANOVA de dos factores arroja resultados distintos al análisis de ANOVA de un factor. Esto se debe a que en este último caso, la diferencia en el período PostR está en el límite de significancia luego de realizar la corrección por Bonferroni ($\alpha= 0,017$). Sin embargo, y dado que en todos los individuos la actividad de 3β -HSD/I disminuyó luego del tratamiento con E_2 , el análisis estadístico más conveniente y correcto es el de ANOVA de un factor corregido por Bonferroni. Por lo tanto, como se observa en la Figura 41, durante el período PreR y R el tratamiento con E_2 no afecta la actividad de la enzima 3β -HSD/I pero durante el PostR el E_2 inhibiría la actividad de esta enzima. Cabe también destacar que durante el período PostR todos los animales mostraron un incremento en la actividad de la enzima luego de 24 hs de tratamiento y por eso la actividad enzimática relativizada a tiempo cero es mayor a uno. Esto sugiere que, fisiológicamente, algún o algunos factores del animal podrían estar reprimiendo la actividad enzimática y que esta inhibición se pierda al incubar los fragmentos testiculares *in vitro*.

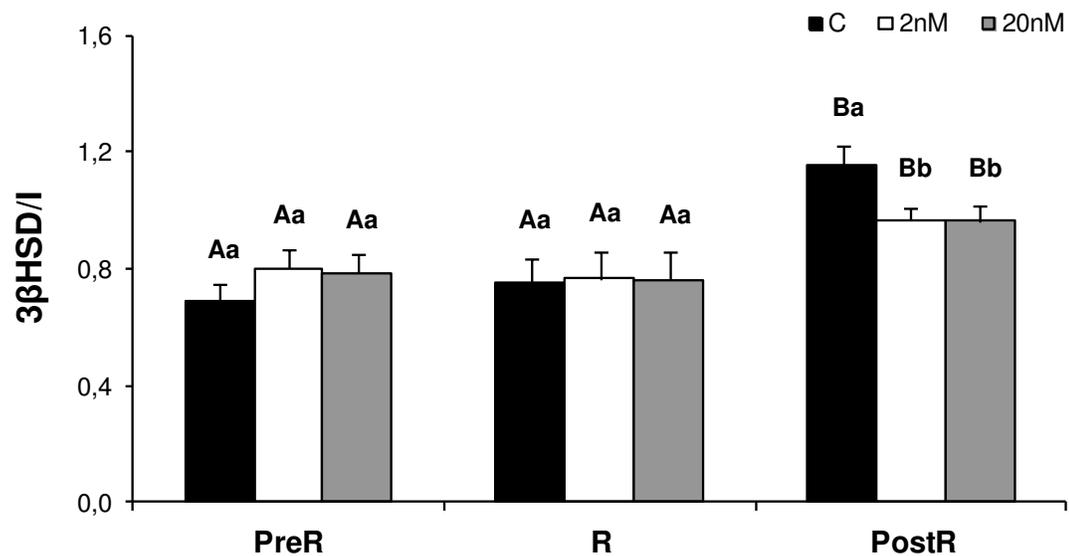


Figura 41. Efecto del E_2 sobre la actividad de la enzima 3β -HSD/I. Las determinaciones enzimáticas se realizaron a tiempo cero y luego de 24 hs de tratamiento como fuera descripto en *Materiales y Métodos*. Los resultados de la actividad enzimática luego del tratamiento se expresaron como una proporción referida a la actividad enzimática inicial y los resultados se expresan como la Media \pm EE. Las letras distintas indican diferencias significativas: las mayúsculas refieren a las diferencias entre períodos y las minúsculas refieren a las diferencias entre tratamientos. PreR: n=6, R: n= 4, PostR: n=5.

En síntesis, estos resultados indican que el tratamiento con E₂ no modifica ni la actividad enzimática ni la cantidad de proteína del CypP450c17 que, como se mencionó en la *Introducción*, es una de las principales enzimas regulatorias en la vía esteroidogénica testicular debido a que su disminución en el período R provoca la caída de los niveles de andrógenos (Fernández Solari y col., 2002; Denari y Ceballos, 2005). A pesar que los estrógenos parecen no estar involucrados en la regulación de CypP450c17, el E₂ disminuye la actividad de la enzima 3β-HSD/I durante el período PostR. Por lo tanto, dicha hormona podría modular la esteroidogénesis testicular mediante su acción sobre la enzima 3β-HSD/I durante el período PostR, dado que la disminución de esta actividad enzimática provoca una caída en la conversión de los 3β-hidroxi-5-ene esteroides en sus respectivos 3-oxo-4-ene derivados.

Efecto de E₂ sobre la apoptosis testicular

Como se mencionó en la *Introducción*, el E₂ regula el equilibrio entre la supervivencia, la apoptosis y la proliferación celular en numerosos tejidos. En el caso del testículo se demostró que los estrógenos inducen la apoptosis de la línea germinal en mamíferos (Nair y Shaha, 2003; Mishra y Shaha, 2005) y, si bien se estudió la importancia de la apoptosis en la espermatogénesis de anfibios, hasta el momento no se había investigado el rol que podría desempeñar el E₂ en las variaciones estacionales de la apoptosis de la línea germinal.

Con el objetivo de analizar el efecto de E₂ sobre la apoptosis testicular en *R. arenarum*, luego del tratamiento con E₂ los fragmentos testiculares se procesaron para histología y se determinó la apoptosis con el método de TUNEL con fluorescencia, como se describió en *Materiales y Métodos*. La Figura 42 muestra que luego del tratamiento con E₂, en el período PreR no se observa fluorescencia asociada a la apoptosis, sugiriendo que en este período el E₂ no induce un aumento en la apoptosis. Por otro lado, como se observa en la Figura 43, los fragmentos testiculares de animales provenientes del período R muestran bajos niveles de fluorescencia en el control y un aumento

de la fluorescencia en los fragmentos incubados con E₂. Por otra parte, la Figura 44 muestra que en los fragmentos testiculares de los animales del período PostR los niveles de fluorescencia asociada a apoptosis son elevados no sólo en los cortes provenientes de fragmentos tratados con E₂ sino que también en el tejido control.

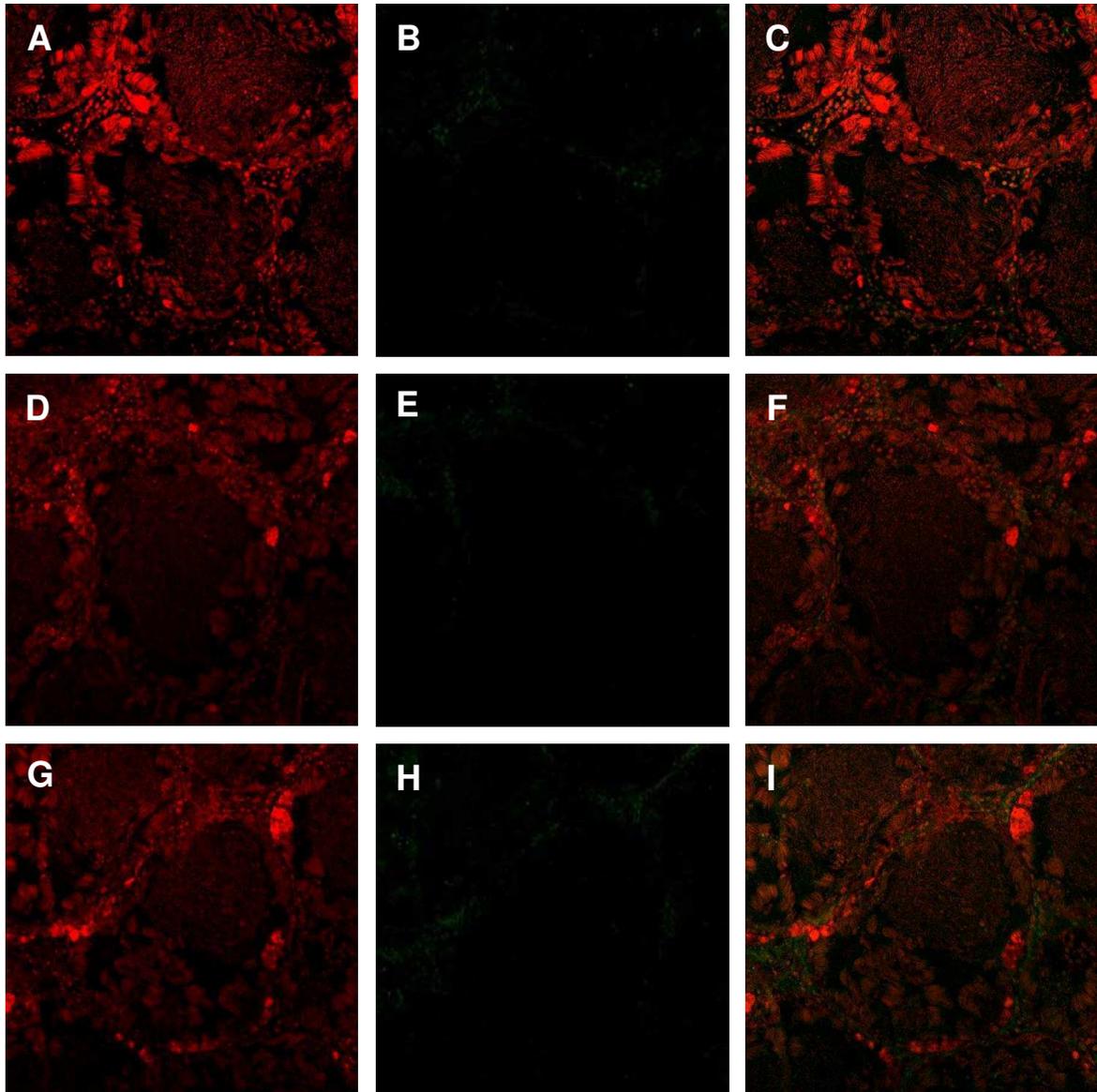


Figura 42. Efecto del tratamiento con E_2 sobre la apoptosis testicular durante el período PreR. (B,E,H): los núcleos apoptóticos se marcaron con fluoresceína mediante un kit comercial, como se explicó en *Materiales y Métodos*. (A, D, G): se realizó una contratinción con yoduro de propidio. (C, F, I): fusión. (A-C): secciones control. (D-F); fragmentos tratados con 2 nM E_2 . (G-I): fragmentos tratados con 20 nM E_2 .

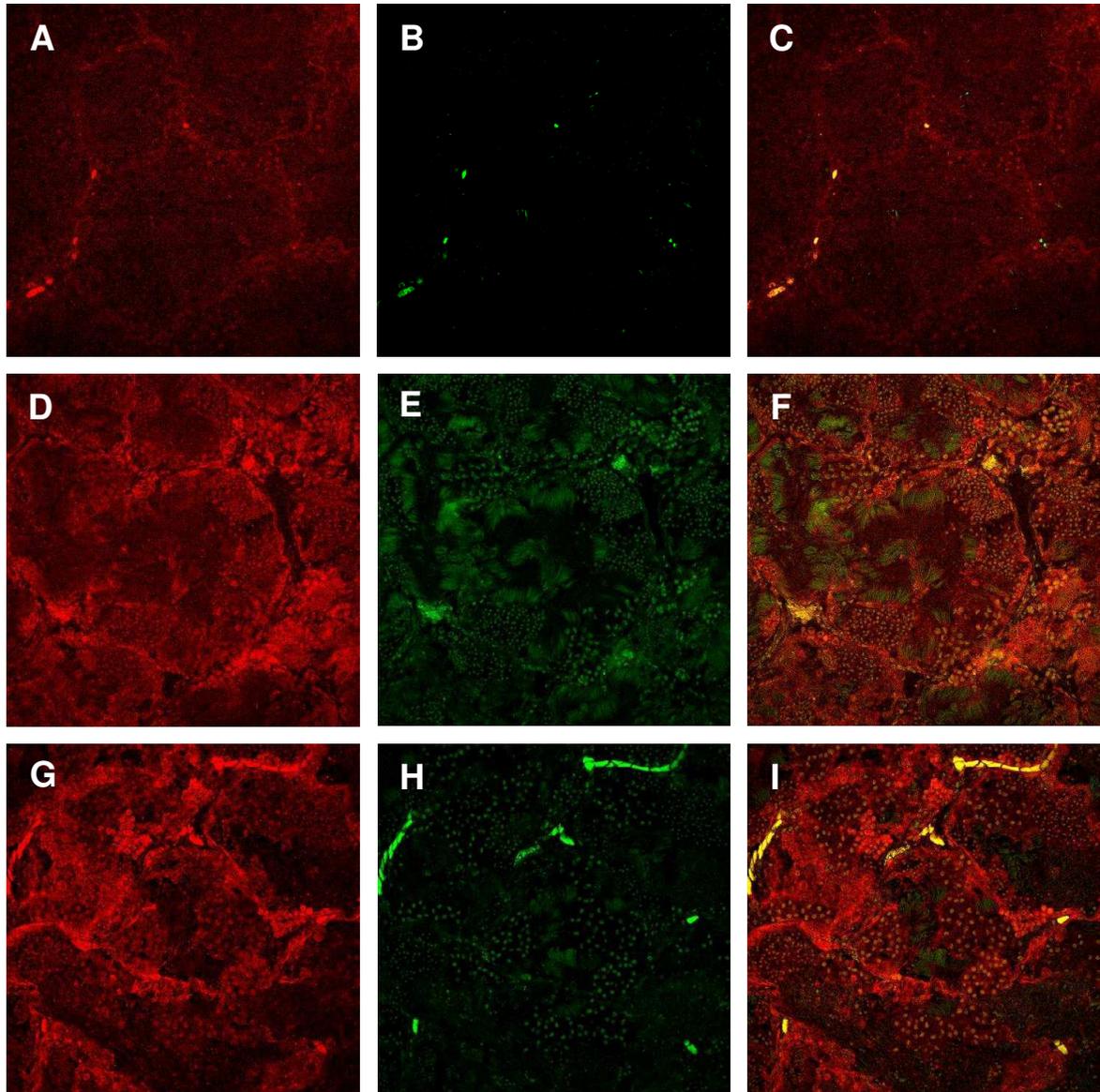


Figura 43. Efecto del tratamiento con E_2 sobre la apoptosis testicular durante el período R. (B,E,H): los núcleos apoptóticos se marcaron con fluoresceína mediante un kit comercial, como se explicó en *Materiales y Métodos*. (A, D, G): se realizó una contratinción con yoduro de propidio. (C, F, I): fusión. (A-C): secciones control. (D-F); fragmentos tratados con 2 nM E_2 . (G-I): fragmentos tratados con 20 nM E_2 .

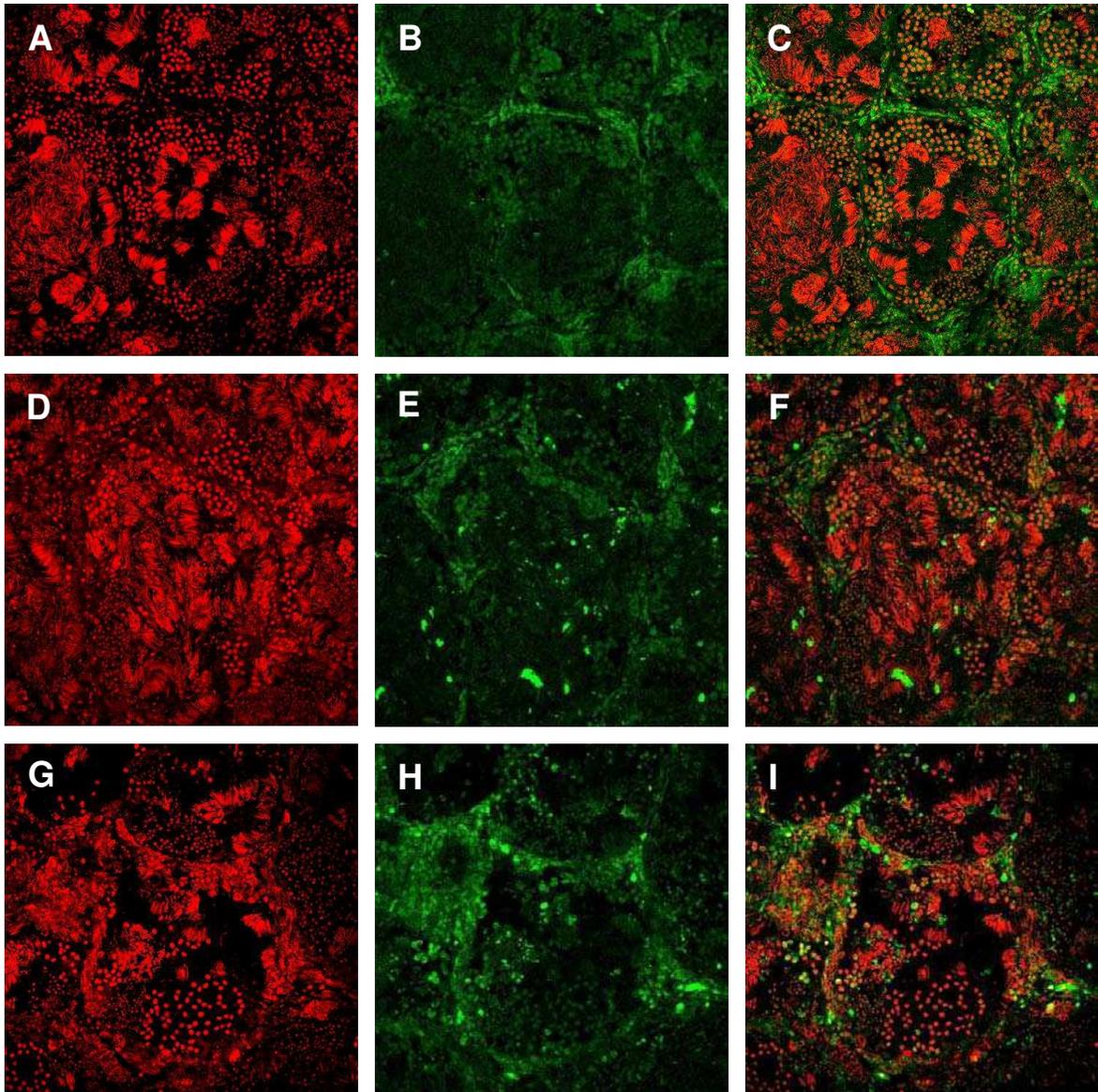


Figura 44. Efecto del tratamiento con E_2 sobre la apoptosis testicular durante el período PostR. (B,E,H): los núcleos apoptóticos se marcaron con fluoresceína mediante un kit comercial, como se explicó en *Materiales y Métodos*. (A, D, G): se realizó una contratinción con yoduro de propidio. (C, F, I): fusión. (A-C): secciones control. (D-F); fragmentos tratados con 2 nM E_2 . (G-I): fragmentos tratados con 20 nM E_2 .

El análisis cualitativo de los resultados fue complementado con un análisis cuantitativo. Para cuantificar los resultados se tuvo en cuenta el número de núcleos apoptóticos en cada sección testicular, como se detallara en el *Capítulo 1* (Figura 45, Tabla 5). La cuantificación se analizó mediante ANOVA de un factor y se observó que en el período PreR no existen diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 5, $p= 0,8378$). Por otra parte, la Figura 44 refleja que en el período R hay apoptosis inducida por el tratamiento con E_2 , aunque solo se observan diferencias en el tratamiento con 2 nM de E_2 (Tabla 5, $p= 0,0280$). Finalmente, en el período PostR se observó una elevada tasa de apoptosis en todos los tratamientos, inclusive en el control, y no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p= 0,9119$).

Período	C	2 nM E_2	20 nM E_2
PreR	8,0 ± 2,2	6,5 ± 2,0	4,8 ± 1,6
R	47,0 ± 10,8	246,3 ± 32,3	131,0 ± 15,3
PostR	116,5 ± 12,6	131,0 ± 22,9	143,0 ± 27,1

Tabla 5. Apoptosis luego del tratamiento con E_2 . Los resultados se cuantificaron según el número de núcleos apoptóticos observados en cada sección y la cuantificación se expresa como la media ± EE. Los valores se analizaron mediante un ANOVA de un factor para cada período, seguido de un contraste *a posteriori* mediante el test de Tukey.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con E_2 no induce apoptosis en los cistos testiculares durante el período PreR, cuando los niveles de E_2 plasmáticos son mínimos, pero sí lo hace durante el R. Por otra parte, también sugieren que hay una elevada apoptosis testicular en todos los tratamientos del período PostR, cuando los niveles plasmáticos de E_2 son máximos.

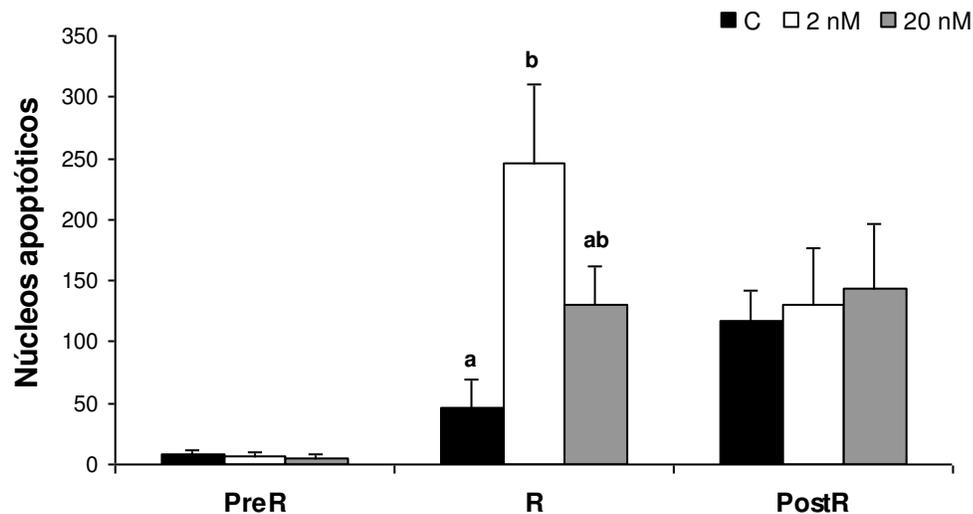


Figura 45. Efecto de E₂ sobre la apoptosis. Se estudiaron 4 animales de cada período luego de incubar los fragmentos testiculares con 2 nM y 20 nM de E₂. El tejido se procesó para inmunohistoquímica como se detalla en *Materiales y Métodos*. La cuantificación de núcleos apoptóticos se realizó con el programa ImageJ y los valores están expresados como la Media \pm EE. Las letras distintas indican diferencias significativas.

Además, se analizaron las secciones de cada animal estudiado y se determinó cuáles eran los tipos celulares que sufrían apoptosis en cada caso. Como indica la Figura 46, en el período R la gran mayoría de núcleos apoptóticos corresponde a espermatocitos mientras que muy pocos corresponden a espermátidas y ninguno a espermatogonias. Por otra parte, en el período PreR se observan algunas espermatogonias apoptóticas en dos de los individuos analizados. Sin embargo, cabe destacar que en este período la tasa de apoptosis detectada es tan baja que se podría afirmar que la apoptosis en espermatogonias es prácticamente despreciable. Con respecto al período PostR, la apoptosis ocurre mayoritariamente en espermatocitos aunque también en espermátidas. En este caso se observó apoptosis en espermatogonias pero en un solo individuo y fueron pocas (en control y en el tratamiento con 20 nM de E₂). Estos resultados señalan que la apoptosis durante los períodos R y PostR ocurre mayoritariamente en los espermatocitos y está prácticamente ausente en las espermatogonias.

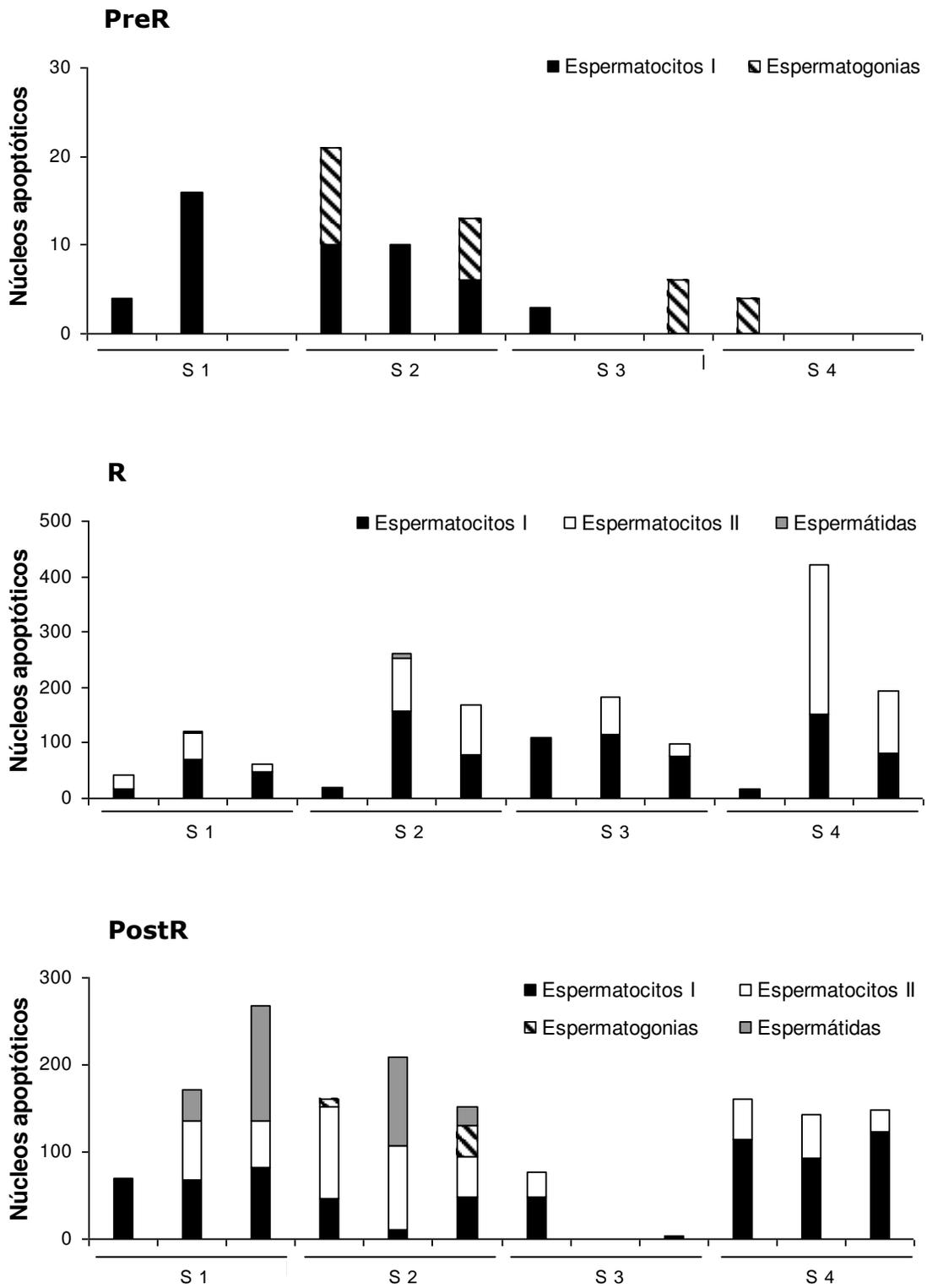
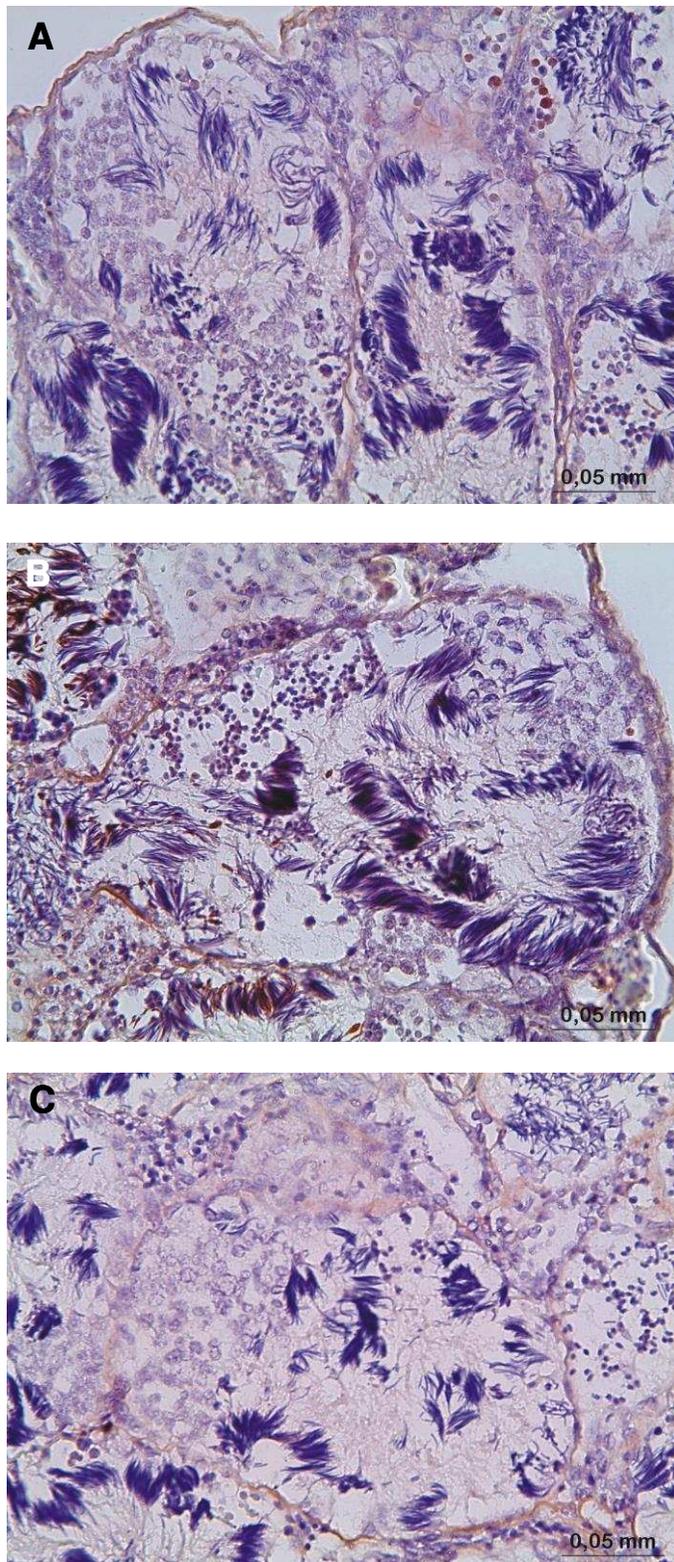


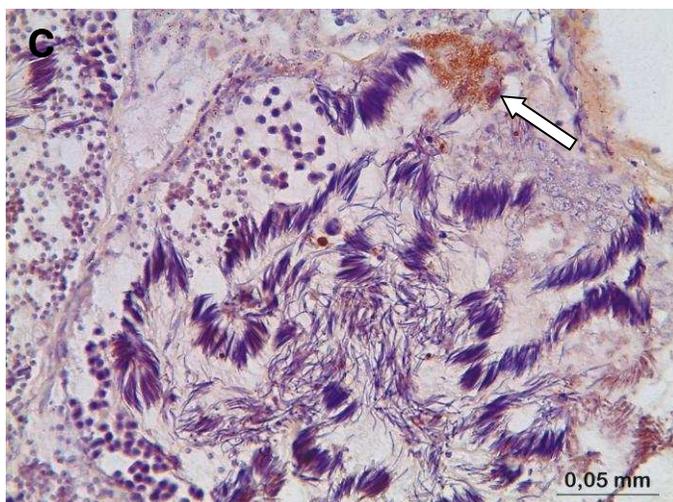
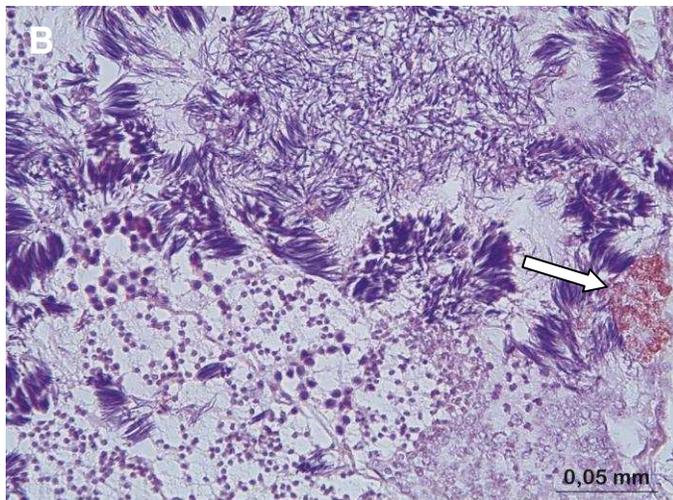
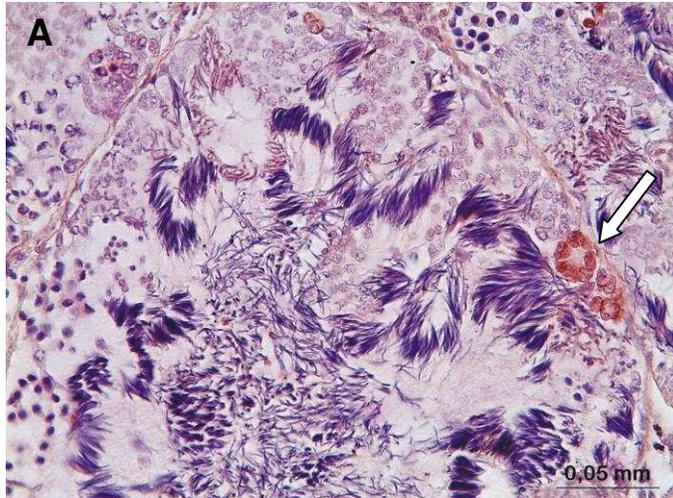
Figura 46. Efecto de E₂ sobre la apoptosis de los distintos tipos celulares. Cada gráfico muestra la información de los 4 individuos estudiados en cada período. S1-S4 refiere al número de sapo.

Efecto del E₂ sobre la proliferación celular en el testículo

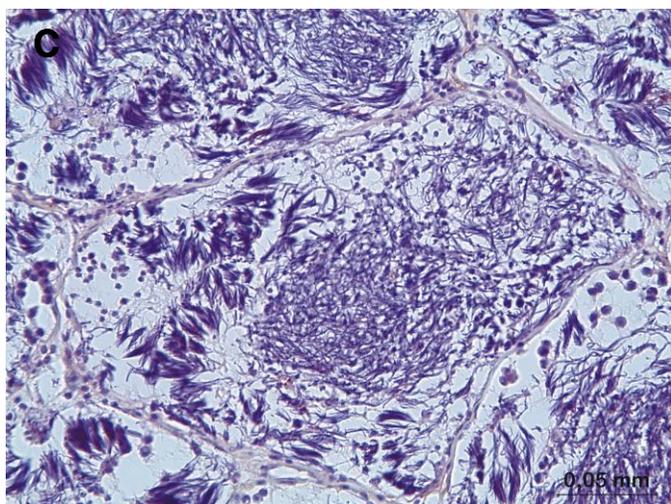
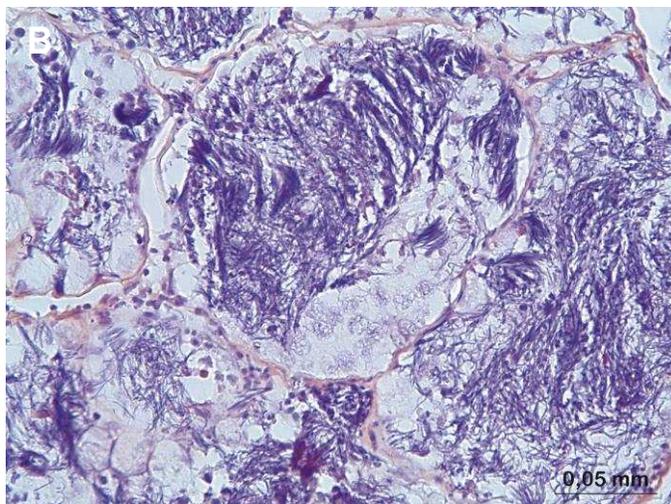
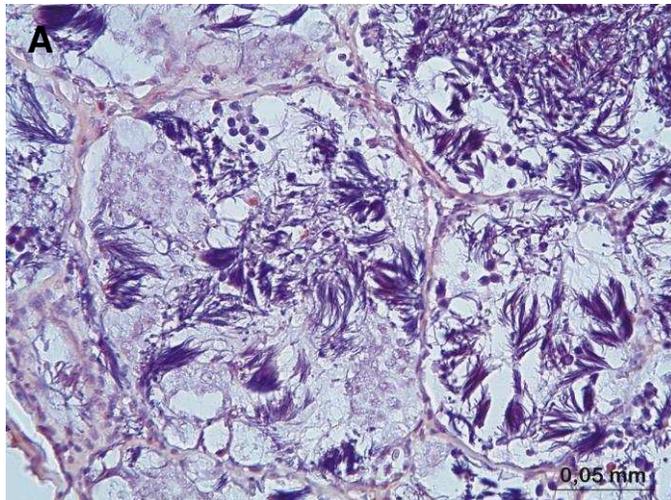
Finalmente, teniendo en cuenta que el E₂ regula la proliferación celular en los testículos de algunas especies de anfibios, luego del tratamiento con E₂ y con el objetivo de estudiar el efecto de E₂ sobre la proliferación testicular, se incubaron los fragmentos testiculares con 1 mM de BrdU. Luego se determinó la incorporación de BrdU mediante inmunohistoquímica, como se detalla en *Materiales y Métodos del Capítulo 2*. En las Figuras 47 y 49 se muestra que la proliferación celular es muy baja en los períodos PreR y PostR, y se observaron pocos cistos inmunomarcados en todos los tratamientos. En cambio, en los fragmentos testiculares correspondientes al período R se detectó proliferación en espermatogonias en todos los tratamientos (Figura 48). Cabe destacar que la incorporación de BrdU solamente se observó en espermatogonias y que no se observó inmunomarca en el control negativo (Figura 49).

**Figura 47. Período PreR**

Efecto del tratamiento por 24 hs con E₂ sobre la proliferación testicular. Los fragmentos de testículo se incubaron con BrdU como se detalló en *Materiales y Métodos*. (A) Sección control (B) Sección tratada con 2 nM E₂. (C) Sección tratada con 20 nM E₂.

**Figura 48. Período R.**

Efecto del tratamiento por 24 hs con E₂ sobre la proliferación testicular. Los fragmentos de testículo se incubaron con BrdU como se detalló en *Materiales y Métodos*. Las flechas señalan cistos de gonias en proliferación. (A) Sección control (B) Sección tratada con 2 nM E₂. (C) Sección tratada con 20 nM E₂.

**Figura 49. Período PostR.**

Efecto del tratamiento por 24 hs con E₂ sobre la proliferación testicular. Los fragmentos de testículo se incubaron con BrdU como se detalló en *Materiales y Métodos*. (A) Sección control (B) Sección tratada con 2 nM E₂. (C) Sección tratada con 20 nM E₂.

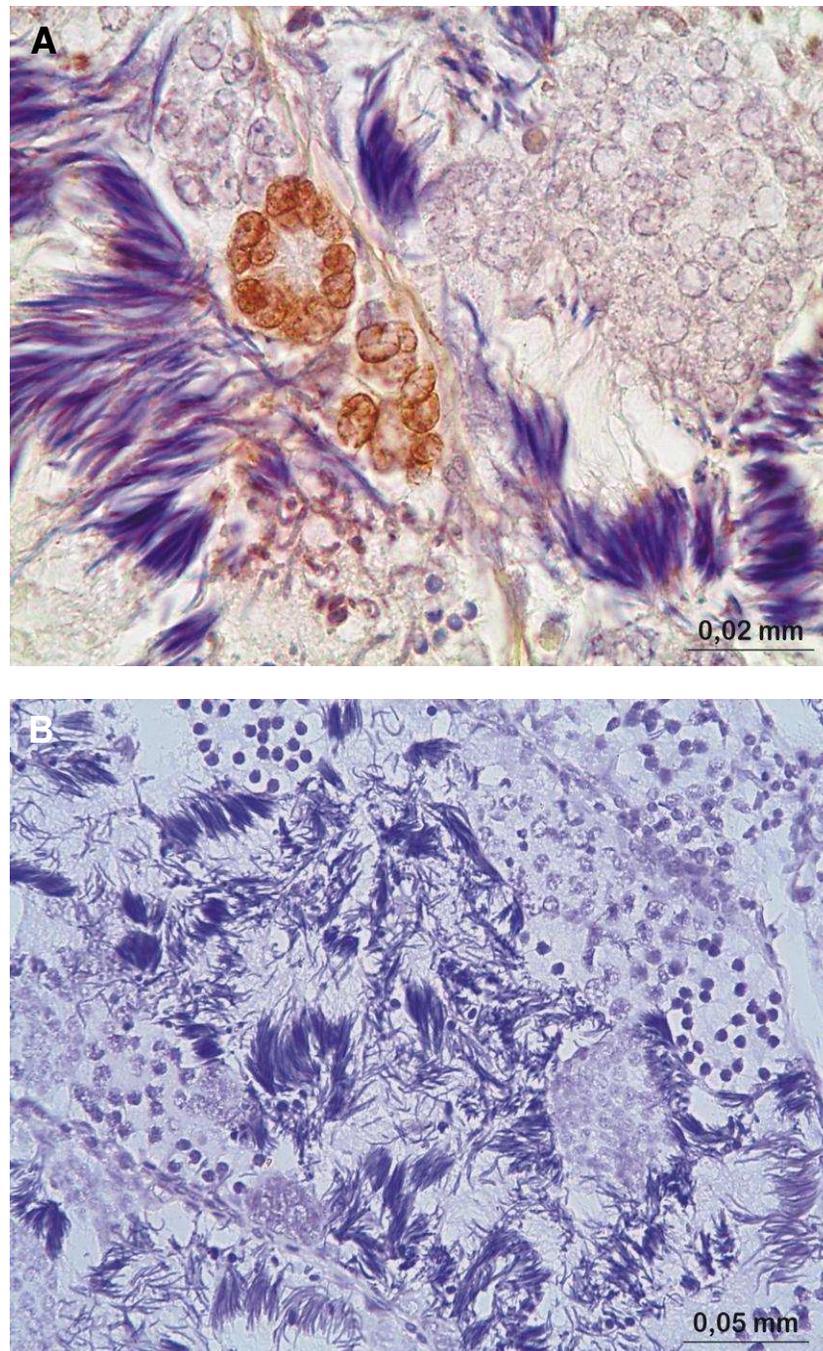


Figura 50. Proliferación celular en testículo. (A) Detalle de inmunomarca en espermatogonias de fragmentos testiculares correspondientes al período R. (B) Control negativo sin anticuerpo primario.

Los resultados acerca de la proliferación celular fueron cuantificados y expresados de dos maneras diferentes. La Tabla 6 y la Figura 51A muestran que al expresar los resultados como el porcentaje de cistos de espermatogonias inmunomarcadas sobre el total de cistos de espermatogonias presentes en cada lóbulo no se observan diferencias significativas entre el control y los tratamientos, en ninguno de los períodos (Tabla 6; PreR: $p=0,095$; R: $p=0,3418$; PostR: $p=0,632$). Como se observa en la Figura 51B, al expresar los resultados como el porcentaje de cistos de espermatogonias inmunomarcadas sobre el total de cistos presentes en cada lóbulo, se observan los mismos resultados pero con distinta significancia (Tabla 6; PreR: $p=0,2822$; R: $p=0,4708$; PostR: $p=0,7097$). Estos resultados sugieren que, a diferencia de lo que ocurre en otras especies de anuros, el tratamiento con E_2 en *R. arenarum* no estimula la proliferación testicular en ningún período del año, al menos en estas condiciones experimentales.

A			
Período	C	2 nM E_2	20 nM E_2
PreR	10,0 ± 3,7	3,1 ± 1,3	2,8 ± 2
R	28,7 ± 9,6	14,9 ± 6,1	15,4 ± 5,2
PostR	14,5 ± 5,7	8 ± 4,8	11 ± 5,3
B			
PreR	5,3 ± 3,0	1,3 ± 0,5	1,4 ± 1,2
R	9,9 ± 2,7	5,7 ± 1,5	5,9 ± 1,3
PostR	4,8 ± 1,9	2,8 ± 1,8	3,4 ± 1,5

Tabla 6. Proliferación celular luego del tratamiento con E_2 . Los resultados se expresan como la media ± EE. Los valores se analizaron mediante un ANOVA de un factor para cada período, seguido de un contraste *a posteriori* mediante el test de Tukey. **A.** Los resultados se expresan como el porcentaje de cistos de espermatogonias inmunomarcadas sobre el total de cistos de espermatogonias presentes en cada lóbulo. **B.** Los resultados se expresan como el porcentaje de cistos de espermatogonias inmunomarcadas sobre el total de cistos presentes en cada lóbulo.

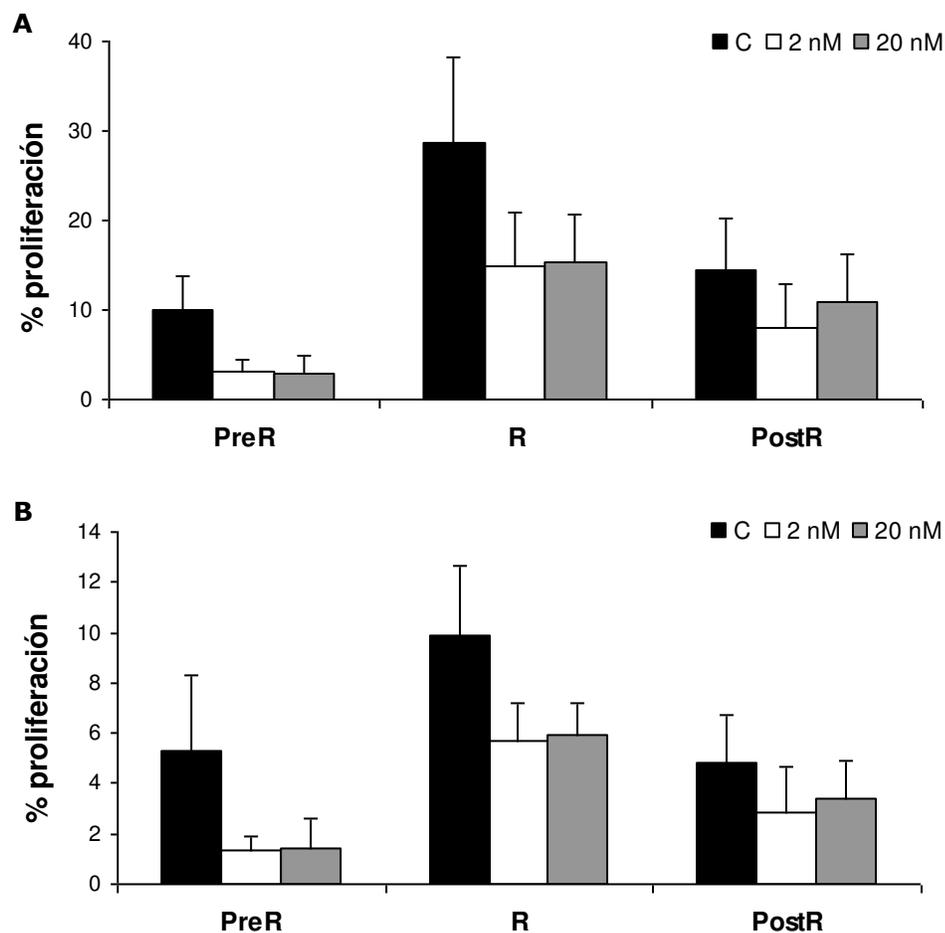


Figura 51. Efecto de E₂ sobre la proliferación testicular. Se analizaron 5 lóbulos de 5 animales correspondientes a cada período, y los valores se expresaron como la Media \pm EE. **A.** Los resultados están expresados como el porcentaje de cistos de espermatogonias inmunopositivas sobre el total de cistos de espermatogonias presentes en cada lóbulo. No se observaron diferencias significativas (PreR: $p=0,095$; R: $p=0,3418$; PostR: $p=0,6320$). **B.** Los resultados están expresados como el porcentaje de cistos de espermatogonias inmunopositivas sobre el total de cistos en cada lóbulo. No se observaron diferencias significativas (PreR: $p=0,2822$; R: $p=0,4708$; PostR: $p=0,7097$).

En síntesis, estos resultados indican que el tratamiento con E₂ regula la espermatogénesis en el testículo de *R. arenarum*. Si bien no promueve la proliferación celular en las condiciones experimentales empleadas esta tesis, el E₂ estimula significativamente la apoptosis de la línea germinal durante el período R, mayoritariamente de los espermatocitos.

Discusión

Como se mencionó en la *Introducción*, algunos agentes químicos utilizados como herbicidas o pesticidas se comportan como disruptores endócrinos y algunos de ellos tienen un efecto estrogénico debido a que, entre otras cosas, aumentan la actividad de la enzima aromatasa. En los anfibios en particular, algunos trabajos proponen efectos similares sobre la actividad de aromatasa, provocando el desarrollo de anormalidades gonadales y la feminización durante la vida larval (Hayes y col., 2002; Fan y col., 2007; Langlois y col., 2009; Hayes y col., 2010). En *P. nigromaculata* y *P. waltl* se observó que modificaciones en la actividad de la enzima aromatasa producen anormalidades en el testículo y un desvío en la proporción de sexos (Chardard y Doumon, 1999; Jia y col., 2014). Como ya se explicó, los individuos de la familia Bufonidae poseen BO y en *R. marina* este órgano está altamente afectado y modificado en los individuos provenientes de zonas agrícolas (McCoy y col., 2008). En este contexto, y teniendo en cuenta los resultados del *Capítulo 1* de esta tesis que proponen que el BO es una de las principales fuentes de E₂ en machos de *R. arenarum*, resulta de gran relevancia el estudio del efecto que tienen los estrógenos sobre la función testicular en especies de la familia Bufonidae.

Uno de los principales objetivos de este capítulo fue estudiar el efecto del E₂ en la actividad de ciertas enzimas esteroideogénicas testiculares involucradas en la producción de andrógenos. Como se mencionó en la *Introducción*, el E₂ disminuye la expresión de ciertas enzimas esteroideogénicas en la trucha y produce una disminución de los niveles plasmáticos de testosterona en *X. laevis* (Govoroun y col., 2001; Hecker y col., 2005a). En *P. esculentus*, el tratamiento con E₂ provocó una disminución en la producción de andrógenos y se propuso que esta caída estaba asociada a la inhibición de la actividad 17-hidroxilásica del CypP450c17 testicular (Pierantoni y col., 1986; Fasano y col., 1989, 1991).

En primer lugar se evaluó el efecto del E₂ sobre la actividad de la enzima

CypP450c17 dado que en *R. arenarum*, como en otros animales, es la enzima clave para la síntesis de andrógenos a partir de derivados de 21 átomos de carbono. El sapo común es una especie con patrón reproductivo disociado de andrógenos debido a que las concentraciones plasmáticas de testosterona y de 5 α -DHT disminuyen en el período R. En nuestro laboratorio, se demostró que la disminución en la producción de andrógenos está asociada a la disminución de la enzima CypP450c17 durante este período (Fernández Solari y col., 2002). Se demostró, además, que esta enzima se inhibe luego de tratamientos prolongados con FSH y por hCG (Canosa y Ceballos, 2002a, b) y, por lo tanto, su disminución en el período R podría deberse, al menos en parte, a un aumento en los niveles de ARNm de FSH β descritos para ese mismo período (Volonteri y col., 2013). Además, las concentraciones plasmáticas de corticosterona son mayores en el período R y corticosterona y su derivado 5 α -reducido también inhiben la actividad del CypP450c17 (Denari y Ceballos, 2005; Tesone y col., 2011). Por lo tanto, esta enzima constituye un punto clave de regulación en la vía esteroidogénica de esta especie y es por ello que se decidió evaluar el efecto de E₂ sobre su actividad.

Luego de analizar estadísticamente los resultados se determinó que el E₂ no tiene efecto sobre la actividad enzimática de CypP450c17 ni tampoco sobre la cantidad de proteína. Estos resultados difieren de lo que ocurre en *P. esculentus*, donde E₂ sí inhibe la actividad de hidroxilasa del CypP450c17 (Fasano y col., 1991), lo que podría deberse a la amplia diversidad de mecanismos existentes entre las distintas familias de anfibios sumado a diferencias inter-específicas. Por otra parte, los individuos respondieron de distinto modo al tratamiento con E₂ y, por lo tanto, los perfiles de respuesta individuales de las actividades de hidroxilasa y de liasa pudieron agruparse en dos o tres subgrupos dentro de cada período (Figuras 36 y 37). Una de las posibilidades a analizar es que esta separación de los perfiles de respuesta individuales esté relacionada con distintas concentraciones plasmáticas de E₂. Sin embargo, al evaluarlo estadísticamente se observó que las concentraciones de E₂ en circulación no explicarían estas diferencias individuales. Es muy

probable que otras variables no contempladas en esta tesis influyan en los perfiles de respuesta de la actividad de la enzima CypP450c17, entre ellas las concentraciones de FSH y de los glucocorticoides. Cabe destacar también que no resulta sorprendente que los animales hayan respondido de distinto modo al tratamiento con E₂ debido a que, como ya se dijera, se trabajó con animales adultos provenientes de poblaciones naturales que pueden haber estado expuestos a distintos factores y condiciones a lo largo de su vida, además de tener mayor o menor sensibilidad al tratamiento dependiendo de variaciones en su perfil genético, entre otros factores. Probablemente sea este el motivo por el cual existan respuestas diferenciales y por ende los datos no sean tan homogéneos como podrían serlo si se trabajase con una población endocriada en un bioterio en condiciones controladas. Esta es una de las limitaciones de trabajar con poblaciones naturales pero a su vez es uno de los motivos que realzan el interés por el estudio de estos modelos experimentales.

Por otro lado, se evaluó el efecto de E₂ sobre la actividad de la enzima 3β-HSD/I. Esta enzima es la encargada de convertir los 3β-hidroxi-5-ene esteroides en 3-oxo-4-ene esteroides y constituye un paso fundamental en la biosíntesis de corticosteroides, progestágenos, andrógenos y estrógenos. Como se mencionó en la *Introducción*, la actividad de esta enzima es mayor en el período reproductivo que en el no reproductivo y no es regulada ni por gonadotrofinas ni por GnRH (Pozzi y col., 1997; Canosa y Ceballos, 2002; Canosa y col., 2002). En este caso, se observó que los individuos de los períodos R y PostR respondieron al tratamiento de un modo más homogéneo. Sólo en el período PreR los perfiles de respuesta al tratamiento se separaron en dos grupos y esto, al igual que lo que ocurrió en CypP450c17, no parece estar relacionado con las concentraciones plasmáticas de E₂ (Figura 40, Tabla 4). A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticas entre las concentraciones plasmáticas de E₂ de ambos grupos, los animales con mayores concentraciones plasmáticas de E₂ son los que parecen responder positivamente al tratamiento, lo cual resulta difícil de explicar (Tabla 4). El análisis estadístico de los resultados mostró que el E₂ reduce la actividad de

3 β -HSD/I durante el período PostR pero no durante el resto del año. Estos resultados sugieren que en *R. arenarum* el E₂ podría modular la producción de 3-oxo-4-ene esteroides. Un aspecto importante, ya destacado en la sección *Resultados* de este capítulo, es que en el período PostR todos los animales mostraron una tendencia al aumento en la actividad de dicha enzima luego de 24 hs de tratamiento *in vitro*, lo cual podría sugerir que durante ese período algún/os factor/es en el animal reprimen la actividad enzimática. Si se tiene en cuenta que las concentraciones plasmáticas de E₂ son máximas en este período y que es precisamente en este período cuando el tratamiento con E₂ tiene un efecto inhibitor, se podría pensar que esta hormona inhibe también la actividad de esta enzima *in vivo*.

Las hormonas esteroideas son fundamentales en la regulación de la espermatogénesis en mamíferos vía su acción sobre la proliferación celular y la apoptosis de la línea germinal (para una revisión, ver Shaha 2008b). En particular, los estrógenos tienen un rol importante en la espermatogénesis de mamíferos y pueden regular la apoptosis mediante diversos mecanismos (para una revisión, ver Vasconsuelo y col., 2011). Los estrógenos inducen la apoptosis de la línea germinal mediante un aumento en la expresión de Fas/FasL (Nair y Shaha, 2003; Mishra y Shaha, 2005). En anfibios aún no se había estudiado el efecto de los estrógenos en la apoptosis testicular pero sí su relación con otros aspectos de la espermatogénesis. En este grupo, el rol del E₂ varía según el estadio de la espermatogénesis, el estadio de desarrollo y la especie analizada. En *X. laevis* se observó una aceleración de la espermatogénesis en larvas expuestas a E₂, debido a un aumento del porcentaje de espermátidas y espermatozoides (Hu y col., 2008). En cambio, en adultos de *L. pipiens* los estrógenos retrasan la formación de espermatogonias II y de espermatozoides y aceleran los estadios finales de la espermatogénesis (Tsai y col., 2003).

Por otra parte, en algunas especies de anfibios la espermatogénesis está intrínsecamente relacionada a las variaciones estacionales en la apoptosis de la línea germinal. Como ya se mencionó en la *Introducción*, en urodelos se

observó apoptosis en células de la línea germinal tanto en invierno como en verano, dependiendo de la especie (Yazawa y col., 1999; Ricote y col., 2002). En *L. catesbeianus* también se detectaron variaciones estacionales en los niveles de apoptosis testicular, siendo éstos elevados en testículos de animales del período reproductivo (Sasso-Cerri y col., 2004).

En el *Capítulo 2* de esta tesis se mostró que en *R. arenarum* hay variaciones estacionales en la apoptosis de la línea germinal, con los niveles de apoptosis significativamente mayores en el período PostR, cuando las concentraciones de E_2 son máximas. Sin embargo, a pesar de que las variaciones estacionales en la apoptosis juegan un rol fundamental en la espermatogénesis de anfibios, y que en mamíferos el E_2 regula la apoptosis, hasta el momento no se había investigado el rol del E_2 en la apoptosis testicular de anfibios mediante experimentos *in vitro*.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que existen pocos núcleos apoptóticos en todos los tratamientos realizados en el período PreR y muchos en todas las condiciones del período PostR (Figura 45). Por otra parte, se observaron pocos núcleos apoptóticos en los fragmentos control del período R y un incremento de la apoptosis en los fragmentos tratados con E_2 (Figura 45). Estos resultados permiten sugerir que si durante el período R se produjera un incremento de E_2 , por síntesis endógena o por agentes feminizantes, podría desencadenarse la apoptosis de los cistos con espermatocistos. Además, como se mostró en este capítulo, la apoptosis ocurre mayoritariamente en espermatocitos I y II y espermátidas (Figura 46). Las espermatogonias apoptóticas son muy escasas en general, a diferencia de lo observado por Yazawa y col en urodelos (1999). Estos resultados, sumados a los presentados en el *Capítulo 2* permiten proponer que las células que mueren por apoptosis corresponden a estadios avanzados de la espermatogénesis. Por lo tanto, los cistos de espermatocitos que no alcanzan a diferenciarse en espermatozoides morirían por apoptosis en el período PostR y serían “eliminados” mediante un mecanismo dependiente del E_2 .

Como se detalló en la *Introducción*, los estrógenos también están involucrados en la proliferación celular de las espermatogonias en algunas especies de anfibios. El rol de E₂ en la proliferación de la línea germinal fue intensamente estudiado en *P. esculentus*. En esta especie se analizaron las variaciones estacionales en la expresión de PCNA y de c-kit y se observó que ambos aumentan significativamente durante el período R, sugiriendo que la máxima proliferación ocurre durante dicho período (Raucci y Di Fiore, 2007). Además, el estudio de las variaciones plasmáticas de E₂ en *P. esculentus* mostró que las concentraciones son máximas durante los meses correspondientes al período R (Varriale y col., 1986, Fasano y col., 1989), sugiriendo una posible relación entre el E₂ y la proliferación de las espermatogonias. Estudios *in vitro* confirmaron esta asociación, ya que el tratamiento con esta hormona estimula la mitosis de las espermatogonias mediante la activación de c-fos y la inducción de proteínas kinasas (Minucci y col., 1997; Cobellis y col., 1999; Chieffi y col., 2000b). También se determinó que el E₂ induce la activación de Akt-1, que inactiva moléculas pro apoptóticas tales como Bad y caspasa-9 (Stabile y col., 2006). Además, el estudio de las variaciones estacionales en la proliferación celular de *R. arenarum*, mostrados en el *Capítulo 2*, indicó que la proliferación espermatogonial es significativamente mayor en el período R, cuando los niveles de E₂ plasmáticos comienzan a aumentar. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el último objetivo de esta tesis fue analizar si el E₂ estimula también la proliferación celular en los testículos de *R. arenarum*.

Los resultados expuestos en este capítulo muestran que la proliferación celular es baja en todas las condiciones experimentales del período PreR y PostR y elevada en todos los tratamientos en el período R, independientemente de la forma utilizada para la cuantificación. El hecho de haber obtenido el mismo resultado con ambas cuantificaciones le otorga gran contundencia a los resultados. De este modo, el tratamiento con E₂ no indujo la proliferación celular en ningún período. De manera similar, pero con una aproximación experimental *in vivo*, el E₂ tampoco estimula la proliferación espermatogonial luego de 20 días de tratamiento en *L. pipiens*.

Por lo tanto, el rol que desempeña el E₂ en la proliferación espermatogonial varía entre las distintas especies de anuros. Sin embargo, es importante tener en cuenta que existen diferencias en el tipo de experimento realizado y en las especies analizadas. Por ejemplo, los distintos trabajos varían no solo en la especie estudiada sino también en las dosis de E₂ empleada, en la duración del tratamiento y en la utilización de sistemas *in vivo* o *in vitro* (Minucci y col., 1997; Cobellis y col., 1999; Chieffi y col., 2000b; d' Isteria y col., 2003; Tsai y col., 2003) . Por lo tanto, si bien los resultados de esta tesis sugieren que el E₂ no estaría involucrado en la regulación de la proliferación espermatogonial de *R. arenarum*, sería importante confirmarlos mediante experimentos *in vivo*.

Por otra parte, otras hormonas podrían estar involucradas en la regulación de las variaciones estacionales en la proliferación espermatogonial observadas en *R. arenarum*, como ocurre en otras especies. Por ejemplo, las gonadotropinas podrían tener un rol importante en la proliferación celular, ya que se observó que FSH induce la proliferación espermatogonial en urodolos (Ji y col., 1992; Abé y Ji, 1994; Ito y Abé, 1999;). Además, como se mencionó en la *Introducción*, el tratamiento con FSH de machos adultos hipofisectomizados de *R. temporaria* estimula la división de las espermatogonias (Lofts, 1961). Si bien estos resultados sugieren un rol regulatorio de FSH sobre la función testicular en anuros, no se puede descartar que su acción esté mediada por un aumento de la actividad de aromatasa y un consecuente aumento de E₂.

Otro candidato para regular los procesos de proliferación en el testículo es GnRH, dado que en *P. esculentus* GnRH estimula la proliferación de las espermatogonias actuando directamente sobre el órgano (Minucci y col., 1986, 1992). Por otro lado, en los testículos de *R. arenarum* se describieron receptores de GnRH (Canosa y col., 2002), por lo que sería importante evaluar si en *R. arenarum* también existe un efecto directo de GnRH sobre la proliferación espermatogonial. Además, en *P. esculentus* la proliferación está asociada a las variaciones estacionales de la concentración de testosterona (Raucci y Di Fiore, 2007) mientras que en *L. catesbeianus* tanto la testosterona

como el E₂ controlan la proliferación celular (Caneguim y col., 2013 a, b). La melatonina también podría participar de la regulación de la proliferación ya que en *P. esculentus* inhibe la actividad mitótica de las espermatogonias estimulada por E₂ (d'Istria y col., 2003). En *R. arenarum* se describieron las variaciones estacionales en los valores de melatonina en plasma, siendo estos significativamente mayores en el período PreR (Tesis doctoral Dra. Eleonora Regueira). Por ello, sería importante continuar con el estudio *in vivo* para evaluar la posible relación entre el E₂ y la melatonina en la regulación de la proliferación espermatogonial en *R. arenarum*.

En conclusión, los resultados expuestos en este capítulo de la tesis permiten proponer que el E₂ está involucrado en la regulación de la esteroidogénesis y la espermatogénesis. Si bien esta hormona no tiene ningún efecto sobre la actividad ni la cantidad de proteína de la enzima CypP450c17, el tratamiento con E₂ disminuye la actividad de 3β-HSD/I durante el período PostR. Además, el tratamiento con E₂ aumenta la apoptosis de la línea germinal en el período R y las variaciones estacionales en la apoptosis testicular estarían reguladas, al menos en parte, por las variaciones estacionales en las concentraciones de E₂. Por lo tanto, los altos niveles de apoptosis descritos para el período PostR en el *Capítulo 2* podrían deberse a las altas concentraciones plasmáticas de E₂ descritas para este mismo período en el *Capítulo 1*. Además, los resultados expuestos en este capítulo sugieren que todos aquellos cistos que no se hubieron transformado en "matas de espermatozoides" listos para ser espermiados durante la estación reproductiva, son "eliminados" por apoptosis dependiente de E₂ en el período PostR. Por último, en las condiciones experimentales de esta tesis no se observó efecto del E₂ sobre la proliferación espermatogonial. Por lo tanto, para intentar comprender el mecanismo involucrado en las variaciones estacionales de la proliferación celular, sería necesario utilizar otros esquemas experimentales, por ejemplo estudios *in vivo* contemplando la interacción entre el E₂ y otras hormonas, como por ejemplo la melatonina, la testosterona, GnRH y gonadotropinas como FSH. Además, el estudio de las variaciones estacionales en el receptor de E₂ podría también contribuir al entendimiento de la relación

entre el E₂ y la espermatogénesis.

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos en esta tesis.

		PreR	R	PostR
Capítulo 1	E ₂ plasmático	Bajo	Alto	Máximo
	T plasmático	Máximo	Mínimo	Intermedio
	Actividad total de aromatasa	Baja	Alta	Alta
		Producción de E ₂ por el órgano de Bidder a partir de sustratos endógenos Correlación significativa entre E ₂ plasmático, E ₂ producido por el órgano de Bidder y la actividad total de la enzima aromatasa		
Capítulo 2	Apoptosis de la línea germinal	Baja	Baja	Muy alta
	Proliferación de espermatogonias	Baja	Alta	Baja
	Proliferación de células foliculares del órgano de Bidder	Muy baja	Alta	Alta
		Presencia de ERβs en testículo, principalmente en células de Sertoli Presencia de ERβs en el órgano de Bidder (en oocitos y células foliculares)		
Capítulo 3	Efecto de E ₂ sobre CypP450c17	No	No	No
	Efecto de E ₂ sobre 3βHSD/I	No	No	Inhibe
	Efecto de E ₂ sobre apoptosis	No	Estimula	No
	Efecto de E ₂ sobre proliferación de espermatogonias	No	No	No

VI. Conclusiones

V. Conclusiones

Al comienzo de esta tesis se plantearon varias hipótesis teniendo en cuenta los trabajos previos realizados en *R. arenarum* y los antecedentes de estudios endocrinológicos en distintas especies de anfibios. Estas hipótesis se pusieron a prueba a lo largo de esta tesis y, a continuación, se enumera cuáles hipótesis fueron aceptadas y cuáles de ellas fueron rechazadas a partir de los resultados obtenidos en este trabajo.

1. Existen variaciones estacionales en las concentraciones de estradiol plasmático.

Las concentraciones plasmáticas de estradiol son menores en el período PreR y aumentan gradualmente durante los meses correspondientes al período R, alcanzando valores máximos en el PostR. Es decir que los niveles de estradiol plasmático fluctúan a lo largo del año, por lo tanto se acepta esta hipótesis.

2. El órgano de Bidder es capaz de producir estradiol a partir de sustratos endógenos.

Luego de incubar los órganos de Bidder en buffer en ausencia de sustratos exógenos se midió producción de estradiol. Por lo tanto se acepta esta hipótesis.

3. Existe correlación entre las concentraciones plasmáticas de estradiol, la actividad de la enzima aromatasa y la producción de estradiol por parte del órgano de Bidder.

Teniendo en cuenta que los testículos de esta especie no producen estradiol, y considerando que el órgano de Bidder expresa las enzimas necesarias para sintetizarlo, se propuso a este órgano como una de las principales fuentes de estradiol plasmático. Es por ello que se evaluó en qué medida las variaciones de las concentraciones plasmáticas de estradiol estaban asociadas a las variaciones de algunos parámetros del órgano de Bidder. Se observó que existe una correlación positiva y significativa entre las concentraciones plasmáticas de estradiol y los niveles de estradiol

producidos por este órgano. Además, se encontró otra correlación positiva y significativa entre las concentraciones plasmáticas de estradiol y la actividad total de la enzima aromatasa. Por lo tanto se acepta esta hipótesis.

4. Tanto el testículo como el órgano de Bidder expresan el receptor de estrógenos.

Se detectó la presencia del receptor de estrógenos mediante inmunohistoquímica en ambos órganos provenientes de animales recolectados a lo largo del año. En el caso de los testículos se observó que este receptor se localiza en el compartimento intersticial y también en el germinal. Si bien en algunos individuos se observó inmunomarca en los núcleos de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas, el receptor de estrógenos se localiza principalmente en las células de Sertoli asociadas a las matas de espermatozoides y en las proyecciones citoplasmáticas de las células que engloban a los cistos espermátogénicos. Por otra parte se detectó también la presencia del receptor en los citoplasmas de las células foliculares y en los oocitos del órgano de Bidder. En este último caso se observó marca de localización nuclear, perinuclear y en la periferia del ooplasma. Estos resultados sugieren que ambos órganos poseen el receptor de estrógenos y por lo tanto se acepta la hipótesis.

5. La apoptosis en el testículo ocurre principalmente en los estadios más avanzados de la espermatogénesis y no en los estadios tempranos

Los resultados muestran que en los fragmentos testiculares obtenidos de animales capturados a lo largo del año, los núcleos apoptóticos corresponden a espermatocitos I y II y a espermátidas. Los resultados sugieren que los cistos que no diferencian sus células germinales en espermatozoides son "eliminados" por apoptosis y, consecuentemente, las nuevas espermatogonias son quienes darán lugar a la nueva onda espermátogénica. Por lo tanto se acepta esta hipótesis.

6. La apoptosis testicular y la proliferación de las espermatogonias son mayores en el período con máximos niveles de estradiol plasmático.

El estudio de las variaciones estacionales de la apoptosis testicular mediante fluorescencia mostró que la apoptosis de la línea germinal es baja en los períodos PreR y R y es elevada en el período PostR, cuando las concentraciones plasmáticas de estradiol son máximas. Al estudiar las variaciones en la proliferación espermatogonial se observó que la proliferación celular es máxima en el período R y relativamente baja durante el resto del año. El hecho de no haber encontrado máxima proliferación en el período PostR, cuando los niveles de estradiol en plasma son máximos, sugiere que probablemente haya otros factores involucrados en la regulación de la proliferación de la línea germinal. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis.

7. La proliferación de las células foliculares en el órgano de Bidder es mayor cuando los niveles de estradiol plasmático aumentan.

Si bien el aporte del estradiol producido por los órganos de Bidder sería fundamental para explicar las variaciones en las concentraciones plasmáticas de estradiol, esto no estaría relacionado con el peso de los órganos sino probablemente con otros factores, como por ejemplo la proliferación de las células foliculares. Es por ello que se analizaron las variaciones estacionales en la proliferación celular mediante la incorporación de BrdU, encontrándose una proliferación máxima de las células foliculares en los períodos R y PostR cuando los niveles plasmáticos de estradiol y la actividad total de la enzima aromatasa aumentan claramente con respecto al período PreR. Cabe destacar también que si bien se observó una baja proliferación de las células foliculares durante el período PreR, se detectó inmunomarca en los núcleos de los oocitos en este período. Estos resultados sugieren que habría síntesis de DNA en los oocitos del órgano de Bidder durante el período PreR. Por lo tanto, se acepta esta hipótesis.

8. El estradiol regula negativamente la esteroidogénesis testicular al inhibir la actividad de las enzimas esteroidogénicas.

Los resultados sugieren que el estradiol no inhibe ni la actividad ni la cantidad de proteína de la enzima CypP450c17 testicular. En cambio, inhibe la actividad de la enzima 3β -HSD/I sólo durante el período PostR,

sugiriendo que en *R. arenarum* el estradiol podría disminuir la conversión de los 3 β -hidroxi-5-ene esteroides en 3-oxo-4-ene esteroides. En vista de estos resultados, se rechaza la hipótesis.

9. El estradiol regula la espermatogénesis, estimulando la apoptosis y promoviendo la proliferación espermatogonial.

Luego de incubar los fragmentos testiculares con estradiol, se observó que esta hormona induce la apoptosis *in vitro* en el período R, mientras que la apoptosis testicular se mantuvo baja en todas las condiciones del período PreR, y alta en todas las del período PostR. El hecho de que la apoptosis testicular sea mayor en el período PostR, cuando los niveles plasmáticos de E₂ son máximos, constituye una evidencia indirecta *in vivo* y sugiere que los estrógenos inducen la apoptosis testicular en esta especie. Por otra parte, no se observó inducción de la proliferación celular luego de las incubaciones con estradiol, al menos en estas condiciones experimentales, y sería necesaria una aproximación *in vivo* para continuar evaluando el rol de los estrógenos en la proliferación de la línea germinal y la posibilidad de que otros factores estén también participando de esta regulación. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis.

De este modo, los resultados presentados en esta tesis muestran, al menos parte, la importancia que tiene el E₂ en la fisiología testicular de *R. arenarum*. En esta especie el E₂ no es producido por el testículo sino por el BO que, como se describió en el *Capítulo 1*, puede sintetizar esta hormona a partir de sustratos endógenos. Además, las variaciones estacionales en la actividad de la enzima aromatasa contribuyen al entendimiento de las variaciones estacionales en los niveles plasmáticos de E₂. Como se mostró en el *Capítulo 2*, el receptor de E₂ está presente tanto en el BO como en el testículo, lo cual sugiere que esta hormona podría regular no sólo la espermatogénesis sino también la oogénesis en el BO de los machos de *R. arenarum*. En ese mismo capítulo se describió también la estacionalidad en la proliferación celular en ambos órganos y en la apoptosis testicular. Finalmente, en el *Capítulo 3* de esta tesis se observó que el E₂ disminuye la actividad de 3 β -HSD/I en el período PostR y aumenta la apoptosis testicular

in vitro en el período R, lo cual explicaría los altos niveles de apoptosis testicular observados en el período PostR. El hecho que ciertos agentes químicos empleados en la actividad agrícola funcionen como disruptores endócrinos con función estrogénica y que el BO sea un órgano afectado por la actividad agrícola, llevan a cuestionarse qué pasaría en el caso que los BO alcancen un desarrollo mayor en poblaciones de zonas agrarias. ¿Los niveles plasmáticos de E₂ también aumentarían? ¿Qué ocurriría con la regulación de la oogénesis y de la espermatogénesis en machos de esta especie? ¿Cómo afectaría esto a las variaciones estacionales fisiológicas en la apoptosis de la línea germinal y de las enzimas esteroideogénicas testiculares? ¿Qué influencia tendría en la reproducción de los individuos *R. arenarum*? ¿Cómo podría afectar a las poblaciones naturales y, en última instancia, a la especie? Si bien la búsqueda de las respuestas a estos interrogantes está fuera del alcance de esta tesis, los estudios acerca de la regulación del órgano de Bidder y su relación con la fisiología testicular contribuyen a un mayor entendimiento de la endocrinología reproductiva en los bufónidos provenientes de poblaciones naturales.

VII. Bibliografía

VI. Bibliografía

Aschim EL, Saether T, Wiger R, Grotmol T, Haugen TB. 2004. Differential distribution of splice variants of estrogen receptor beta in human testicular cells suggests specific functions in spermatogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 92:97-106.

Abé, S.I., Ji, Z.S., 1994. Initiation and stimulation of spermatogenesis in vitro by mammalian follicle-stimulating hormone in the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Int J Dev Biol.* 38:201-208.

Aitken RJ, De Iuliis GN. 2010. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 16:3-13.

Aitken RJ, Curry BJ. 2011. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal.* 14:367-381.

Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA. 1992. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Proliferat.* 25:241-250.

Andreu-Vieyra CV, Buret AG, Habibi HR. 2005. Gonadotropin-releasing hormone induction of apoptosis in the testes of goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology.* 146:1588-1596.

Andrieux B, Collenot A, Collenot G, Pergrale C. 1973. Morphological aspects of the action of mammalian gonadotro hormones on the testicular activity of the hypophysectomie mature newt, *Pleurodeles waltlii*. *Ann Endocrinol (Paris).* 34:711-712.

Angelova P, Davidoff M, Baleva K, Staykova M. 1991. Substance P- and neuron-specific enolase-like immunoreactivity of roedent Leydig cells in tissue section and cell culture. *Acta Histochem.* 91:131-139.

Antal MC, Krust A, Chambon P, Mark M. 2008. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:2433-2438.

Antila E, Saure A. 1978. Seasonal variation of androgen interconversion in testicular tissue of *Rana temporaria in vitro*. *Experientia*. 35:326-328.

Arvy L. 1962. Présence d'une activité stéroïde-3 β -ol-déshydrogénasique chez quelques Sauropsidés. *Comp Rend*. 225:1803-1806.

Aschim EL, Saether T, Wiger R, Grotmol T, Haugen TB. 2004. Differential distribution of splice variants of estrogen receptor beta in human testicular cells suggests specific functions in spermatogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 92:97-106.

Bagamasbad P, Denver RJ. 2011. Mechanisms and significance of nuclear receptor auto- and cross-regulation. *Gen Comp Endocrinol*. 170:3-17.

Berger L, Speare R, Hines H, Marantelli G, Hyatt AD, McDonald KR, Skerratt LF, Olsen V, Clarke JM, Gillespie G, Mahony M, Sheppard N, Williams C, Tyler MJ. 2004. Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Austr Vet J*. 82:434-439.

Bhasker CR, Adler BS, Dee A, John ME, Kagimoto M, Zuber MX, Ahlgren R, Wang X, Simpson ER, Waterman MR. 1989. Structural characterization of the bovine CYP17 (17 α -hydroxylase) gene. *Arch Biochem Biophys*. 271:479-487.

Biswas NM, Chaudhuri GR, Sarkar M, Sengupta R. 2000. Influence of adrenal cortex on testicular activity in the toad during the breeding season. *Life Sci*. 66:1253-1260.

Blaustein AR, Romansic JM, Kiesecker JM, Hatch AC. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Divers Distrib*. 9:123-140.

Blottner S, Hingst O, Meyer HH. 1996. Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). J Reprod Fertil. 108:299-305.

Botte V, Delrio G. 1967. Effect of estradiol -17 β on the distribution of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the testes of *Rana esculenta* and *Lacerta sicula*. Gen Comp Endocrinol. 9:110-115.

Brown FD, del Pino EM, Krohne G. 2002. Bidder's organ in the toad *Bufo marinus*: effects of orchidectomy on the morphology and expression of lamina-associated polypeptide 2. Dev Growth Differ. 44: 527-535.

Burgos MH, Mancini RE. 1948. Ciclo espermatogénico anual del *Bufo arenarum* Hensel Re. Soc Arg Biol. 24:328-336.

Burgos MH. 1951. Acción de la gonadotropina hipofisaria sobre la línea germinal y el tejido intersticial del testículo de sapo. Rev Soc Arg Biol. 27:331-335.

Burgos MH, Rufino MA. 1952. Acción de las gonadotropinas séricas y coriónicas sobre el testículo del sapo. Rev Soc Arg Biol. 28:159-164.

Burgos MH, Houssay BA. 1957. Acción de LH y FSH sobre espermiación del sapo. Rev Soc Arg Biol. 33:336-339.

Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R. 1972. Primary structure of ovine luteinizing hormone-releasing factor (LRF). Proc Natl Acad Sci USA. 69: 278-282.

Callard GV. 1992. Autocrine and paracrine role of steroids during spermatogenesis: studies in *Squalus acanthias* and *Necturus maculosus*. J Exp Zool. 261:132-142.

Callard IP, Callard GV, Lance V, Bolaffi JL, Rosset JS. 1978. Testicular regulation in non-mammalian vertebrates. Biol Reprod. 18:16-43.

Calisi RM. 2005. Variation in Bidder's Organ volume is attributable to reproductive status in *Bufo woodhousii*. J Herpetol. 39:656-659.

Caneguim BH, Beltrame FL, Luz JS, Valentini SR, Cerri PS, Sasso-Cerri E. 2013a. Primordial germ cells (spermatogonial stem cells) of bullfrogs express sex hormone-binding globulin and steroid receptors during seasonal spermatogenesis. Cells Tissues Organs. 197:136-144.

Caneguim BH, Luz JS, Valentini SR, Cerri PS, Sasso-Cerri E. 2013b. Immunoexpression of aromatase and estrogen receptors in stem spermatogonia of bullfrogs indicates a role of estrogen in the seasonal spermatogonial mitotic activity. Gen Comp Endocrinol. 182:65-72.

Canosa LF, Pozzi AG, Ceballos NR. 1998. Pregnenolone and progesterone metabolism by the testes of *Bufo arenarum*. J Comp Physiol. B. 168: 491-496.

Canosa LF, Ceballos NR. 2001. Effects of different steroid-biosynthesis inhibitors on the testicular steroidogenesis of the toad *Bufo arenarum*. J Comp Physiol. B. 171:519-526.

Canosa LF, Ceballos NR. 2002a. Seasonal changes in testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum* H. Gen Comp Endocrinol. 125:426-434.

Canosa LF, Ceballos NR. 2002b. *In vitro* hCG and human recombinant FSH actions on testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum*. Gen Comp Endocrinol. 126:318-324.

Canosa LF, Pozzi AG, Somoza GM, Ceballos NR. 2002. Effects of mammalian GNRH on testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum*. Gen Comp Endocrinol. 127:174-80.

Canosa LF, Pozzi AG, Rosembit C, Ceballos N.R. 2003. Steroid production in toads. J Steroid Biochem. Mol. Biol. 85:227-233.

Carey C, Alexander MA. 2003. Climate change and amphibian declines: is there a link? *Divers Distrib* 9:111-121.

Cei JM. 1980. Amphibians of Argentina. *Monit Zool Ital. (Italian Journal of Zoology)*. Monografia 2. Edit Board Italia.

Chardard D, Dournon C. 1999. Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltl*. *J Exp Zool*. 283:43-50.

Chianese R, Chioccarelli T, Cacciola G, Ciaramella V, Fasano S, Pierantoni R, Meccariello R, Cobellis G. 2011. The contribution of lower vertebrate animal models in human reproduction research. *Gen Comp Endocrinol*. 171:17-27.

Chianese R, Ciaramella V, Fasano S, Pierantoni R, Meccariello R. 2013. Kisspeptin receptor, CPR54, as a candidate for the regulation of testicular activity in the frog *Rana esculenta*. *Biol Reprod*. 8:1-11.

Chieffi P, Minucci S, Cobellis G, Fasano S, Pierantoni R. 1995. Changes in proto oncogene activity in the testis of the frog, *Rana esculenta*, during the annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol*. 99:127-136.

Chieffi P, Franco R, Fulgione D, Staibano S. 2000a. PCNA in the testis of the frog, *Rana esculenta*: a molecular marker of the mitotic testicular epithelium proliferation. *Gen Comp Endocrinol*. 119: 11-16.

Chieffi P, Colucci-D'Amato GL, Staibano S, Franco R, Tramontano D. 2000b. Estradiol-induced mitogen activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) activity in the frog (*Rana esculenta*) testis. *J Endocrinol*. 167:77-84.

Chieffi P, Varriale B. 2004. Estrogen receptor β localization in the lizard (*Podarcis s. sicula*) testis. *Zygote*. 12:39-42.

Chimento A, Sirianni R, Casaburi I, Pezzi V. 2014. GPER Signaling in spermatogenesis and testicular tumors. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 5:30.

Coady KK, Murphy MB, Villeneuve DL, Hecker M, Jones PD, Carr JA, Solomon KR, Smith EE, van der Kraak G, Kendall RJ, Giesy JP. 2005. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. *Ecotox Environ Safe*. 62:160–173.

Cobellis G, Pierantoni R, Minucci S, Pernas-Alonso R, Meccariello R, Fasano S. 1999. C-fos activity in *Rana esculenta* testis: seasonal and estradiol-induced changes. *Endocrinology*. 140:3238-3244.

Colombo L, Colombo Belvedere P. 1980. Steroid hormone biosynthesis by male Bidder's organs of the toad *Bufo bufo bufo*. *Gen Comp Endocrinol*. 40:320-321.

Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*. 138:4613-4621.

Crain DA, Guillette LJ, Rooney AA, Pickford DB. 1997. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environ. Health Perspect*. 105:528-533.

Davidoff MS, Schulze W, Middendorff R, Holstein AF. 1993. The Leydig cell of the human testis- a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res*. 271:49-439.

Davidson C, Shaffer HB, Jennings MR. 2001. Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat and pesticides hypotheses. *Ecol Appl*. 11:464-479.

Deb C, Chatterjee A. 1963. Histochemical studies on the nature of Bidder's organ in toad (*Bufo melanostictus*). *Endokrinologie*. 44:292-296.

Delgado MJ, Gutiérrez P, Alonso-Bedate M. 1989. Seasonal cycles in testicular activity in the frog, *Rana perezi*. Gen Comp Endocrinol. 73:1-11.

Denari D, Ceballos NR. 2005. 11β -hydroxysteroid dehydrogenase in the testis of *Bufo arenarum*. Changes in its seasonal activity. Gen Comp Endocrinol. 143:113-120.

Denari D, Ceballos NR. 2006. Cytosolic glucocorticoid receptor in the testis of *Bufo arenarum*: seasonal changes in its binding parameters. Gen Comp Endocrinol. 147:247-254.

Di Matteo L, Minucci S, Fasano S, Pierantoni R, Varriale B, Chieffi G. 1988. A gonadotropins-releasing hormone (GnRH) antagonist decreases androgen production and spermatogonial multiplication in frog (*Rana esculenta*): Indirect evidence for the existence of GnRH or GnRH-like material receptors in the hypophysis and testis. Endocrinology. 122:62-67.

d' Istria M, Palmiero C, Serino I, Izzo G, Minucci S. 2003. Inhibition of the basal and oestradiol-stimulated mitotic activity of primary spermatogonia by melatonin in the testis of the frog, *Rana esculenta*, *in vivo* and *in vitro*. Reproduction. 126:83-90.

Dodd CK, Smith LL. 2003. Habitat destruction and alteration: historical trends and future prospects for amphibians. Pages 94-112 in R. D. Semlitsch, editor. Amphibian Conservation. Smithsonian Institution, Washington.

Duellman WE, Trueb L. 1994. Biology of amphibians. McGraw-Hill, New York.

Echeverría DD. 1987. Desarrollo del testículo en *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). Ciclos espermatoogénicos y variaciones estacionales en los sapos juveniles. Rev Mus Arg Cs Nat. 9:125-138.

Echeverría DD. 1990. Organogénesis y ciclos estacionales del órgano de Bidder en las larvas y los juveniles de *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). Cuad Herp. 5:1-9.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol. 148:2207-2216.

Falconi R, Dalpiaz D, Zaccanti F. 2007. Morphological aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia Anura): Bidder's organ differentiation. Anat Rec (Hoboken). 290:801-813.

Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Komatsu T, Morohashi K, Hayes TB, Takayanagi R, Nawata H. 2007. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. Environ Health Perspect. 115:720-727.

Farias CF, Carvalho-e-Silva SP, de Brito-Gitirana L. 2002. Bidder's organ of *Bufo ictericus*: a light and electron microscopy analysis. Micron. 33:673-679.

Farias CF, de Brito-Gitirana L, Carvalho-e-Silva SP. 2004. Bidder's organ in the female of *Bufo ictericus*: Morphological characterization. Contribut Zool. 73:317-319.

Fasano S, Minucci S, Di Matteo L, D'Antonio M, Pierantoni R. 1989. Intratesticular feedback mechanisms in the regulation of steroid profiles in the frog, *Rana esculenta*. Gen Comp Endocrinol. 75:335-342.

Fasano S, D'Antonio M, Pierantoni R. 1991. Sites of action of local estradiol feedback mechanism in the frog (*Rana esculenta*) testis. Gen Comp Endocrinol. 81:492-499.

Fasano S, Goos HJ, Janssen C, Pierantoni R. 1993. Two GnRHs fluctuate in correlation with androgen levels in the male frog *Rana esculenta*. J Exp Zool. 266:277-283.

Fernández Solari JJ, Pozzi AG, Ceballos NR. 2002. Seasonal changes in the activity of cytochrome P450 c17 from the testis of *Bufo arenarum*. J Comp Physiol. 172:685-690.

Ferrara D, Palmiero C, Branco M, Pierantoni R, Minucci S. 2004. Testicular activity of Mos in the frog, *Rana esculenta*: a new role in spermatogonial proliferation. Biol Reprod. 70:1782-1789.

Frost DR. 2011. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5 (31/01/2011). Disponible en <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, Nueva York, EEUU.

Gallardo JM. 1965. Especiación en tres *Bufo* neotropicales (Amphibia, Anura). Papeis Avulsos do Dpto. Zool. 17:57-75.

Gallardo JM. 1974. Anfibios de los alrededores de Buenos Aires. EUDEBA. Buenos Aires, Argentina.

Galas J, Slomczynska M, Pierscinski A. 2003. Effect of photoperiod on the distribution patterns of androgen receptors and steroid hormone concentrations in ovaries of bank voles. Acta Histochem. 105:175-181.

Gervásio CG, Bernuci MP, Silva-de-Sá MF, Rosa-E-Silva AC. 2014. The role of androgen hormones in early follicular development. ISRN Obstet Gynecol. 2014:818010. doi: 10.1155/2014/818010. eCollection 2014.

Gentz EJ. 2007. Medicine and surgery of amphibians. ILAR J. 48:255-259.

Ghosh PK, Gosh AK, Biswas NM. 1984. Effect of cadmium chloride on steroidogenic enzymes in the Bidder's organ of the toad (*Bufo melanostictus*). Experientia. 40:91-92.

Ghosh AK. 1991. Effect of estradiol on spermatogenesis and testicular hydroxysteroid dehydrogenase activities in Bidder's organectomized toad (*Bufo melanostictus*). Acta Physiol Hung. 77:57-61.

Gosner KL, 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica. 16:183-190.

Govoroun M, McMeel OM, Mecherouki H, Smith TJ, Guiguen Y. 2001. 17 β -estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis. Endocrinology. 142:1841-1848.

Grunewald S, Sharma R, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. 2009. Impact of caspase activation in human spermatozoa. Microsc Res Tech. 72:878-888.

Guarino FM, Di Fiore MM, Caputa V, Angelini F, Iela L, Rastogi RK. 1993. Seasonal analysis of reproductive cycle in two wild population of *Rana italica* Dubois. 1985. Anim. Biol. 2:25-43.

Hadfield CA, Clayton LA, Barnett SL. 2006. Nutritional Support of Amphibians. J Exotic Pet Med. 15:255-263.

Hall PF. 1994. Chapter 21: Testicular steroid synthesis: organization and regulation. En: Knobil E., Neill J. (eds), The Physiology of Reproduction, vol I, pp. 1335-1362, Nueva York, Raven Press.

Hanaoka Y, Hayashi H, Takahashi H. 1984. Isolation and characterization of bullfrog gonadotropins. Gunma Symp. Endocrinol. 21:63-77.

Hayashi H, Hayashi T, Hanaoka Y. 1992a. Amphibian lutropin from the bullfrog *Rana catesbeiana*. Complete amino acid sequence of the β subunit. Eur J Biochem. 205:105-110.

Hayashi T, Hanaoka Y, Hayashi H. 1992b. The complete amino acid sequence of the follitropin beta-subunit of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Gen Comp Endocrinol. 88:144-150.

Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A. 2002a. Herbicides: Feminization of male frogs in the wild. *Nature*. 419:895-896.

Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk A. 2002b. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:5476-5480.

Hayes TB, Khoury V, Naravan A, Nazir M, Park A, Brown T, Adame L, Chan E, Buchholz D, Stueve T, Gallipeau S. 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:4612-4617.

Hecker M, Giesy JP, Jones PD, Alarik MJ, duPreez L. 2004. Plasma sex steroid concentrations and gonadal aromatase activities in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) from South Africa. *Environ Toxicol Chem*. 23: 1996–2007.

Hecker M, Kim WJ, Park JW, Murphy MB, Villeneuve D, Coady KK, Jones PD, Solomon KR, Van der Kraak G, Carr JA, Smith EE, du Preez L, Kendall RJ, Giesy JP. 2005 a. Plasma concentrations of estradiol and testosterone, gonadal aromatase activity and ultrastructure of the testis in *Xenopus laevis* exposed to estradiol or atrazine. *Aquat Toxicol*. 72:383-396.

Hecker M, Park JW, Murphy MB, Jones PD, Solomon KR, Van Der Kraak G, Carr JA, Smith EE, du Preez L, Kendall RJ, Giesy JP. 2005 b. Effects of atrazine on cyp19 gene expression and aromatase activity in the testes and on plasma sex steroid concentrations of male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Toxicol Sci*. 86:273-280.

Hickman CP. 1998. Principios integrales de zoología. Mc. Fraw Hill. Madrid.

Holt BG, Lessard JP, Borregaard MK, Fritz SA, Araújo MB, Dimitrov D, Fabre PH, Graham CH, Graves GR, Jønsson KA, Nogués-Bravo D, Wang Z, Whittaker RJ, Fjeldså J, Rahbek C. 2013. An update of Wallace's zoogeographic regions of the world. *Science*. 339:74-78.

Hu F, Smith EE, Carr JA. 2008. Effects of larval exposure to estradiol on spermatogenesis and in vitro gonadal steroid secretion in African clawed frogs, *Xenopus laevis*. Gen Comp Endocrinol. 155:190-200.

Huang H, Cai L, Remo BF, Brown DD. 2001. Timing of metamorphosis and the onset of the negative feedback loop between the thyroid gland and the pituitary is controlled by type II iodothyronine deiodinase in *Xenopus laevis*. Proc Natl Acad Sci USA. 98:7348-7353.

Iriarte JV, Burgos MH. 1958. Bloqueo de la acción espermiante de la gonadotrofina coriónica. Rev Soc Arg Biol. 34:268-272.

Ishii S, Itoh M. 1992. Amplexus induces surge of luteinizing hormone in male toads, *Bufo japonicus*. Gen Comp Endocrinol. 86:34-41.

Itoh M, Inoue M, Ishii S. 1990. Annual cycle of pituitary and plasma gonadotropins and sex steroids in a wild population of the toad, *Bufo japonicus*. Gen Comp Endocrinol. 78:242-253.

Itoh M, Ishii S. 1990. Changes in plasma levels of gonadotropins and sex steroids in the toad, *Bufo japonicus*, in association with behavior during the breeding season. Gen Comp Endocrinol. 80:451-464.

Ito R, Abé SI. 1999. FSH-initiated differentiation of newt spermatogonia to primary spermatocytes in germ-somatic cell reaggregates cultured within a collagen matrix. Int J Dev Biol. 43:111-116.

Jefferson WN, Couse JF, Banks EP, Korach KS, Newbold RR. 2000. Expression of estrogen receptor beta is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. Biol Reprod. 62:310-317.

Ji Z-S, Kubokawa K, Ishii S, Abé S-I. 1992. Differentiation of secondary spermatogonia to primary spermatocytes by mammalian follicle-stimulating hormone in organ culture of testes fragments from the newt, *Cynops pyrrhogaster*. Dev Growth Differ. 34:649-660.

Jia X, Cai C, Wang J, Gao N, Zhang H. 2014. Endocrine-disrupting effects and reproductive toxicity of low dose MCLR on male frogs (*Rana nigromaculata*) in vivo. *Aquat Toxicol.* 155:24-31.

Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C, Lareyre JJ. 2007. GnRH and GnRH receptor sinmetazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol.* 153:346–364.

Kao YH, Alexander PS, Yang VVC, Yu JYL. 1993. Annual patterns of testicular development and activity in the Chinese Bullfrog: *Rana rugulosa* Wiegmann. *Zool Sci (Tokyo).* 10:337-351.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-57.

Kim LW, Im WB, Choi HH, Ishii S, Kwon HB. 1998. Seasonal fluctuations in pituitary gland and plasma levels of gonadotropic hormones in *Rana*. *Gen Comp Endocrinol.* 109:13-23.

Kim D-K, Cho EB, Moon MJ, Park S, Hwang J-I, Kah O, Sower SA, Vaudry H, Seong JY. 2011. Revisiting the evolution of gonadotropins-releasing hormones and their receptors in vertebrates: secrets hidden in genomes. *Gen Comp Endocrinol.* 170:68-78.

King HD. 1908. The structure and development of Bidder's organ in *Bufo lentiginosus*. *J Morphol.* 19:439-465.

Komoike Y, Ishii S. 2003. Cloning of cDNAs encoding the three pituitary glycoprotein hormone β subunit precursor molecules in the Japanese toad, *Bufo japonicus*. *Gen Comp Endocrinol.* 132:333-347.

Kulkarni SS, Singamsetty S, Buchholz DR. 2010. Corticotropin releasing factor regulates the development in the direct developing frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Gen Comp Endocrinol.* 169:225-230.

Langer G, Bader B, Meoli L, Isensee J, Delbeck M, Noppinger PR, Otto C. 2010. A critical review of fundamental controversies in the field of GpR30 research. *Steroids*. 75:603-610.

Langlois VS, Carew AC, Pauli BD, Wade MG, Cooke GM, Trudeau VL. 2010. Low Levels of the Herbicide Atrazine Alter Sex Ratios and Reduce Metamorphic Success in *Rana pipiens* Tadpoles Raised in Outdoor Mesocosms. *Environ Health Perspect*. 118:552-557.

Licht, O. 1973. Induction of spermiation in anurans by mammalian pituitary gonadotropins and their subunits. *Gen Comp Endocrinol*. 20:522-529.

Licht P, Papkoff H. 1974. Separation of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Endocrinology*. 94:1587-1594.

Licht P, Papkoff H, Farmer SW, Muller CH, Tsui HW, Crews D. 1977. Evolution of gonadotropin structure and function. *Recent Prog Horm Res*. 33:169-248.

Licht P, Mc Creery BR, Barnes R, Pang R. 1983. Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids, and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen Comp Endocrinol*. 50:124-145.

Lofts B. 1961. The effect of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on the testis of hypophysectomized frogs (*Rana temporaria*). *Gen Comp Endocrinol*. 1:179-189.

Lofts B. 1974. Reproduction, in: Lofts B., (Ed), *Physiology of the amphibian*. Academic Press, New York.

Lofts B. 1987. Testicular function. En: *Hormones and reproduction in Fishes, Amphibians, and reptiles*. Norris D.O., Jones R.E. (eds), Plenum Press, New York, pp. 283-325.

Lue Y, Hikim AP, Wang C, Bonavera JJ, Baravarian S, Leung A, Swerdloff RS. 1997. Early effects of vasectomy on testicular structure and on germ cell and macrophage apoptosis in the hamster. *J Androl.* 18:166-173.

Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146:3-15.

Mancini RE, Burgos MH. 1947. Acción *in vivo* e *in vitro* de las gonadotrofinas coriónicas y séricas sobre el testículo del sapo (*Bufo arenarum* Hensel). *Arch Soc Argent Anat.* 9:326-330.

Mc Coy KA, Bortnick LJ, Campbell CM, Hamlin HJ, Guillette LJ, St. Marry CM. 2008. Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. *Environ. Health Perspect.* 116:1526-1532.

McGlynn KA, Quraishi SM, Graubard BI, Weber JP, Rubertone MV, Erickson RL. 2008. Persistent organochlorine pesticides and risk of testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst.* 100:663-671.

Meccariello R, Chianese R, Chioccarelli T, Ciaramella V, Fasano S, Pierantoni R, Cobellis G. 2014. Intra-testicular signals regulate germ cell progression and production of qualitatively mature spermatozoa in vertebrates. *Front Endocrinol (Lausanne).* 5:69.

Medina MF, Ramos I, Crespo CA, González-Calvar S, Fernández SN. 2004. Changes in serum sex steroid levels throughout the reproductive cycle of *Bufo arenarum* females. *Gen Comp Endocrinol.* 136:143-151.

Mendonça MT, Licht P, Ryan MJ, Barnes R. 1985 Changes in hormone levels in relation to breeding behavior in male bullfrogs (*Rana catesbeiana*) at the individual and population levels. *Gen Comp Endocrinol.* 58:270-279.

Minucci S, Di Matteo L, Pierantoni R. 1986. *In vivo* and *in vitro* stimulatory effect of a gonadotropin-releasing hormone analog (HOE 766) on

spermatogonial multiplication in the frog, *Rana esculenta*. *Endocrinology*. 119:731-736.

Minucci S, Di Matteo L, Fasano S, Chieffi P, Baccari G, Pierantoni R. 1992. Intratesticular control of spermatogenesis in the frog, *Rana esculenta*. *J Exp Zool*. 264:113-118.

Minucci S, Di Matteo L, Chieffi P, Pierantoni R, Fasano S. 1997. 17β -estradiol effects on mast cell number and spermatogonial mitotic index in the testis of the frog, *Rana esculenta*. *J Exp Zool*. 278:93-100.

Mishra DP, Shaha C. 2005. Estrogen-induced spermatogenic cell apoptosis occurs via the mitochondrial pathway: role of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*. 280:6181-6196.

Miranda LA, Paz DA, Affanni JM, Somoza GM. 1998. Identification and neuroanatomical distribution of immunoreactivity for mammalian gonadotropin-releasing hormone (mGnRH) in the brain and neural hypophyseal lobe of the toad *Bufo arenarum*. *Cell Tissue Res*. 293:419-425.

Montero R, Autino A. 2004. Sistemática y Filogenia de los Vertebrados, con énfasis en la fauna argentina. Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.

Moore FL. 1975. Spermatogenesis in larval *Ambystoma tigrinum*: positive and negative interactions in FSH and testosterone. *Gen Comp Endocrinol*. 26:525-33.

Nair R, Shaha C. 2003. Diethylstilbestrol induces rat spermatogenic cell apoptosis in vivo through increased expression of spermatogenic cell Fas/FasL system. *J Biol Chem*. 278:6470-6481.

Nelson ER, Habibi HR. 2013. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*. 192:15-24.

Neubauer K, Jewgenow K, Blottner S, Wildt DE, Pukazhenthil BS. 2004. Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). Biol Reprod. 71:1517-1524.

Nikula H, Talonpoika T, Kaleva M, Toppari J. 1999. Inhibition of hCG-stimulated steroidogenesis in cultured mouse Leydig tumor cells by bisphenol A and octylphenols. Toxicol Appl Pharmacol. 157:166-173.

Norris DO. 2007. Vertebrate Endocrinology. Fourth Edition, San Diego, Academic Press.

Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. 2009. Kisspeptin signalling in the brain. Endocr Rev. 30:713-743.

Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. 1998. Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, enhances colonization after spermatogonial transplantation into mouse testes. Tissue Cell. 5:583-588.

Ortega HH, Lorente JA, Salvetti NR. 2004. Immunohistochemical study of intermediate filaments and neuroendocrine marker expression in Leydig cells of laboratory rodents. Anat Histol Embryol. 33:309-315.

O' Shaughnessy PJ. 2014. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. Semin Cell Dev Biol. 29:55-65.

Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ. 2004. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. Fertil Steril. 81:802-809.

Pancak-Roessler MK, Norris DO. 1991. The effects of orchidectomy and gonadotropins on steroidogenesis and oogenesis in Bidder's Organs of the toad *Bufo woodhousii*. J Exper Zool. 260:323-336.

Papkoff H, Farmer SW, Licht P. 1976. Isolation and characterization of luteinizing hormone from amphibian (*Rana catesbeiana*) pituitaries. Life Sci. 18:245-250.

Pareek TK, Joshi AR, Sanyal A, Dighe RR. 2007. Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis*. 12: 1085-1100.

Penhos JC, 1956. Effect of Aminopterin and sexual hormones in the toad. *Acta Physiol Lat Am*. 6: 95-99.

Perrin A, Defaye G, Guidicelli C, Chambaz EM. 1991. Purification and properties of steroid 17 α -hydroxylase from calf testis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 40:431-435.

Pierantoni R, Varriale B, Minucci S, Di Matteo L, Fasano S, D'Antonio M, Chieffi G. 1986. Regulation of androgen production by frog (*Rana esculenta*) testis: an *in vitro* study on the effects exerted by estradiol, 5 α -dihydrotestosterone, testosterone, melatonin and serotonin. *Gen Comp Endocrinol*. 64:405-410.

Pierantoni R, Cobellis G, Meccariello R, Fasano S. 2002. Evolutionary aspects of cellular communication in the vertebrate hypothalamo-hypophysio-gonadal axis. *Int Rev Cytol*. 218:69-141.

Pierantoni R, Cobellis G, Meccariello R, Cacciola G, Chianese R, Chioccarelli T, Pierantoni R. 2009. Testicular gonadotropin-releasing hormone activity, progression of spermatogenesis, and sperm transport in vertebrates. *Ann NY Acad Sci*. 1163:279-291.

Pinelli C, Fiorentino M, D'Aniello B, Tanaka S, Rastogi RK. 1996. Immunohistochemical demonstration of FSH and LH in the pituitary of the developing frog, *Rana esculenta*. *Gen Comp Endocrinol*. 104:189-196.

Pisanó A, Burgos MH. 1971. Response of immature gonads of *Ceratophrys ornata* to FSH. *Gen Comp Endocrinol*. 16:176-182.

Pizarro NZ, Burgos MH. 1963. Actions of FSH on the newly differentiated testis of *Bufo arenarum*. *Gen Comp Endocrinol*. 3:644-648.

Plant TM, Marshall GR. 2001. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocr Rev.* 22:764-786.

Polzonetti-Magni A, Botte V, Bellini-Cardellini L, Gobetti A, Crasto A. 1984. Plasma sex hormones and post-reproductive period in the green frog, *Rana esculenta* complex. *Gen Comp Endocrinol.* 54:372-377.

Ponse K. 1927a. Les potencialités de l'organe de Bidder des Crapauds femelles. *C R Soc Biol.* 96:595-596.

Ponse K. 1927b. Les hypotheses concernant la signification de l'organe de Bidder du Crapaud. *Ibrd.* 96:777-778.

Pozzi AG, Lantos CP, Ceballos NR. 1997. Subcellular localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase in testis of *Bufo arenarum* H. *Gen Comp Endocrinol.* 106:400-406.

Pozzi AG, Ceballos NR. 2000. Human chorionic gonadotropin-induced spermiation in *Bufo arenarum* is not mediated by steroid biosynthesis. *Gen Comp Endocrinol.* 119:164-171.

Pozzi AG, Rosembliit C, Ceballos NR. 2006. Effect of human gonadotropins on spermiation and androgen biosynthesis in the testis of the toad *Bufo arenarum* (Amphibia, Anura). *J. Exp. Zool. A Comp Exp Biol.* 305:96-102.

Propper CR. 2011. Testicular Structure and Control of Sperm Development in Amphinians. Cap 3. Hormones and reproduction of vertebrates. Vol 2. Eds: Norris DO, Lopez KH.

Pudney J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc Res Tech.* 32:459-497.

Pudney J. 1998. Leydig and Sertoli cells. Nonmammalian. En: *Encyclopedia of Reproduction.* Knobil E., Neill JD (eds). Academic Press. Vol 2, 1008-1020.

Rastogi RK, Iela L, Saxena PK, Chieffi G. 1976. The control of spermatogenesis in the green frog, *Rana esculenta*. J Exp Zool. 196:151-166.

Rastogi RK, Iela L. 1980. Steroidogenesis and spermatogenesis in anuran Amphibia: a brief survey. In: Delrio, G., Brachet, J. (Eds.), Steroids and their mechanism of action in nonmammalian vertebrates. Raven Press, New York.

Rastogi RK, Iela L, Delrio G, Bagnara JT. 1986. Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. II. The male. Gen Comp Endocrinol. 62:23-35.

Rauci F, Di Fiore MM. 2007. The c-kit receptor protein in the testis of green frog *Rana esculenta*: seasonal changes in relationship to testosterone titres and spermatogonial proliferation. Reproduction. 133:51-60.

Relyea RA, Mills N. 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). Proc Natl Acad Sci USA. 98:2491-2496.

Regueira E. 2012. Regulación de las variaciones estacionales en la sensibilidad testicular a la acción de los glucocorticoides en *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Interrelación testículo-interrenal. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Ricote M, Alfaro JM, García-Tuñón I, Arenas MI, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. 2002. Control of the annual testicular cycle of the marbled-newt by p53, 21, and Rb gene products. Mol Reprod Dev. 32:202-209.

Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. 1997. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. EMBO J. 16:2262-2270.

Rubin W, Scharz B. 1984. Identification of the APUD endocrine cells of rat fundic mucosa by means of combined amine fluorescence and electron microscopy. J Histochem Cytochem. 32:67-75.

Sanderson JT, Letcher RJ, Heneweer M, Giesy JP, van der Berg M. 2001. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ Health Perspect.* 109:1027-1031.

Sarikas SN, Hoyt RF Jr, Sorokin SP. 1985. Ontogeny of small-granule APUD cells in hamster lung: a morphological study. *Anat Rec.* 213:396-409.

Sasso-Cerri E, Miraglia SM. 2002. *In situ* demonstration of both TUNEL-labeled germ cell and Sertoli cell in the cimetidine-treated rats. *Histol Histopathol.* 17:411-417.

Sasso-Cerri E, Faria FP, Freymüller E, Miraglia SM. 2004. Testicular morphological changes during the seasonal reproductive cycle of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J. Exp. Zool.* 301:249-260.

Sasso-Cerri E, Freymüller E, Miraglia SM. 2005. Testosterone-immunopositive primordial germ cells in the testis of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *J Anat.* 206:519-523.

Sasso-Cerri E, Cerri PS, Freymüller E, Miraglia SM. 2006. Apoptosis during the seasonal spermatogenic cycle of *Rana catesbeiana*. *J Anat.* 209: 21-29.

Sassone AG, Regueira E, Scaia MF, Volonteri MC, Ceballos NR. 2014. Development and steroidogenic properties of the Bidder's organ of the tadpole of *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* doi: 10.1002/jez.1897.

Saunders PT, Fisher JS, Sharpe RM, Millar MR. 1998. Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *J Endocrinol.* 156:R13-17.

Scaia MF, Regueira E, Sassone AG, Volonteri MC, Ceballos NR. 2011. The Bidder's organ of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Presence of steroidogenic enzymes. *J. Exp. Zool A. Ecol Genet Physiol.* 15:439-446.

Scheuermann DW, De Groot-Lasseel MH, Stilman C. 1984. A light and fluorescence cytochemical and electron microscopic study of granule-containing cells in the intrapulmonary ganglia of *Pseudemys scripta elegans*. *Am J Anat.* 171:377-399.

Schlatt S, Ehmcke J. 2014. Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective. *Semin Cell Dev Biol.* 29:2-16.

Schulze W, Davidoff MS, Ivell R, Holstein AF. 1991. Neuron-specific enolase-like immunoreactivity in human Leydig cells. *Andrologia.* 23:279-283.

Selva DM, Tirado OM, Toran N, Suarez-Quian CA, Reventos J, Munell F. 2004. Estrogen receptor beta expresión and apoptosis on spermatocytes of mice overexpressing a rat androgen-binding protein transgene. *Biol of Reprod.* 71:1461-1468.

Sette C, Dolci S, Geremia R, Rossi P. 2000. The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int J Dev Biol.* 44:599-608.

Shaha C. 2008a. Estrogens and spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 636:42-64.

Shaha C. 2008b. Germ cell apoptosis: relevance to infertility and contraception. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* 8:66-78.

Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. 2010. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365:1501-1515.

Shalan AG, Bradshaw SD, Withers PC, Thompson G, Bayomy MF, Bradshaw FJ, Stewart T. 2004. Spermatogenesis and plasma testosterone levels in Western Australian burrowing desert frogs, *Cyclorana platycephala*, *Cyclorana maini*, and *Neobatrachus sutor*, during aestivation. *Gen Comp Endocrinol.* 136:90-100.

Shiratsuchi A, Umeda M, Ohba Y, Nakanishi Y. 1997. Recognition of phosphatidylserine on the surface of apoptotic spermatogenic cells and subsequent phagocytosis by Sertoli cells of the rat. *J Biol Chem.* 272:2354-2358.

Shuttlesworth GA, de Rooij DG, Huhtaniemi I, Reissmann T, Russell LD, Shetty G, Wilson G, Meistrich ML. 2000. Enhancement of A spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Endocrinology.* 141:37-49.

Siegel ET, Kim HG, Nishimoto HK, Layman LC. 2013. The molecular basis of impaired follicle-stimulating hormone action: evidence from human mutations and mouse models. *Reprod Sci.* 20:211-233.

Simpson ER, McCarthy JL, Peterson JA. 1979. Evidence that the cycloheximide-sensitive site of ACTH action is in the mitochondrion. *J Biol Chem.* 253:3135-3139.

Sinha Hikim AP, Rajavashisth TB, Sinha Hikim I, Lue Y, Bonavera JJ, Leung A, Wang C, Swerdloff RS. 1997. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod.* 57:1193-1201.

Sinha Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS. 2003. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 5:175-182.

Sinkevicius KW, Laine M, Lotan TL, Woloszyn K, Richburg JH, Greene GL. 2009. Estrogen-dependent and -independent estrogen receptor-alpha signaling separately regulate male fertility. *Endocrinology.* 150:2898-2905.

Smita M, Beyo RS, George JM, Akbarsha MA, Oommen OV. 2005. Seasonal variation in spermatogenic and androgenic activities in a caecilian testis (*Ichthyophis tricolor*). *J Zool Lond.* 267:45-53.

Somoza GM, Paz DA, Stefano AV, Affani JM. 1996. Identification of immunoreactive mammalian gonadotropin-releasing hormone in the brain of metamorphic larvae of *Bufo arenarum Hensel* (Amphibia: Anura). *Int J Dev Neurosci.* 14:663-672.

Sorokin SP, Hoyt RF Jr, Grant MM. 1982. Development of neuroepithelial bodies in fetal rabbit lungs. I. Appearance and functional maturation as demonstrated by high-resolution light microscopy and formaldehyde-induced fluorescence. *Exp Lung Res.* 3:237-259.

Soverchia L, Carotti M, Andreu-Vieyra C, Mosconi G, Cannella N, Habibi H, Polzonetti-Magni AM. 2007. Role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the regulation of gonadal differentiation in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol Reprod Dev.* 74:57-67.

Stabile V, Russo M, Chieffi P. 2006. 17beta-estradiol induces Akt-1 through estrogen receptor-beta in the frog (*Rana esculenta*) male germ cells. *Reproduction.* 132:477-84.

Steel RGD, Torrie JH. 1980. Principles and procedures of statistics. A biomedical approach. Chapter 9. New York. McGraw Hill.

Strbenc M, Fazarinc G, Bavdek SV, Pogacnik A. 2003. Apoptosis and proliferation during seasonal testis regression in the brown hare (*Lepus europaeus* L.). *Anat Histol Embryol.* 32:48-53.

Tajima K, Orisaka M, Mori T, Kotsuji F. 2007. Ovarian theca cells in follicular function. *Reprod. BioMed.* 15:591-609.

Takada K, Ishii S. 1984. Purification of bullfrog gonadotropin: presence of two subspecies of luteinizing hormone with high isoelectric points. *Zool. Sci.* 1:617-629.

Takada K, Kubokawa K, Ishii S. 1986. Specific gonadotropin binding sites in the bullfrog testis. *Gen Comp Endocrinol.* 61:302-312.

Takahashi H, Hanaoka Y. 1981. Isolation and characterization of multiple components of basic gonadotropin from bullfrog (*Rana catesbeiana*) pituitary gland. J Biochem. 90:1333-1340.

Takahashi H, Hanaoka Y. 1985. Characterization of bullfrog gonadotropins molecules in comparison with mammalian hormones. En: Lofts, B., Holmes, W.H. (Eds.), Current Trends in Comparative Endocrinology. Hong Kong University Press, Hong Kong.

Tanimura A, Iwasawa H. 1986. Development of gonad and Bidder's organ in *Bufo japonicus formosus*: histological observation. Sci. Rep. Niigata Univ. D D Biol. 23:11-21.

Tarulli GA, Stanton PG, Lerchl A, Meachem SJ. 2006. Adult sertoli cells are not terminally differentiated in the Djungarian hamster: effect of FSH on proliferation and junction protein organization. Biol Reprod. 74:798-806.

Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E. 2002. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. Hum Reprod. 17:1811-1819.

Tesone AJ, Regueira E, Canosa LF, Ceballos NR. 2012. 5 α -Reductase, an enzyme regulating glucocorticoid action in the testis of *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura). Gen Comp Endocrinol. 176:500-506.

Tsai P-S, Lunden JB, Jones JT. 2003. Effects of steroid hormones on spermatogenesis and GnRH release in male Leopard frogs, *Rana pipiens*. Gen Comp Endocrinol. 134:330-338.

Tsai P-D. 2011. Neuroendocrine control of reproduction in amphibians. Cap 2. Hormones and reproduction of vertebrates. Vol 2. Eds: Norris DO, Lopez KH.

Van Oordt GJ, Klomp H. 1946. Effects of oestrone and gonadotrophin administration in the male toad (*Bufo bufo*). Proc Kon Nederl Akad Wet. (Biol. Med.). 49:565-570.

Van Oordt PGWJ. 1960. The influence of the internal and external factors in the regulation of the spermatogenic cycle in amphibia. Zool Soc London Symp. 2:29- 52.

Van Pelt AM, de Rooij DG, van der Burg B, van der Saag PT, Gustaffson JA, Kuiper GG. 1999. Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. Endocrinology. 140: 478-483.

Varriale B, Pierantoni R, Di Matteo L, Minucci S, Fasano S, D'Antonio M, Chieffi G. 1986. Plasma and testicular estradiol and plasma androgen profile in the male frog *Rana esculenta* during the annual cycle. Gen Comp Endocrinol. 64:401-404.

Vasconsuelo A, Pronsato L, Ronda AC, Boland R, Milanesi L. 2011. Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis. Steroids. 76:1223-1231.

Vicini E, Loiarro M, Di Agostino S, Corallini S, Capolunghi F, Carsetti R, Chieffi P, Geremia R, Stefanini M, Sette C. 2006. 17 β -estradiol elicits genomic and non-genomic responses in Mouse male germ cells. J Cell Physiol. 206: 238-245.

Vincent S, Segretain D, Nishikawa S, Nishikawa SI, Sage J, Cuzin F, Rassoulzadegan M. 1998. Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a Kit-KL interaction critical for meiosis. Development. 125:4585-4593.

Vitt LJ, Caldwell JP. 2009. Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. 3ra edición. Academic Press, Burlington, Massachusetts, EEUU.

Volonteri MC, Ceballos NR. 2010. Mechanism of hCG-induced spermiation in the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Gen Comp Endocrinol. 169:197-202.

Volonteri MC, Regueira E, Scaia MF, Ceballos NR. 2013. Characterization and seasonal changes in LH β and FSH β mRNA of *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Gen Comp Endocrinol. 187:95-103.

Volonteri MC. 2014. Efecto de los esteroides testiculares y del órgano de Bidder sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en el sapo macho *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Wake MH. 1969. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. I. The gonads and the fat bodies. J Morphol. 126:191-331.

Wang C, Cui YG, Wang XH, Jia Y, Sinha Hikim A, Lue YH, Tong JS, Qian LX, Sha JH, Zhou ZM, Hull L, Leung A, Swerdloff RS. 2007. Transient scrotal hyperthermia and levonorgestrel enhance testosterone-induced spermatogenesis suppression in men through increased germ cell apoptosis. J Clin Endocrinol Metab. 92:3292-304.

Wang DH, Hu JR, Wang LY, Hu YJ, Tan FQ, Zhou H, Shao JZ, Yang WX. 2012. The apoptotic function analysis of p53, Apaf1, Caspase3 and Caspase7 during the spermatogenesis of the Chinese fire-bellied newt *Cynops orientalis*. PLoS One. 7(6):e39920.

Wetzel DM, Kelley DB. 1983. Androgen and gonadotropin effects on male mate calls in South African clawed frogs, *Xenopus laevis*. Horm Behav. 17:388-404.

Wiebe JP. 1970. The mechanism of action of gonadotrophic hormones in amphibians. The stimulation of delta 5-3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in testes of *Xenopus laevis* Daudin. J Endocrinol. 47:439-450.

Wiebe JP. 1971. Mechanism of gonadotropin action in Amphibia: Involvement of mitochondria. *Science*. 175:67-68.

Wiebe JP. 1972. On the mechanism and subcellular site of action of gonadotropins with respect to steroidogenic enzyme activity in testes of lower vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*. 3:626-635.

Wright RS. 1971. A reagent for the non-destructive location of steroids and some other lipophilic materials on silica gel thin layer chromatograms. *J Chromatogr*. 59:220-221.

Yazawa T, Yamamoto K, Kikuyama S, Abé SI. 1999. Elevation of plasma prolactin concentrations by low temperature is the cause of spermatogonial cell death in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Gen Comp Endocrinol*. 113:302-11.

Yuwen L, Oral O, Abe K, Eto K, Abé S-I. 2008. The roles of pericyclic cells and Sertoli cells in spermatogonial proliferation stimulated by some growth factors in organ culture of newt (*Cynops pyrrhogaster*) testis. *Gen Comp Endocrinol*. 159:80-87.

Zhang L, Kessler AE, Tsai PS. 2007. Characterization and steroidal regulation of gonadotropin beta subunits in the male leopard frog, *Rana pipiens*. *Gen Comp Endocrinol*. 150:66-74.

Zhang H, Cai C, Wu Y, Shao D, Ye B, Zhang Y, Liu J, Wang J, Jia X. 2013. Mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways involved in microcystin-LR-induced apoptosis of the testes of male frog (*Rana nigromaculata*) in vivo. *J Hazard Mater*. 252-253:382-389.

Zhao Y, Yang D, Zhang Y, Liu S-S, Li D-D, Li S-F, Yan Y-Q. 2008. Comparison of estradiol receptor β expression in the ovary of mice and pigs. *Acta Anat Sinic*. 39:747-750.

Zhou XC, Wei P, Hu ZY, Gao F, Zhou RJ, Liu YX. 2001. Role of Fas/FasL genes in azoospermia or oligozoospermia induced by testosterone undecanoate in rhesus monkey. *Acta Pharm Sinic.* 22:1028-1033.