

Efecto de la Vitamina E en Células Peritubulares de Testículos de Ratones *Mus musculus* Tratados con Ácido Valproico Durante el Estado Fetal y Pubertad

Effect of Vitamin E on Peritubular Cells from Testis of *Mus musculus* Mice Treated with Valproic Acid During the Fetal Stage and Puberty

Mario Pellón¹; Bella Romero²; Mariana Rojas³; Mariano del Sol⁴ & Daniel Conei⁵

PELLÓN, M.; ROMERO, B.; ROJAS, M.; DEL SOL, M. & CONEI, D. Efecto de la vitamina E en células peritubulares de testículos de ratones *Mus musculus* tratados con ácido valproico durante el estado fetal y pubertad. *Int. J. Morphol.*, 41(6):1596-1602, 2023.

RESUMEN: El ácido valproico (VPA) es un fármaco antiepiléptico teratogénico que, al ser administrado durante etapas tempranas del embarazo, puede producir alteraciones en el desarrollo embrionario, las que se manifiestan tanto a nivel del sistema nervioso como del testículo. No obstante, se ha reportado que la administración de vitamina E (VE) podría revertir dichas alteraciones. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto protector de la VE a nivel testicular en fetos y ratones púberes expuestos a VPA durante la fase embrionaria de su desarrollo. Se utilizó un total de 30 ratones hembra adultas gestantes (*Mus musculus*) cepa BALB/c, las cuales se dividieron en 6 grupos. El estudio contempló el análisis de fetos machos a los 17,5 días post-coital (dpc) y machos juveniles a las 6 semanas post-natal. A los grupos 1 y 4 se les administró 0,3 mL de solución fisiológica (grupos control para 17,5 dpc y 6 semanas postnatal, respectivamente). A los grupos 2 y 5 se les suministró la cantidad de 600 mg/kg de VPA (grupos VPA), en tanto que a los grupos 3 y 6 se les aplicó la misma dosis de VPA complementada con 200 UI de VE (grupos VPA+VE). Se describió la histología normal y patológica del compartimento peritubular del testículo. En los grupos VPA se evidenció una degeneración de la pared peritubular, y atrofia de túbulos seminíferos, así como exfoliación de las células germinales. Por el contrario, en los grupos VPA+VE tales signos no fueron observados y la morfología presentó aspecto normal solo con algunas alteraciones focales. Estos resultados corroboran el hecho que la administración de VE contrarresta en parte, los efectos deletéreos que ocasiona el VPA.

PALABRAS CLAVE: Ácido valproico; Vitamina E; Desarrollo testicular; Malformaciones congénitas.

INTRODUCCIÓN

La principal enfermedad crónica no transmisible del sistema nervioso es la epilepsia (OMS, 2019), afección para la cual uno de los tratamientos más utilizados implica la administración de ácido valproico (VPA). Sin embargo, múltiples estudios han demostrado que el VPA resulta ser un agente teratogénico durante la gestación, debido a que produce alteraciones en el estrés oxidativo celular, las que se manifiestan a lo largo del desarrollo prenatal (Ornoy, 2009; Ahmed *et al.*, 2014; Tanoshima *et al.*, 2015). La vitamina E (VE), también denominada α -tocoferol, es un poderoso antioxidante lipofílico absolutamente vital para el mantenimiento de la espermatogénesis de los mamíferos (Aitken & Roman, 2008). Está presente en cantidades particularmente altas en las células sustentaculares (también llamadas célu-

las de Sertoli), en los espermatozoides del estado Paquiteno de la profase I y, en menor medida, en las espermátidas redondas (Yaganathan *et al.*, 1989). La deficiencia de vitaminas C o E conducen a un estado de estrés oxidativo en los testículos lo que, en consecuencia, interrumpe tanto la espermatogénesis como la producción de testosterona (Saito *et al.*, 2020; Sadeghi *et al.*, 2020).

La administración en forma crónica de VPA causa disminución de los niveles de VE y glutatión peroxidasa (Ahmed *et al.*, 2014; Al Deeb *et al.*, 2000), efectos que podrían ser revertidos mediante la administración previa de antioxidantes tales como la vitamina C o E (Hsieh *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2010)

¹ Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

² Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

³ Laboratorio de Embriología Comparada, Programa de Biología Integrativa, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

⁴ Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

⁵ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Aysén, Coyhaique, Chile.

El efecto del VPA ha sido estudiado en la reproducción en ratas macho (Nishimura *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha encontrado que el uso de dicho fármaco puede producir efectos adversos en el ser humano, ya que al ser teratogénico induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres, aumentando el estrés oxidativo, causando daño a estructuras celulares, proteicas y lipídicas, originando además alteración de vías de señalización celular y destrucción del ADN (Conei *et al.*, 2016; 2021). Tales efectos adversos pueden resultar particularmente nocivos, sobre todo en la medicación de mujeres embarazadas, puesto que la administración de VPA puede causar importantes alteraciones en el desarrollo del embrión, tales como malformaciones congénitas, síndrome fetal del VPA y alteraciones en el desarrollo genital (Ornoy, 2009; Conei *et al.*, 2016).

El testículo post puberal cumple dos funciones específicas, i) producción y liberación de hormonas y ii) producción de espermatozoides, la que es regulada por la acción de las hormonas LH y FSH (Vivas *et al.*, 2007). La diferenciación gonadal comienza en el periodo embrionario, cuando las células sustentaculares interactúan con las células germinales primordiales resultando en la formación de los cordones testiculares, que están revestidos por células peritubulares las cuáles separan dichos cordones del tejido intersticial (Rojas *et al.*, 2017).

En la etapa adulta, el testículo está constituido por tres compartimentos a saber, i) Los tubos seminíferos, lugar donde se realiza la espermatogénesis, constituida por células germinales y células sustentaculares (Pardo, 2019); ii) La lámina propia o pared peritubular, que constituye una barrera entre los túbulos seminíferos y el intersticio testicular, (Mayerhofer, 2013) y está compuesta por células peritubulares y matriz extracelular y iii) El intersticio testicular, donde se lleva a cabo la esteroidogénesis (Pino & Sanguinetti, 2014), y está constituido por vasos sanguíneos, vasos linfáticos, macrófagos, células cebadas y células intersticiales.

La pared peritubular es una de las estructuras menos estudiadas, pero se conoce que contribuye potencialmente a la regulación paracrina de la gónada masculina, y que además ejerce influencia sobre las células intersticiales y sustentaculares (Mayerhofer, 2020). Dicha pared está constituida por células peritubulares miofibroblásticas, fusiformes y de aspecto muy delgado que expresan actina (Thompson, 2018). Otra de sus funciones en la etapa post-puberal es transportar espermatozoides inmóviles a la red testicular y al epidídimo a través de una onda generada por los elementos contráctiles de la pared peritubular (Vivas *et al.*, 2007).

Cabe hacer notar que la distribución y el número de células y fibras que se encuentran en la lámina propia varía

dependiendo de la especie. En el caso de especies de roedores, se ha encontrado a continuación de la membrana basal que el peritúbulo consta de dos capas acelulares y dos capas celulares: (1) capa acelular; (2) células mioides o peritubulares; (3) capa acelular y (4) la pared endotelial externa ubicada hacia el intersticio testicular (Rojas *et al.*, 1995). Esto se ilustra esquemáticamente en la figura 1.

Se ha demostrado que las células peritubulares producen importantes efectos en la fertilidad masculina y la espermatogénesis (Nurmio *et al.*, 2012), por lo que es razonable suponer que su exposición a VPA, podría causar alteraciones que afecten el proceso de desarrollo testicular. Abordar su estudio puede contribuir con información útil acerca de los efectos adversos que presenta este fármaco a nivel histológico. El objetivo del presente estudio fue determinar si la administración de VE produce un efecto protector a nivel del peritúbulo testicular en fetos y ratones púberes expuestos a VPA durante la fase embrionaria de su desarrollo.

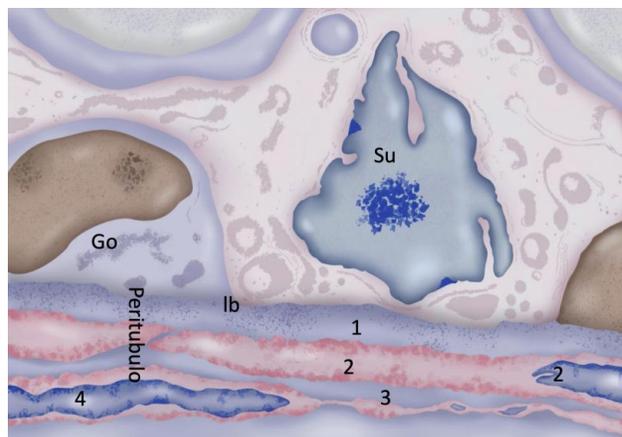


Fig. 1. Representación esquemática de testículo de ratón *Mus musculus*. Corte transversal de cordón testicular. Se observan las cinco capas que componen el peritúbulo: (lb) lámina basal, (1) capa acelular interna, (2) células mioides, (3) capa acelular externa, (4) endotelio. Se representa además una célula sustentacular (Su) y una espermatozoona (Go). (Modificado de Russell *et al.*, 1990).

MATERIAL Y MÉTODO

El presente estudio contó con la aprobación del Comité de Ética Científica n° 122_18 de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Se utilizó un total de 30 ratones hembra adultas de la cepa BALB/c, las que fueron cruzadas con machos reproductores sanos. Se formaron 6 grupos, de 5 ratones cada uno. Los grupos control 1 y 4 recibieron 0,3 mL de solución fisiológica. Los grupos 2 y 5 recibieron 600 mg/kg de VPA (Atemperator®, Laboratorio Recalcine®), en tanto que los grupos 3 y 6 se le administró 600 mg/kg de

VPA y 200 UI de VE (Laboratorio Fasa®). Todos los tratamientos fueron vía oral desde el inicio al término de la gestación. Los grupos 1, 2 y 3 (correspondientes a ratones fetales) se sometieron a eutanasia a los 17,5 días post-coital (dpc) y los grupos 4, 5 y 6 (correspondientes a ratones púberes) a las 6 semanas post-parto. Para este procedimiento se utilizó 10 mg/kg de xilacina y 80 mg/kg de ketamina, inyectadas por vía intraperitoneal.

Las muestras se fijaron durante 48 h mediante inmersión en formalina tamponada con PBS al 10% y se procesaron mediante técnica histológica de rutina. Se realizó, además, técnica inmunohistoquímica mediante un bloqueo de peroxidasa endógena con 0,3% peróxido de hidrógeno en PBS, pH 7,4. Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti PCNA (sc-56, Santa Cruz Biotechnology). La recuperación antigénica se realizó mediante incubación en horno microondas con tampón citrato pH 6,0. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4 °C y el anticuerpo secundario se utilizó conjugado con HRP (Super Picture HRP Polymer Conjugate Broad Spectrum, Life Technologies, 878963), incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como sustrato para HRP, se utilizó Diaminobencidina (DAB, Vector Labs) incubada durante 1-2 minutos. Para el control negativo se desarrolló la técnica inmunohistoquímica completa, pero omitiendo el anticuerpo primario.

Para llevar a cabo el análisis histológico, los preparados histológicos de testículos fueron escaneados y digitalizados utilizando el microscopio NanoZoomer XR C12000 series (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón), obteniendo para cada muestra archivos en formato Whole Slide Imaging (WSI), denominado "placa virtual". La observación de los posibles cambios histopatológicos se llevó a cabo comparando las muestras controles con las de ratones fetales y juveniles que fueron expuestos a VPA y VPA+VE para lo cual se utilizaron las herramientas de medición del Programa NDP-View del Nanozoomer.

Primeramente, se midió el diámetro de 25 cordones o túbulos seminíferos en las muestras controles de 6 semanas post-natal para ser posteriormente analizadas y comparadas con las muestras expuestas a VPA y VPA+VE. Sólo fueron incluidos en esta medición aquellos cordones o túbulos de perfil más redondo en corte transversal, presentes en cada placa virtual.

Análisis estadístico. Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks para el análisis de las células peritubulares y túbulos seminíferos. Dependiendo de la normalidad de los datos, para la comparación entre grupos según su estado de desarrollo, se utilizó el test de ANOVA de una vía con prueba post-hoc de Tukey, o en su defecto, el test de Kruskal Wallis, considerando un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Las variables se expresaron como media \pm desviación estándar.

RESULTADOS

En la figura 1 se indica un esquema del peritúbulo de ratones para reconocer la constitución normal de las capas celulares y evaluar en mejor forma los resultados que se presentan a continuación.

En los grupos fetales de 17,5 dpc, el grupo 1 (control) los núcleos de células peritubulares se observaron dispuestos en forma ordenada en torno al cordón testicular, y no se detectó la presencia de soluciones de continuidad (Fig. 2A). En el grupo 2 (VPA) se observó un menor diámetro de los cordones testiculares, en comparación con el grupo control, sin diferencias significativas (Fig. 3A). Además de lo anterior, también se observaron importantes cambios en la pared peritubular. Los núcleos de aquellas células peritubulares visibles han perdido su organización y ubicación, aparecen soluciones de continuidad, pierden el orde-

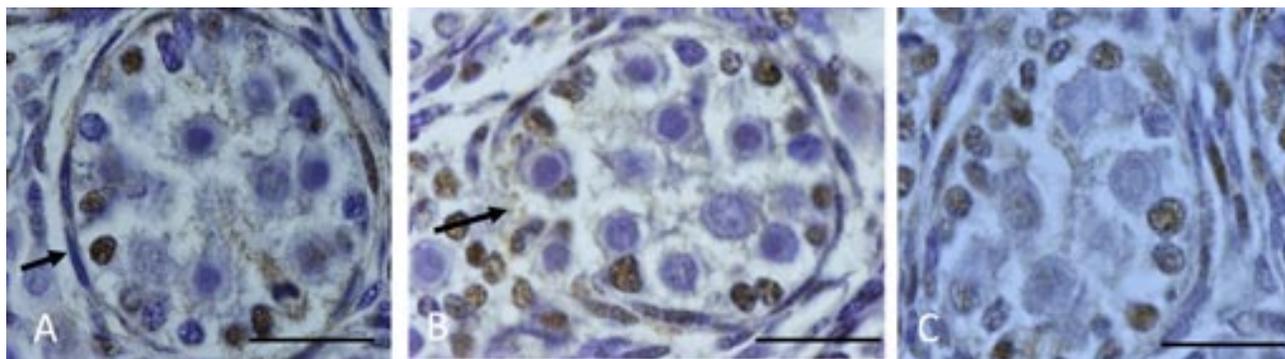


Fig. 2. Cordones testiculares de fetos de ratón *Mus musculus*, de 17,5 días post-coital tratados con anticuerpo anti-PCNA y contrateñidos con hematoxilina. (A) Grupo control, donde se evidencian células mioideas aplanadas (flechas). (B) Grupo VPA, es posible observar una alteración de la pared peritubular, destacada con la flecha. (C) Grupo VPA+VE. Barra de calibración 20 μ m.

namiento, se rompe la membrana basal y se observan restos de células, cuerpos apoptóticos, incluso el peritúbulo desaparece en ciertas áreas (Fig. 2B). Por el contrario, en las muestras del grupo 3 (VPA+VE) en general tanto el compartimento tubular como el peritubular e intersticial se observaron mejor organizados, pero en ocasiones también se evidenció pérdida de la continuidad (Fig. 2C), sin diferencias estadísticamente significativas con el grupo 2 (Fig. 3A).

En relación a los túbulos seminíferos de los grupos de 6 semanas post-natal, el grupo 5 (VPA) se observaron

túbulos seminíferos con presencia de la línea germinal completa y células intersticiales normales, pero las células peritubulares evidenciaron una desorganización focalizada estos alcanzaron un (Figs. 4 y 5). El grupo VPA+VE presentó características prácticamente normales en los compartimentos tubular e intersticial muy similar al grupo control con núcleos de las células claros y regulares, sin embargo algunos túbulos presentaron lesiones en el peritúbulo (Figs. 4C y 5C). No se presentaron diferencias estadísticamente significativas en los diámetros de los túbulos seminíferos entre todos los grupos (Fig. 3B).

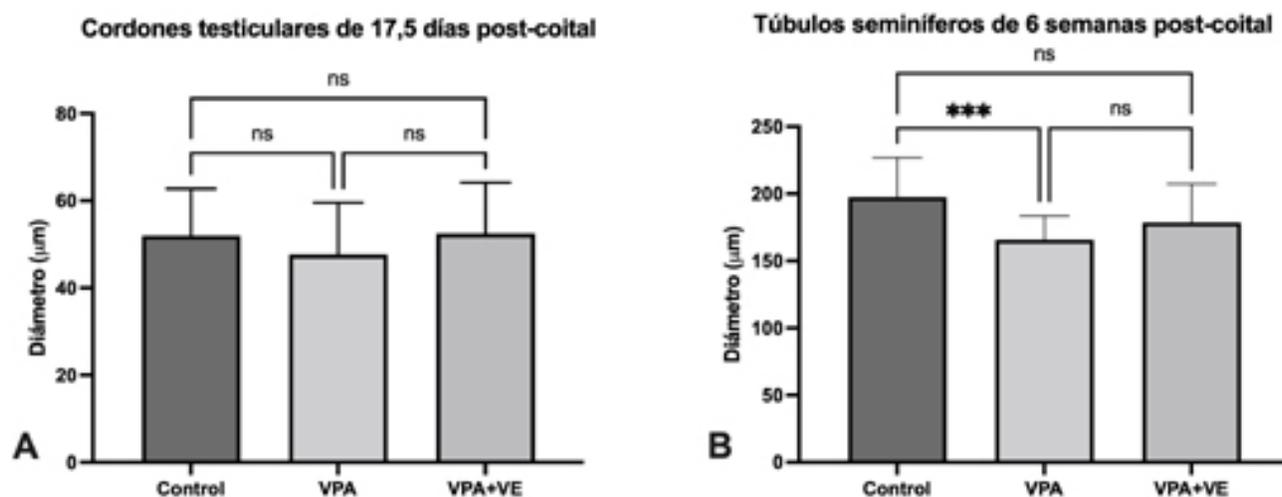


Fig. 3. Gráfico de comparación de los diámetros de cordones testiculares y túbulos seminíferos. (A) Diámetro de cordones testiculares de los grupos de 17,5 días post-coital. (B) Diámetro de túbulos seminíferos de 6 semanas post-natal. Resultados expresados como media±desviación estándar. Test de ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey. (***) valor $p=0,0008$. (ns) valor p no significativo.

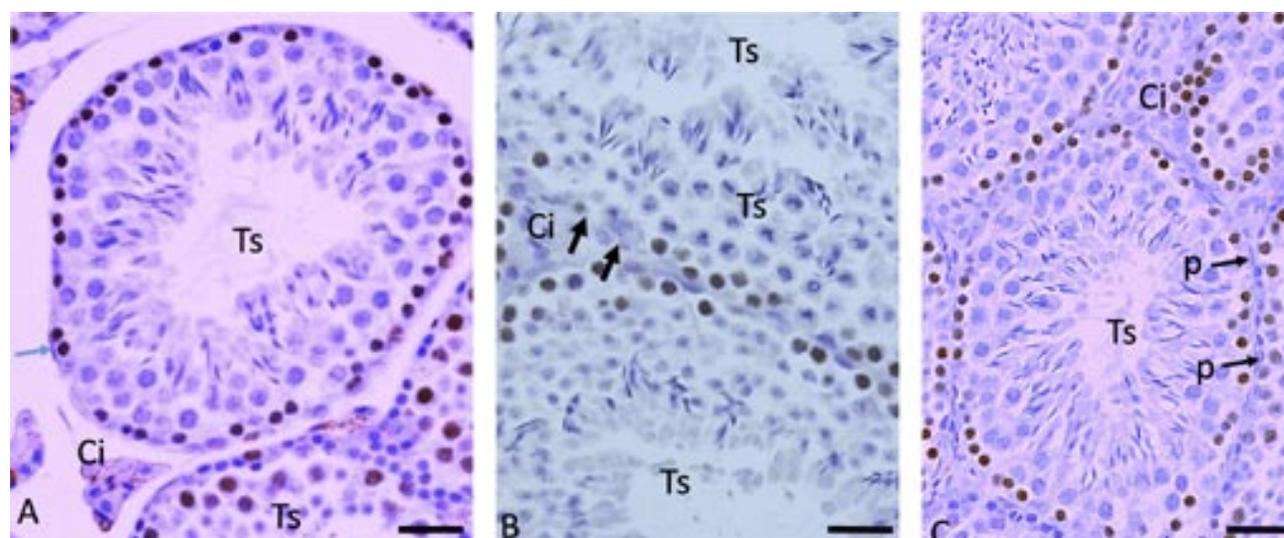


Fig. 4. Túbulos seminíferos de ratón *Mus musculus* juvenil de 6 semanas post-coital. (A) Grupo control, donde los túbulos seminíferos presentan línea germinal completa, las células que están en proliferación se reconocen por el color marrón, se identifican además células intersticiales (Leydig) en los espacios intertubulares y las células peritubulares revisten a los túbulos (flecha). (B) Grupo VPA, se ve irregularidad de peritúbulo (flecha). (C) Grupo VPA+VE, con integridad del peritúbulo. Túbulo seminífero (Ts). Células peritubulares (p). células intersticiales (Ci). Barra de calibración 25 µm.

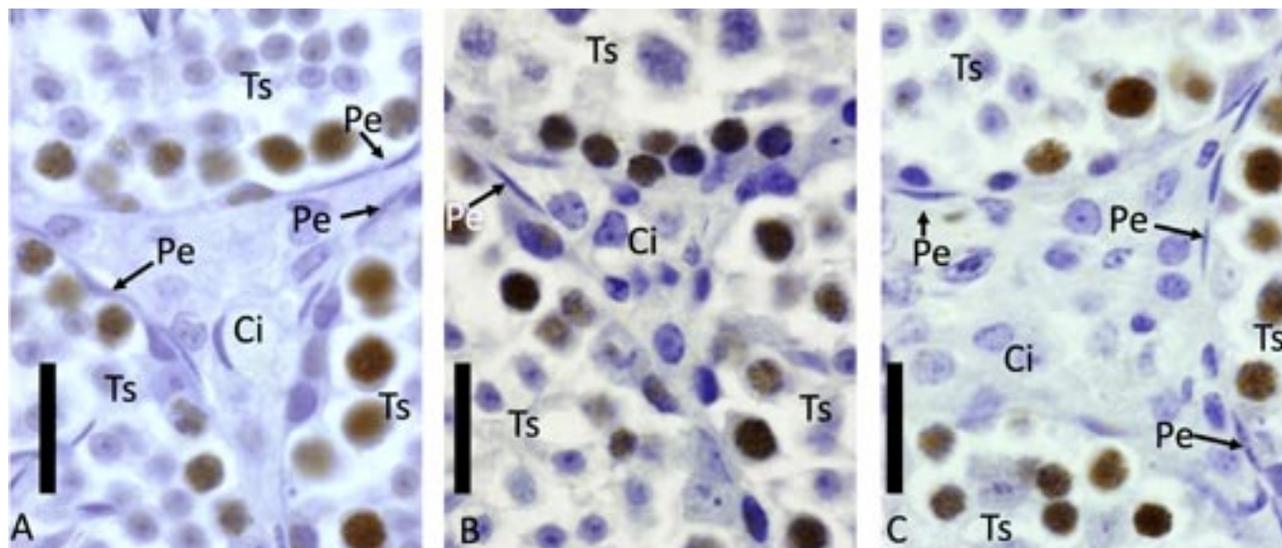


Fig. 5. Túbulos seminíferos de ratón *Mus musculus* juvenil de 6 semanas post-coital. (A) Grupo control. (B) Grupo VPA, se ve irregularidad del túbulo seminífero (flecha). (C) Grupo VPA+VE, los túbulos seminíferos están revestidos por células peritubulares aplanadas. Túbulo seminífero (Ts). Células peritubulares (Pe). Células intersticiales (Ci). Barra de calibración 20 µm.

DISCUSIÓN

En este estudio, se observó que los grupos que fueron tratados con VPA durante su desarrollo embrionario, presentaron cambios histopatológicos reflejados en disminución del diámetro tubular, presencia de células germinales en el lumen tubular, y solución de continuidad en el peritúbulo, lo que fue evidenciado tanto en las muestras de 17,5 dpc como en las de 6 semanas post-parto. Estos hallazgos coinciden con las observaciones de otros autores que han reportado una disminución significativa de los diámetros de túbulos seminíferos expuesto a VPA (Sakr *et al.*, 2014; Immsaard *et al.*, 2017).

Por otra parte, también han sido reportadas lesiones asociadas a atrofia testicular (Isojärvi *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2011). Un estudio realizado por Sukhorum (2017), demostró que el VPA induce atrofia testicular, desprendimiento de células germinales y generación de células gigantes multinucleadas. Dichas lesiones también fueron observadas en el presente estudio en las muestras expuestas a VPA, tanto a los 17,5 dpc como a las 6 semanas post-natal, en las que se observó una desorganización de los compartimentos testiculares, de manera similar a lo descrito por Khan *et al.*, (2011).

El postulado de que el VPA afectaría la integridad general de la membrana testicular, lo que llevaría a una consecuente afectación de las células peritubulares es apoyado por los hallazgos de deformaciones en los túbulos

seminíferos, reportados en el presente estudio. Tales cambios morfológicos se expresan como una aparente desintegración de la pared peritubular en algunas zonas del túbulo, lo que podría incidir en la liberación de las células germinales desde la lámina basal hacia el intersticio testicular, como ha sido previamente reportado en la literatura (Sakr *et al.*, 2014; Sukhorum, 2017).

Cabe señalar en este punto que, entre los antecedentes disponibles en la literatura, se describe mayoritariamente una disminución significativa de los diámetros de túbulos seminíferos expuestos a VPA (Immsaard *et al.*, 2017; Sakr *et al.*, 2014), similar a los hallazgos del presente estudio. No obstante, no evidenciamos cambios significativos entre grupo control y VAP+VE, independiente del estado de desarrollo.

En el presente estudio se observó una serie de lesiones de las células peritubulares expuestas a VPA y muy pocas lesiones en las expuestas a VPA+VE. Aunque actualmente no hay estudios con los cuales se puedan comparar estos resultados, es altamente razonable suponer que la disminución de estas células exfoliadas y la menor desintegración de la pared peritubular de los ratones se deba a la VE. La importancia de este resultado radica en que las alteraciones del peritúbulo pueden alterar funciones testiculares fundamentales asociadas a la fertilidad, sobre todo si se tiene en consideración que las células peritubulares producen efec-

tos yuxtacrinos en las células espermatogoniales y efectos paracrinos de regulación del microambiente testicular general a través de proteínas secretadas (Thompson *et al.*, 2018). En este sentido, se ha demostrado que las células peritubulares secretan factores paracrinos que regulan la función de las células sustentaculares (Rojas *et al.*, 1995) y están mediadas por los andrógenos testiculares sintetizados por las células intersticiales (Huhtaniemi & Pelmiemi, 1992) las que, durante la pubertad, son capaces de diferenciarse en respuesta a una mayor producción de andrógenos (Rojas *et al.*, 2017; Thompson, 2018). Nuestros resultados muestran que la VE reduce los efectos deletéreos causados por el VPA administrado durante la gestación, a lo largo del desarrollo testicular, desde etapas fetales, continuando hasta las etapas puberales

CONCLUSIONES

El ácido valproico administrado durante el desarrollo prenatal, induce lesiones desorganización y desintegración de la pared peritubular, que podría afectar la fertilidad masculina. El tratamiento con vitamina E junto con el ácido valproico, disminuye los efectos morfológicos generados por el ácido valproico y disminuye las alteraciones peritubulares.

AGRADECIMIENTOS. A la Dirección de Investigación de la Universidad de La Frontera, a través del proyecto DIUFRO 21-0003.

PELLÓN, M.; ROMERO, B.; ROJAS, M.; DEL SOL, M. & CONEI, D. Effect of vitamin E on peritubular cells from testis of *Mus musculus* mice treated with valproic acid during the fetal stage and puberty. *Int. J. Morphol.*, 41(6):1596-1602, 2023.

SUMMARY: Valproic acid (VPA) is a teratogenic antiepileptic drug that, when administered during the early stages of pregnancy, can produce alterations in embryo-fetal development, which manifest both at the level of the nervous system and the testicle. However, it has been reported that the administration of vitamin E (VE) could reverse these alterations. The study aimed to determine the protective effect of VE at the testicular level in fetuses and pubertal mice exposed to VPA during the embryonic phase of their development. 30 pregnant adult female mice (*Mus musculus*) BALB/c strain were used, which were divided into 6 groups. The study included the analysis of male fetuses at 17.5 days post-coital (dpc) and juvenile males at 6 weeks post-natal. Groups 1 and 4 were administered 0.3 mL of physiological solution. Groups 2 and 5 were given 600 mg/kg of VPA (VPA groups), while groups 3 and 6 were given the same dose of VPA supplemented with 200 IU of VE (VPA+VE). The normal and pathological histology of the peritubular compartment of the testis was described. In the VPA groups, degeneration of the peritubular wall, and atrophy of the

seminiferous tubules, as well as exfoliation of the germ cells, were evident. On the contrary, in the VPA+VE groups such signs were not observed and the morphology presented a normal appearance with only some focal alterations. These results corroborate the fact that the administration of VE partially counteracts the deleterious effects caused by VPA.

KEY WORDS: Valproic acid, vitamin E, testicular development, congenital malformations.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, R.; Apen, K. & Endean, C. Epilepsy in pregnancy - a collaborative team effort of obstetricians, neurologists and primary care physicians for a successful outcome. *Aust. Fam. Physician*, 43(3):112-6, 2014.
- Aitken, R.J. & Roman, S.D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 1(1):15-24, 2008.
- Al Deeb, S.; Al Moutaery, K.; Arshaduddin, M. & Tariq, M. Vitamin E decreases valproic acid induced neural tube defects in mice. *Neurosci. Lett.*, 292(3):179-82, 2000.
- Conei Valencia, D.; Soler Guerra, B.; Saint-Pierre Contreras, G.; Ortiz Contreras, J. & Rojas Rauco, M. Efectos del tratamiento con vitamina E en el tubo neural y médula espinal en embriones y fetos de ratones *Mus musculus* expuestos al uso de ácido valproico. *Int. J. Morphol.*, 34(2):732-41, 2016.
- Conei, D.; Rojas, M.; Santamaría, L., & Risopatrón J. Protective role of vitamin E in testicular development of mice exposed to valproic acid. *Andrologia*, 53(8):e14140, 2021.
- Hsieh, C. L.; Chen, K. C.; Lin, P. X.; Peng, C. C. & Peng, R. Y. Resveratrol and vitamin E rescue valproic acid-induced teratogenicity: the mechanism of action. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 41(3):210-9, 2014.
- Huhtaniemi, I. & Pelliniemi, L. J. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 201(2):125-40, 1992.
- Iamsaard, S.; Sukhorum, W.; Arun, S.; Phunchago, N.; Uabundit, N.; Boonruangsri, P. & Namking, M. Valproic acid induces histologic changes and decreases androgen receptor levels of testis and epididymis in rats. *Int. J. Reprod. Biomed. (Yazd.)*, 15(4):217-224, 2017.
- Isøjärvi, J. I. T.; Löfgren, E.; Juntunen, K. S. T.; Pakarinen, A. J.; Päivänsalo, M.; Rautakorpi, I. & Tuomivaara, L. Effect of epilepsy and antiepileptic drugs on male reproductive health. *Neurology*, 62(2):247-53, 2004.
- Khan, S.; Ahmad, T.; Parekh, C. V.; Trivedi, P. P.; Kushwaha, S. & Jena, G. Investigation on sodium valproate induced germ cell damage, oxidative stress and genotoxicity in male Swiss mice. *Reprod. Toxicol.*, 32(4):385-94, 2011.
- Mayerhofer, A. Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *Reproduction*, 145(5):R107-R116, 2013.
- Mayerhofer, A. Peritubular cells of the human testis: Prostaglandin E2 and more. *Andrology*, 8(4):898-902, 2020.
- Nishimura, T.; Sakai, M. & Yonezawa, H. Effects of valproic acid on fertility and reproductive organs in male rats. *J. Toxicol. Sci.*, 25(2):85-93, 2000.
- Nurmio, M.; Kallio, J.; Adam, M.; Mayerhofer, A.; Toppari, J. & Jahnukainen, K. Peritubular myoid cells have a role in postnatal testicular growth. *Spermatogenesis*, 2(2):79-87, 2021.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). *Epilepsia*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
- Ornoy, A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus?. *Reprod. Toxicol.*, 28(1):1-10, 2009.
- Pardo Gambarte, L. *El testículo: estructura, función y patología testicular más frecuente*. Facultad de Medicina Universidad de Cantabria. Santander, España, 2017.

- Pino Waller, A. C. & Sanguinetti di Paulo, G. I. *La administración de glucocorticoides y su efecto sobre la expresión de la enzima 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa durante el desarrollo testicular en ovinos*. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay, 2014.
- Rojas, M. A.; Morales, B. & Esponda, P. Effects of photoperiod on structure of lamina propria of the testis of *Octodon degus*. *J. Morphol.*, 226(3):331-338, 1995.
- Rojas, M.; Conei, D. & Bustos-Obregón, E. Interacciones epitelio-mesenquimáticas en el desarrollo testicular. *Int. J. Morphol.*, 35(4):1444-1450, 2017.
- Russel, L. D.; Ettlin, R. A.; SinhaHikim, A. P. & Clegg, E. D. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. 1° ed. Clearwater, FL: Cache River Press, Florida, 1990.
- Sadeghi, A.; Farokhi, F.; Shalizar-Jalali, A. & Najafi, G. Protective effect of vitamin E on sperm quality and in vitro fertilizing potential and testosterone concentration in polyvinyl chloride treated male rats. *Vet. Res. Forum.*, 11(3):257-263, 2020.
- Saito, H.; Hara, K.; Kitajima, S. & Tanemura, K. Effect of vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reprod. Toxicol.*, 98:225-32, 2020.
- Sakr, S. A.; Zowail, M. E. & Marzouk, A. M. Effect of saffron (*Crocus sativus* L.) on sodium valproate induced cytogenetic and testicular alterations in albino rats. *Anat. Cell. Biol.*, 47(3):171-9, 2014.
- Sukhorum, W. & Iamsaard, S. Changes in testicular function proteins and sperm acrosome status in rats treated with valproic acid. *Reprod. Fertil. Dev.*, 29(8):1585-92, 2017.
- Tanoshima, M.; Kobayashi, T.; Tanoshima, R.; Beyene, J.; Koren, G. & Ito, S. Risks of congenital malformations in offspring exposed to valproic acid in utero: A systematic review and cumulative meta-analysis. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 98(4):417-41, 2015.
- Thompson, R. P.; Nilsson, E. E. & Skinner, M. K. *Peritubular myoid cells in testis*. 2° ed. Cambridge, MA: Academic Press, 2018.
- Vivas, G.; Lozano, J. & Velasco, J. Regulación inmuno-testicular y citocinas. *Invest. Clin.*, 48(1):107-21, 2007.
- Yoganathan, T.; Eskild, W. & Hansson, V. Investigation of detoxification capacity of rat testicular germ cells and Sertoli cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 7(4):355-9, 1989.
- Zhang, B.; Wang, X. & Nazarali, A. J. Ascorbic acid reverses valproic acid-induced inhibition of *hoxa2* and maintains glutathione homeostasis in mouse embryos in culture. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 30(1):137-48, 2010.

Dirección para correspondencia:
Daniel Conei Valencia
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad de Aysén
Coyhaique
CHILE

E-mail: daniel.conei@uaysen.cl