



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

IMPACTO DE LA SUBNUTRICIÓN MATERNA DURANTE LA PREÑEZ Y LACTANCIA EN LOS TESTÍCULOS DE RATAS ADULTAS

Mecanismos reguladores hipofisarios e intra-testiculares, factores de transcripción y de crecimiento, proteínas de shock térmico, y apoptóticas

GRACIELA PEDRANA

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY

2020

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

IMPACTO DE LA SUBNUTRICIÓN MATERNA DURANTE LA PREÑEZ Y LACTANCIA EN LOS TESTÍCULOS DE RATAS ADULTAS

Mecanismos reguladores hipofisarios e intra-testiculares, factores de transcripción y de crecimiento, proteínas de shock térmico, y apoptóticas

GRACIELA PEDRANA

DANIEL CAVESTANY

Director de tesis

2020

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

GRACIELA PEDRANA

Facultad de Veterinaria

Universidad de la República - Uruguay

Adriana Geisinger, PhD

Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias

Universidad de la República- Uruguay

Departamento de Biología Molecular y Celular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable– Ministerio de Educación y Cultura- Uruguay

Rossana Sapiro Dra, PhD

Departamento de Histología y Embriología

Facultad de Medicina

Universidad de la República – Uruguay

Carolina Viñoles DVM, PhD

Comisión Coordinadora del Interior –

Universidad de la República - Uruguay

2020

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA URUGUAY

FVET Facultad de Veterinaria Universidad de la República Uruguay

Unidad de Posgrados
-Oficina de Posgrados-

ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Doctorado

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 16 de diciembre de 2020

TRIBUNAL: Dra. Rossana Sapiro (Presidente), Dra. Adriana Geisinger, Dra. Carolina Viñoles

	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
	PEDRANA, Graciela	**6**	**BBB**

PRESENTADO	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL	FIRMA
Dra. Rossana Sapiro (Presidente)	
Dra. Adriana Geisinger	
Dra. Carolina Viñoles	

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Defensa de Tesis pueden ser:
B.B.B.- 6 o S.S.S.-12

DEDICATORIAS Y/O AGRADECIMIENTOS

Dedicado a mamá

No te rindas, aún está a tiempo
De alcanzar y comenzar de nuevo,
Aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,
liberar el lastre, retomar el vuelo.
No te rindas que la vida es eso, continuar el viaje,
perseguir tus sueños, destrabar el tiempo,
correr los escombros y destapar el cielo.

Esta tesis se la dedico a mi madre Margarita que fue mi sostén durante toda mi vida, especialmente desde los 11 años que papá falleció y que ya hace 3 años está seguramente con mi padre apoyándome desde el cielo. A ella y a su lucha contra el cáncer de mama le dedico esta tesis. A mis hijas Victoria y Agustina que son mi luz y mi camino, por ellas lucho y lucharé siempre a pesar de todas las adversidades allí estaré. Aprendo todos los días a ser madre y cada vez más entiendo a mi madre y abuela.

A mi tutor, Daniel por su apoyo incondicional, su paciencia, firmeza y capacidad de organización y por confiar en mi proyecto e impulsarme a seguir y ser mejor investigadora. También a mis apoyos Graeme Martin por su don de gente, su capacidad de hacer pensar y organizar ideas. A Débora Sloboda y Mark Vickers también por su colaboración permanente. Thanks for supporting me at distance! Including in these difficult times during the pandemic. You help me a lot in thinking in English too!

A toda mi familia, especialmente a mi abuelo Carlos "Belo" quien me inculcó lo que era ser un veterinario y por el que decidí hacer la carrera de veterinaria. Pero no solo me inculcó la carrera sino la investigación. En sus papeles del laboratorio anotaba todas las investigaciones de vacunas como veterinario. Amaba leer esos escritos largos, escritos a mano y después en mimeógrafo. Hoy siento que cada día que dediqué a escribir esta tesis él estuvo conmigo. Al padre de mis hijas que cuando lo necesité por estar dedicada al doctorado y no pude salir fines de semana por estar largas horas escribiendo, así como estar en Facultad en el laboratorio hasta largas horas él estuvo con ellas. También a mis suegros Tere y Roberto que siempre están, y a Daniel que estará con mamá, Margaret, seguramente.

A todas mis primas amigas los que están a allí incluyo a mis primas Belisa, Gaby, Bibiana, Patricia, Betania, Cecilia, Bethel, Graciana por estar en los momentos buenos y en los malos también siempre apoyando. Al futuro, a mis sobrinas y sobrinos hermosos, Juli, Luli, Lauti, León, Guille, Rafi, Clari, Bianca que alegran la vida con sus sonrisas. Y también a Juani, Santiago, Mauro, Alfredo y Liliana, Gerardo, Gabriel. A mis tías y tíos, a los que están Susana, Cristina, Estela, Ana María, Quique, Servando, Anita, Norber, Tito, Alfredo tío hermano y a los que no están, a Jorge que estará con mamá en el cielo.

A mis amigos Beatriz, Claudia, José, Quique, Helen, Helena, Mariana, María Noël, Virginia, Selene, Victoria y todos los que de alguna u otra manera siempre me apoyaron en mi camino dando fuerzas. A Virginia y a Jessica por su apoyo y muy especialmente porque me ayudaron a salir del dolor de la pérdida de mi madre con su alegría. También lo dedico a los que no apoyan y los que siempre ponen peros o piedras en el camino porque lo que no saben es que te hacen más fuerte y te ejercitan para los retos de la vida. También a los compañeros de Biociencias y de toda la Facultad, funcionarios no docentes y docentes, los que te alegran el día y a los que no y aprendemos a seguir regalándole una sonrisa para tratar de hacer más alegre la vida. A los compañeros de Histología, Alicia Alejandro, Emiliano, Fernanda, Helen, Martín, Mónica, Patricia, Paula, y a todos, gracias por comprender y alegrarse por mis logros y apoyarme en este camino. También a las compañeras que fueron durante este período del doctorado compañeras en histología y ayudantes CIDEC Ana, Florencia, Valeria, Daniela, María Laura.

Lo dedico muy especialmente a todas las integrantes de nuestro grupo HSPs, Camila, Alejandra, Sofía, Nadia, Ana, Helen, Mariana, Noelia, Daniela, Paula, Laura, muchas gracias por ser un grupo humano fantástico, con quienes estamos cerca a pesar de las distancias.

A todos los dinosaurios compañeros y amigos de la AEV de los que filosofamos, que te apoyan y sostienen desde un punto humano, más que necesarios para enfrentar los retos no solo académicos sinos los más duros, lo que te impone la vida.

Por último, pero no menos importante, a los estudiantes de la facultad de veterinaria, que son el futuro de nuestra profesión y la nueva generación que alcanzará

seguramente logros de doctorados centrados en las bases de una ciencia que sea pensada en el bienestar y salud animal. También, con el pensamiento centrado en una producción animal que tenga un menor impacto del ambiente, comprometidos en la influencia de la relación salud humana y salud animal como una sola, con la cabeza con ideales firmes de empatía, solidaridad, compartir el conocimiento, protección del ambiente, ser agradecidos y valorar cada espacio de formación en los posgrados en nuestra Facultad. Todos estos son valores que tratamos de impartir en nuestras clases. A todos ellos gracias por hacer con sus preguntas e inquietudes mejores docentes, científicos y personas capaces de ponerse en el lugar del otro, generando seres humanos empáticos con ganas de aprender y con curiosidad por comprender los temas atrapantes de las ciencias veterinarias.

LISTADO DE ABREVIATURAS

Apaf1: apoptotic protease-activating factor-1, factor apoptótico activador de proteasa

IGF-I: insulin like growing factor, factor de crecimiento similar a insulina I

GDNF: glial cell line derived neurotrophic factor, factor neurotrófico derivado de células gliales

ETV5: E26 transformation variant 5, ets-related molecule, transcription variant.5, factor de transcripción variante 5

HSP90: heat shock protein 90, proteina de shock térmico 90

HSP70: heat shock protein 70, proteina de shock térmico 70

HSF1: heat shock transcription factor 1, factor de transcripción 1

FSH: follicle stimulating hormone, hormona folículo estimulante

LH: luteinizing hormone, hormona luteinizante

ICSH: Interstitial Cell Stimulating Hormone

Caspase-3: cysteinyl-aspartate protease 3, cisteinil aspartato proteasa

Bax: BCL2 associated X apoptosis regulator.

Bcl-2: B-cell leukemia/lymphoma 2

SSC: spermatogonial stem cell, células madre espermatogonias

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Tabla 1. Efectos de la subnutrición materna en ratas y ovinos según el período sobre la reproducción en el macho. P = Preñez y L= lactancia.....61

Figura 1. Esquema de envolturas testiculares. 10

Figura 2. Esquema representativo de testículo y epidídimo en rata en corte sagital. 12

Figura 3. Imágenes histológicas de testículo de rata adulta con hematoxilina-eosina.17

Figura 4. Esquema representativo de sector de parénquima de testículo..... 18

Figura 5. Esquema representativo de las células de Sertoli adulta y su morfología de ramificaciones que rodean a las células germinales..... 23

Figura 6. Desarrollo embrionario del testículo. 24

Figura 7. Etapas de la espermatogénesis..... 25

Figura 8. Esquema representativo de los estadios del ciclo espermatogénico o ciclo del epitelio seminífero con las 14 asociaciones celulares posibles de observar en los túbulos seminíferos de la rata..... 33

Figura 9. Imágenes representativas de los estadios del ciclo espermatogénico en la rata. 34

Figura 10. Ontogenia de células de Sertoli, germinales y células de Leydig en el testículo de rata. 36

Figura 11. Esquema representativo de las poblaciones celulares en el testículo de rata durante de vida fetal y postnatal temprana..... 37

Figura 12. Factores reguladores del microambiente testicular..... 52

Figura 13. Esquema resumido de teoría de programación fetal..... 53

Figura 14. Esquema del síndrome de disgenesia testicular propuesto por Sharpe y Skakkebaek (2008) abreviado..... 55

Figura 15. Selección de los principales efectos estudiados de la subnutrición materna en las crías macho. 60

Figura 16. Resultados de morfología peso a la pubertad, edad a la pubertad, peso a los 160 días, peso testicular e índice gonadosomático 70

Figura 17. Efectos de la subnutrición materna durante la preñez y /o lactancia sobre la morfología testicular de ratas en la vida adulta 73

Figura 18. Efectos de la subnutrición materna sobre la concentración sérica de FSH e inhibina y sobre la inmunoexpresión testicular de inhibina. 74

Figura 19. Efectos de la subnutrición materna sobre la inmunoexpresión testicular de 3β-HSD. 76

Figura 20. Efectos de la subnutrición materna durante la preñez y /o lactancia sobre la inmunoexpresión testicular del factor de transcripción HSF1 en testículos de ratas de la progenie en la vida adulta..... 77

Figura 21. Efectos de la subnutrición materna durante la preñez y /o lactancia sobre la inmunoexpresión testicular del factor de crecimiento similar a insulina IGF-I en testículos de ratas de la progenie en la vida adulta. 79

Figura 22. Efecto de la subnutrición materna sobre la inmunoexpresión del factor de transcripción ETV5 81

Figura 23. Efecto de la subnutrición materna sobre la inmunoexpresión del factor de transcripción GDNF 82

Figura 24. Efecto de la subnutrición sobre los transcriptos ARNm de caspasa-3 y la inmunoexpresión de caspasa-3 activa en testículo de ratas adultas. 83

Figura 25. Efecto de la subnutrición materna sobre los transcriptos de Bax y la inmunoexpresión de Bax en el testículo de ratas adultas. 84

Figura 26. Efecto de la subnutrición materna durante la preñez y/o lactancia sobre la inmunoexpresión de la proteína de shock térmico HSP70 en el testículo de sus crías adultas. 86

Figura 27. Efecto de la subnutrición materna durante la preñez y/o lactancia sobre la inmunoexpresión de la proteína de shock térmico HSP90 en el testículo de sus crías adultas. 87

Figura 28. Efecto de la subnutrición maternal sobre los transcriptos de Bcl-2 e inmunoexpresión de Bcl-2 en testículo de ratas adultas. 89

Figura 29. Efecto de la subnutrición materna sobre la inmunoexpresión de Bcl-2 en túbulos seminíferos de testículo adulto de en estadio VIII. 90

Figura 30. Resumen de resultado y discusión de los efectos de la subnutrición materna durante la preñez (a), lactancia (b) o ambos periodos (c) sobre el testículo de animales adultos y algunos de los mecanismos subyacentes de programación fetal. 92

Figura 31. Esquema representativo del efecto propuesto de la subnutrición materna sobre la alteración de la regulación del eje hipofisario-gonadal FSH-inhibina 95

Figura 32. Esquema representativo de los mecanismos del eje IGF-I, IGFR1 que actúan en la programación por subnutrición materna en el testículo de ratas adultas. 98

Figura 33. Esquema representativo de los mecanismos que actúan en la programación por subnutrición materna en el testículo de ratas adultas sobre los factores locales.. 98

Figura 34. Esquema propuesto de de-diferenciación de células de Sertoli por subnutrición materna durante la preñez y/o lactancia, con el consiguiente aumento de número de células de Sertoli por efecto compensatorio..... 100

Figura 35. Resumen esquemático de los resultados obtenidos de los efectos de la programación por subnutrición materna, y los mecanismos involucrados de programación en el testículo de las crías adultas. 114

Figura 36. Esquema representativo de redes de proteínas actuantes en la programación fetal por subnutrición y sus vinculaciones. 115

APENDICE

Esta tesis se ha basado en los siguientes artículos científicos originales, referidos como Artículos I y II que se adjuntan al final de esta tesis:

I. Pedrana G., Viotti H., Lombide P., Cavestany D., Martin G. B., Vickers M. H., and Sloboda D. M. (2020). Maternal undernutrition during pregnancy and lactation affects testicular morphology, the stages of spermatogenic cycle, and the testicular IGF-I system in adult offspring. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 11, 473–483. doi:10.1017/S2040174420000306

II. Pedrana, G.; Larrañaga, C.; Díaz, A.; Viotti, MH.; Lombide, P.; Cavestany, D.; Vickers, M.; Martin, GB.; Sloboda, DM. Maternal undernutrition during pregnancy and lactation increases transcription factors, ETV5 and GDNF, and alters regulation of apoptosis and heat shock proteins in the testis of adult offspring in the rat. Enviado a *Reproduction, Fertility and Development*. 2020.

Tabla de contenido

DEDICATORIAS Y/O AGRADECIMIENTOS i
LISTADO DE ABREVIATURAS iv
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS v
RESUMEN xiv
SUMMARY xv
1. INTRODUCCIÓN 1
2. ANTECEDENTES 3
2.1. Importancia de la espermatogénesis en producción animal 3
2.2. Estructura anatómica de envolturas testiculares y testículo adulto en mamíferos 4
2.2. Estructura del testículo 7
2.2.1. Cápsula testicular: Túnica albugínea y estrato vascular 7
2.2.2. Mediastino testicular 7
2.3. Estructura histológica del parénquima testicular 8
2.3.1. Intersticio testicular 8
2.3.1.1. Células de Leydig 9
2.3.1.2. Esteroidogénesis: síntesis de hormonas lipídicas andrógenos 9
2.3.2. Tejido peritubular 11
2.3.3. Túbulos seminíferos 11
2.3.3.2.Células de Sertoli 14
2.3.3.2.4. Uniones estrechas entre Sertoli y la barrera hemato-testicular .. 18
2.3.3.2.5. Diferenciación de células de Sertoli 18
2.3.3.3.Células germinales 19
2.4. Espermatogénesis en mamíferos 21
2.4.1. Primera fase: fase proliferativa o mitótica 21
2.4.2. Segunda fase: Meiosis 22
2.4.3. Tercera fase: espermiogénesis 24
2.5. Ciclo espermatogénico o ciclo del epitelio seminífero 26
2.5.1. Descripción de estadios del epitelio seminífero en la rata 27

2.6. Desarrollo testicular: ontogenia de células de Sertoli y células germinales 31

2.7. Factores involucrados en el desarrollo de una espermatogénesis normal, balance entre proliferación y apoptosis 33

2.7.1. Proteínas apoptóticas en el testículo 34

2.7.1.1.Proteína apoptótica caspasa-3 en el testículo 35

2.7.1.2.Proteína apoptótica Bax en el testículo 36

2.7.1.3.Proteína apoptótica Bcl-2 en el testículo 36

2.7.2. Factores de crecimiento, factores de transcripción y hormonas producidos por células de Sertoli involucrados en la espermatogénesis 37

2.7.2.1. Factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I) 38

2.7.2.2. Hormona inhibina 39

2.7.2.3. Factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) 39

2.7.2.4. Factor de transcripción etv variante del gen 5 ETV5 40

2.7.3. Proteínas de shock térmico y factor de transcripción HSF-1 41

2.7.3.1. Proteína de shock térmico HSP70 en reproducción masculina 43

2.7.3.2. Proteína de shock térmico HSP90 en reproducción masculina 44

2.7.3.3. Factor de transcripción de shock térmico HSF1 en reproducción masculina 46

2.8. Importancia en la espermatogénesis de los factores hormonales inhibina B, factores de crecimiento IGF-I y de transcripción GDNF y ETV5 producidos por las células de Sertoli 47

2.9. Programación fetal: Orígenes durante el desarrollo de la salud y enfermedad 49

2.9.1. Enfermedades reproductivas durante el desarrollo en el hombre o síndrome de disgenesia testicular 50

2.9.2. Subnutrición materna como factor de programación fetal: efectos sistémicos 52

2.9.3. Efectos de la subnutrición materna sobre IGF-I 53

2.9.4. Subnutrición materna como factor de programación fetal: efectos reproductivos 54

2.9.5. Posibles moléculas que median los efectos de programación fetal 58

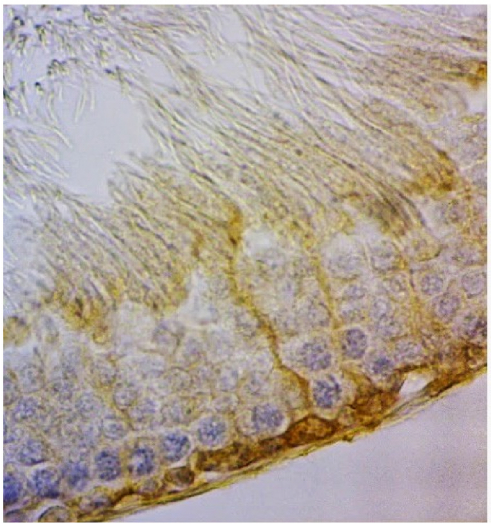
3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA 59

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 60

4.1. Hipótesis 60
4.2. Objetivos 60
4.2.1. Objetivo General 60
4.2.2. Objetivos Específicos 60
5. MATERIALES Y MÉTODOS 62
5.1. Animales y diseño experimental 62
5.2. Estrategia de la investigación 63
5.2.1. Etapa 1: Estudios hormonales de FSH, inhibina, IGF-I, estadios del ciclo espermatogénico, esteroidogénesis y morfometría testicular. 63
5.2.2. Etapa 2: Estudios de factores de transcripción, proteínas apoptóticas y de shock térmico 63
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 64
6.1. Resultados y discusión. Presentación de los trabajos 64
6.1.1. Manuscrito I 64
6.1.1.1. Resultados y discusión de los efectos de la subnutrición materna sobre el peso a la pubertad, edad a la pubertad, peso a los 160 días, peso testicular e índice gonadosomático. 65
6.1.1.2. Efectos de la subnutrición materna sobre la morfología y espermatogénesis: estadios del ciclo espermatogénico y morfología testicular, diámetro túbulos seminíferos y proliferación de espermatogonias. 67
Se determinaron cambios en 67
6.1.1.3. Hormonas FSH e inhibina sérica e inhibina testicular: efecto de la subnutrición materna sobre eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. 70
6.1.1.4. Enzima 3B- HSD y Factor de transcripción HSF-1: efectos de la subnutrición en la regulación de la esteroidogénesis 72
6.1.1.5. subnutrición materna efectos sobre el factor de crecimiento IGF-I testicular. 74
6.1.2. Manuscrito II 76
6.1.2.1. Aumento ETV5 y GDNF: Efecto de la subnutrición materna sobre los principales factores de transcripción en el testículo 76
6.1.2.2. Aumento de caspasa-3 y Bax: Efecto de la subnutrición materna sobre la expresión de proteínas apoptóticas en el testículo de crías adultas 79
6.1.2.3. Aumento de HSP70 y disminución de HSP90: Efecto de la subnutrición materna sobre la expresión e inmunoexpresión de proteínas de shock térmico 81

6.1.2.4. Aumento de Bcl-2: Resultados de la inmunoexpresión de factor anti-apoptótico en células testiculares. 85
6.2. DISCUSIÓN GENERAL 87
¿Cuál es el período de subnutrición materna que genera más alteraciones? 87
6.2.1. Alteración del eje FSH hipofisaria – inhibina testicular por efecto de la subnutrición materna 89
6.2.2. IGF-I y los transcriptos de sus receptores IGF1R en testículos de ratas adultas subnutridas 92
6.2.3. Número de células de Sertoli: efectos de la subnutrición materna en el testículo sobre el número de las células de Sertoli 95
6.2.4. Número de células germinales espermatogonias por efecto de la subnutrición y su vinculación con aumento de GDNF y ETV5 99
6.2.5. Factores de transcripción afectados: Efecto de la subnutrición materna sobre los factores de transcripción en el testículo 100
6.2.5.1. ETV5: Efecto de la subnutrición materna sobre el factor de transcripción ETV5 100
6.2.5.2. GDNF: Efecto de la subnutrición materna sobre el factor de transcripción GDNF 101
6.2.6. Consecuencias de la subnutrición materna sobre ciclo del epitelio seminífero y sus estadios 102
6.2.7. Efecto de la subnutrición materna sobre la estructura testicular 104
6.2.8. Efecto de la subnutrición materna sobre las proteínas anti y pro-apoptóticas en los testículos 105
6.2.8.1 Caspasa-3 en testículos de ratas adultas subnutridas 105
6.2.8.2 Bax en testículos de ratas adultas subnutridas durante gestación y/o lactancia 105
6.2.8.3 Bcl-2 en testículos de ratas adultas subnutridas durante gestación y/o lactancia 105
6.2.9. Efecto de la subnutrición sobreel factor de trasncripción HSF1 y las proteínas de shock térmico 106
6.2.9.1. HSF-1 Regulación del factor de shock HSF1 106
6.2.9.2. HSP70: Efecto de de subnutrición materna sobre la proteína de shock térmico HSP70 108
6.2.9.3. HSP90: Efecto de la subnutrición materna y efecto sobre la proteína de shock térmico HSP90 108
7. CONCLUSIONES GENERALES 112

Aportes al conocimiento de la programación fetal por subnutrición 114
8. PERSPECTIVAS 115
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 116
10. ANEXOS 143



RESUMEN

La subnutrición materna disminuye la producción de espermatozoides de las crías cuando adultas. Sin embargo, los mecanismos intrínsecos que median dichas alteraciones no han sido aún dilucidados. Entre los posibles candidatos a mediar los efectos de la programación fetal se encuentran los factores de transcripción y factores de crecimiento producidos por las células de Sertoli. Por lo tanto, testeamos la hipótesis que la subnutrición materna afecta los factores de transcripción GDNF y ETV5 y de crecimiento IGF-I producidos por las células de Sertoli involucrados en la programación a largo plazo del testículo de las crías adultas. Para ello se analizaron los testículos de ratas adultas cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez y/o lactancia. Se determinó la concentración de hormona FSH e inhibina en el suero. A nivel testicular se cuantificó la expresión de los transcriptos de receptores de IGFR1 y la inmunoexpresión de la proteína IGF-I. Se realizaron análisis morfométricos, diámetro de túbulos seminíferos, número de células de Sertoli y la frecuencia de estadios del ciclo espermatogénico en los túbulos seminíferos. Se analizó la inmunoexpresión de IGF-I y de GDNF y ETV5 en los testículos. Además, se analizaron la inmunoexpresión de proteínas de shock térmico HSP90, HSP70 y el factor de transcripción HSF1, proteínas de proliferación celular Ki-67, las proteínas apoptóticas Bcl-2, caspasa-3 y Bax y su expresión de ARN y la enzima esteroidogénica 3 β-HSD. La subnutrición materna afectó las hormonas séricas FSH, inhibina, así como la expresión ARN de receptores a IGF-I y de caspasa-3 en los testículos. Además, la subnutrición materna disminuyó la frecuencia del estadio VII del ciclo espermatogénico, por ende, la espermatogénesis. Además, la subnutrición materna durante la preñez y lactancia aumentó la inmunoexpresión de IGF-I, GDNF y ETV5 que regulan la auto-renovación de células madre espermatogonia, sugiriendo un mecanismo compensatorio contra el daño por subnutrición. La subnutrición materna disminuyó la inmunoexpresión de HSP90 vinculada a la compactación del ADN en la espermiogénesis y aumentó la proteína Bcl-2 anti-apoptótica. Por lo tanto, la subnutrición materna afectó a largo plazo los factores de transcripción y de crecimiento producidos por las células de Sertoli, así como las proteínas protectoras y apoptóticas, con consecuencias en los estadios del ciclo del epitelio seminífero, por ende, en la espermatogénesis y la fertilidad de la descendencia adulta.

SUMMARY

Maternal undernourishment decreases the sperm production of the offspring when they reach adulthood. However, the intrinsic mechanisms that mediate these alterations have not yet been elucidated. Possible candidates to mediate fetal programming effects include the transcription factors and growth factors generated by the Sertoli cells. Therefore, we tested the hypothesis that maternal undernutrition affects transcription factors GDNF and ETV5, and IGF-I, produced by Sertoli cells involved in long-term program of adult offspring testis. The testicles of adult rats whose mothers were undernourished during pregnancy and /or lactation were analysed. The serum concentration of gonadotropin FSH and inhibin was determined. Growth factor IGF-I immunoexpression and its receptor transcripts in testis was determined. Morphometric analysis of seminiferous tubules diameter and Sertoli cell number, and the frequency of stages of the spermatogenic cycle was performed. Immunoexpression of IGF-I GDNF and ETV5 was evaluated in the testis. In addition, the immunoexpression of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSF1 transcription factor, proliferation marker protein Ki-67, apoptotic proteins and RNA expression of Bcl-2, Bax and caspase-3, and steroidogenesis enzyme 3β-HSD were determined. Maternal undernutrition affects serum hormones FSH, inhibin, as well as the RNA of IGF-I receptor, and caspase-3 in testis. Furthermore, frequency of stage VII of spermatogenic cycle decreases, and hence spermatogenesis. Moreover, maternal undernutrition during pregnancy and lactation increased IGF-I, GDNF and ETV5 immunoexpression that regulate spermatogonia stem cell self-renewal, suggesting a compensatory mechanism against undernutrition damage. Maternal undernutrition decreases HSP90 immunoexpression linked to DNA packaging in spermiogenesis and increases Bcl-2 anti-apoptotic protein. Therefore, maternal undernutrition had long lasting effects on the transcription and growth factors produced by Sertoli cells, as well as on protection and apoptotic proteins, with consequences for stages of spermatogenic cycle, and therefore, for spermatogenesis and fertility of the adult offspring.

1. INTRODUCCIÓN

En producción animal la eficiencia reproductiva está determinada por un lado por las características de la hembra y por otra parte por la capacidad reproductiva del macho. La producción de gametos masculinos determinará junto con factores en la hembra la tasa de preñez como uno de los puntos clave en un sistema productivo.

Asimismo, en los sistemas productivos uno de los principales recursos limitantes es la nutrición, dado que hay constantes presiones económica para reducir los costos y asegurar un mayor beneficio para el productor. La subnutrición materna en los sistemas productivos podría tener consecuencias en el feto que serán evidentes posteriormente al nacimiento o incluso después de la madurez sexual durante en la vida adulta.

Estos acontecimientos que se producen en períodos del desarrollo fetal que generan cambios o alteraciones postnatales se conocen como "programación fetal". Estudios epidemiológicos en medicina humana sobre los orígenes durante el desarrollo de enfermedades que se manifiestan a lo largo de la vida adulta se conocen como la teoría o hipótesis de Barker (Barker 2007, Jazwiec & Sloboda 2019). Dicha teoría se basa en que el impacto de un factor durante momentos clave del desarrollo determina cambios persistentes a largo plazo en órganos y sistemas (Wadhwa et al. 2009).

Como mencionamos, dentro de los factores la subnutrición altera el ambiente uterino y determina cambios permanentes a lo largo de la vida adulta (George et al. 2012). La subnutrición materna produce una restricción del crecimiento fetal y bajo peso al nacer en humanos (De Boo & Harding 2006). Asimismo, se ha determinado que un bajo peso al nacer a su vez predispone a la aparición de enfermedades metabólicas como la hiperinsulinemia, enfermedades cardiovasculares como la hipertensión y dará origen patologías reproductivas en la vida adulta (Gallo et al. 2012).

A nivel reproductivo, la subnutrición materna reduce el número de espermatozoides y reduce el volumen testicular en la progenie, lo que conduce a infertilidad en los individuos adultos (Rodríguez-González et al. 2014).

Sin embargo, los mecanismos subyacentes involucrados en la programación fetal no han sido aún dilucidados. Por lo tanto, el presente estudio buscó determinar los factores testiculares implicados en los mecanismos de programación fetal y postnatal por subnutrición.

GDNF Y ETV5

Entre los posibles factores candidatos a mediar los efectos de programación fetal a nivel reproductivo encontramos a los factores de transcripción y factores de crecimiento producidos por las células de Sertoli que promueven la proliferación y la diferenciación de espermatogonias. Los factores de transcripción GDNF y ETV5 se expresan en el testículo, producidos por las células de Sertoli y peritubulares (Singh et al., 2017). Ambos factores de trascripción poseen un rol autocrino y paracrino estimulando su propia proliferación durante el periodo postnatal, así como también tienen un papel crucial en la renovación de las células germinales y la diferenciación de espermatogonias en espermatocitos (Eo et al. 2012).

IGF-I

Asimismo, el factor de crecimiento similar a insulina IGF-I, también producido por las células de Sertoli, es conocido por su importante rol en la proliferación de espermatogonias y por promover la espermatogénesis y además de poseer un rol autocrino estimulando la proliferación de células de Sertoli y la diferenciación de espermatogonias en espermatocitos (Pitetti et al. 2013b, Griffeth et al. 2014, Cannarella et al. 2018)

Por lo tanto, analizamos en la presente tesis los efectos de la subnutrición materna durante los períodos de preñez y/o lactancia sobre la inmunoexpresión de factores de transcripción, factores de crecimiento, reguladores de la proliferación celular y por ende en la espermatogénesis en testículos de sus crías en la vida adulta.

2. ANTECEDENTES

2.1.Importancia de la espermatogénesis en producción animal

A nivel productivo, la reproducción y la fertilidad exitosas son fundamentales para el éxito en producción animal en establecimientos dedicados tanto a la cría de ganado vacuno u ovino, como en otras especies productivas. Por lo tanto, en machos reproductores adultos la función primordial de los testículos es la producción de hormonas y la producción de gametos masculinos. En dichos sistemas productivos se espera que un reproductor produzca continuamente nuevos espermatozoides después de la pubertad.

En animales machos adultos la función primordial de los testículos es la producción de hormonas y la producción de gametos espermatozoides. Uno de los factores que determina la producción espermática es la célula sustentacular del epitelio seminífero o también llamada célula de Sertoli. Estas células son determinantes principales de la producción de espermatozoides. El tamaño de los testículos en la edad adulta está correlacionado con la proliferación de dichas células de Sertoli durante los períodos fetal, neonatal y peripuberal (Sharpe et al. 2003).

El desarrollo del eje reproductivo y sus sistemas de control son potencialmente susceptibles a estímulos de programación ambiental (Sinclair et al 2016). El sistema reproductivo de un animal puede verse afectado por factores ambientales como las señales socio-sexuales, el fotoperíodo y la nutrición, con el genotipo controlando el resultado final guan (Guan et al. 2014). Por lo tanto, en el desarrollo del testículo pre y postnatal, las células de Sertoli son potencialmente una de las candidatas a ser susceptibles a la subnutrición, como uno de los factores de programación mencionados anteriormente y afectar a largo plazo la espermatogénesis en los testículos de animales adultos.

A continuación, describiremos a modo de recordatorio la estructura anatómica e histológica de los componentes celulares del testículo, así como los procesos que allí ocurren como base para la comprensión del abordaje morfológico, de la presente tesis.

El abordaje de la presente tesis se basa en enfoques morfológicos, histológico y moleculares de la espermatogénesis en ratas como modelo experimental para dar luz a

algunos de los mecanismos que median los efectos de la subnutrición materna en el testículo y especialmente en las moléculas producidas por las células de Sertoli.

2.2. Estructura anatómica de envolturas testiculares y testículo adulto en mamíferos

El sistema reproductor masculino está formado por el conjunto de gónadas masculinas o testículos, vías genitales y órgano copulador. Los testículos están encargados de la formación de los gametos masculinos (espermatozoides) así como de la síntesis de diversas hormonas, andrógenos, factor de crecimiento similar a insulina, inhibina, etc. Las vías genitales masculinas y sus glándulas anexas están encargadas del almacenamiento y transporte del esperma. La elaboración de los gametos masculinos o espermatozoides, denominada espermatogénesis, está asegurada por los testículos, y la producción de testosterona o su forma más potente dihidrotestosterona. Luego los espermatozoides son almacenados en el epidídimo y viajan por las vías genitales masculinas, completando su las glándulas anexas al tracto genital masculino que proveen de nutrientes para los espermatozoides y forman parte de los componentes del plasma seminal que forma el eyaculado (Barone 2001).

Las gónadas masculinas o testículos son órganos pares ubicados en los mamíferos exórquidos junto con el epidídimo en la túnica vaginal y el escroto, en la bolsa escrotal. En algunos de los mamíferos exórquidos los testículos son pendulantes. En otros mamíferos denominados enórquidos los testículos se mantienen en cavidad abdominal como en el carpincho. En algunos mamíferos del clado Glires (incluyen al orden Rodentia y Lagomorfos) el espacio inguinal es grande y permite que reintegren los testículos a una posición abdominal (Barone 2001, Setchell & Breed 2006).

Envolturas del testículo: bolsa escrotal

Las envolturas testiculares protegen tanto el testículo como el epidídimo y conducto deferente, así como los vasos sanguíneos que los irrigan (Figura 1).

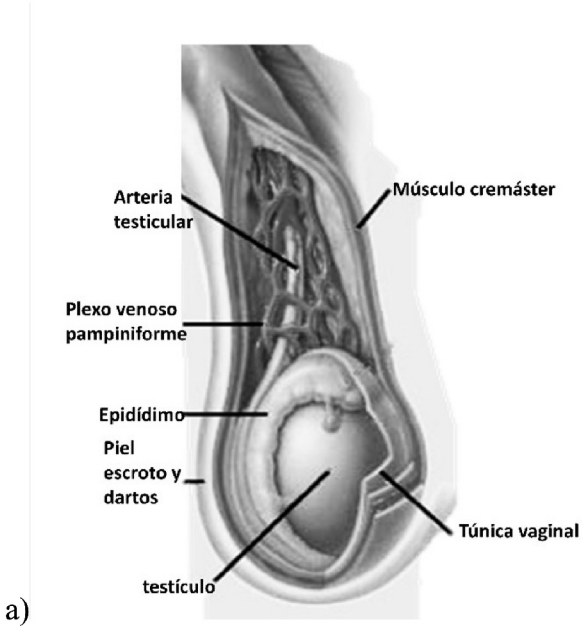
1- **Escroto**: El escroto constituye el conjunto de envolturas superficiales del testículo formado por el revestimiento cutáneo y la túnica dartos. Por lo tanto, el escroto está constituido por piel, epidermis y dermis, y por debajo se localiza el músculo liso de la denominada túnica dartos. Luego más profundamente hay una capa de tejido conjuntivo laxo que la separa de la fascia espermática externa.

2- **Fascia espermática**: La fascia espermática externa se localiza más profundamente, siendo esta una capa que contiene 2 capas de tejido conjuntivo fibroso, separadas por una capa de tejido conjuntivo laxo, que permite el deslizamiento de una sobre otra. Esta fascia externa separa el escroto de las envolturas profundas (músculo cremáster y fascia espermática interna).

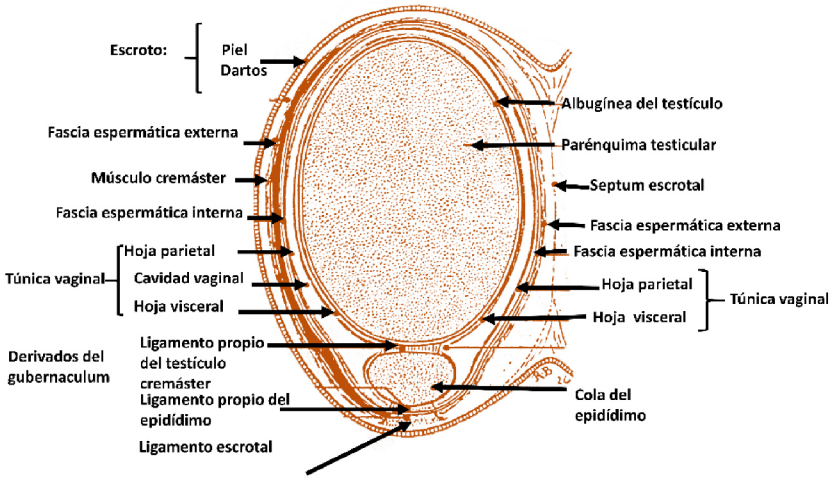
3- **Músculo cremáster**: El músculo cremáster está formado por fibras musculares estriadas que pueden formar una capa completa o ser un incompleta localizada dorso-lateralmente. En los glires el músculo el cremáster forma una capa completa alrededor de la fascia espermática interna, en el resto de los mamíferos exórquidos es incompleta. Durante la castración es la capa que ofrece más resistencia en grandes animales.

4- **Fascia espermática interna**: La fascia espermática interna está asociada a la hoja parietal de la túnica vaginal, de tal manera que no puede separarse (Figura 1).

5- **Túnica vaginal**: La túnica vaginal deriva del proceso vaginal del peritoneo, y constituye la serosa del testículo y del cordón espermático. La túnica vaginal está formada por 2 hojas que delimitan una cavidad vaginal, una hoja parietal y otra visceral. La hoja parietal se une a la fascia espermática interna, de la cual no se puede separar. La hoja visceral reviste el testículo, epidídimo y los elementos del cordón espermático está formada por un mesotelio. La hoja visceral de la túnica vaginal está firmemente adherida a la túnica albugínea del testículo.



a)



b)

Figura 1. Esquema de envolturas testiculares. a) detalle de arteria testicular y sistema de plexo venoso (plexo pampiniforme) alrededor de la arteria testicular que asegura un enfriamiento de la sangre arterial que ingresa al testículo. b) envolturas de la bolsa escrotal que contiene al testículo. Pedrana, G; adaptado de Barone, 2001.

2.2.Estructura del testículo

2.2.1. Cápsula testicular: Túnica albugínea y estrato vascular

El testículo está formado por un estroma constituido por una cápsula fibrosa denominada túnica albugínea, que está en contacto con la serosa de peritoneo visceral, la túnica vaginal interna derivada del peritoneo.

La albugínea presenta tejido conjuntivo denso irregular, con presencia de fibras colágenas y elásticas. En algunas especies como equinos, se presentan fibras musculares lisas. La albugínea presenta irrigación con abundantes vasos sanguíneos, por lo que se ha denominado a esta zona vascularizada como un estrato vascular, con abundantes vasos sanguíneos e inervada por fibras adrenérgicas y algunas colinérgicas que es superficial en el perro y carnero y profunda en caballo y verraco. En la profundidad de la túnica albugínea se desprenden septos, *septula testis* o tabiques testiculares que parten desde la túnica albugínea y dividen al parénquima en lobulillos. Algunas especies presentan tabiques completos como son el perro y el verraco, mientras que en otros animales domésticos son finos tabiques con tejido conjuntivo que dividen al parénquima en lobulillos (Barone 2001). Estos tabiques se comunican con el mediastino testicular, donde se localiza un área de tejido conjuntivo con los conductos que forman la rete testis y vasos sanguíneos y linfáticos. En especies como la rata no se presentan septos al igual que en especies de pequeña talla (Dadoune 2007).

2.2.2. Mediastino testicular

El mediastino testicular es un área de tejido conjuntivo relativamente pequeña que contiene conductos de la *rete testis*, vasos sanguíneos y linfáticos La *rete testis* está formada por una red anastomosada de túbulos. Estos se continúan con los conductillos eferentes que salen del testículo para formar parte de la cabeza del epidídimo y desembocar en el conducto epididimario (Figura 2). En roedores, en equinos y felinos el mediastino tiene una posición marginal o periférica (Rouiller-Fabre et al. 2003), mientras que en los rumiantes, caninos y suinos ocupa una posición central a lo largo del eje longitudinal del testículo (Eurell & Frappier 2006).

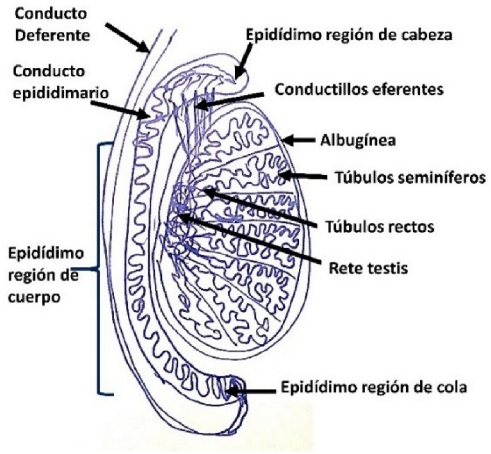


Figura 2. Esquema representativo de testículo y epidídimo en rata en corte sagital. Se observa el parénquima subdividido en lobulillos conteniendo túbulos seminíferos contorneados que desembocan en la *rete testis* a través de túbulos rectos. Luego de la red de túbulos anastomosados de la *rete testis* se continúa con las vías excretoras testiculares en los denominados conductillos eferentes, que atraviesan la albugínea y salen para formar parte de la cabeza del epidídimo, desembocando en el conducto epididimario dentro del epidídimo. El epidídimo se subdivide anatómicamente en regiones de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, y dentro del mismo el conducto epididimario se encuentra contorneado y flexuoso, desembocando luego en el conducto deferente. Elaborado por Pedrana, G.

2.3. Estructura histológica del parénquima testicular

El parénquima testicular se subdivide en lobulillos o *Lobuli testis* y cada uno está compuesto por túbulos seminíferos (Figura 2). Se pueden encontrar un número entre 200 a 300 lobulillos testiculares variando según las especies (Barone 2001). Los túbulos seminíferos contienen una parte contorneada, que es la más larga en la que se producen los espermatozoides y una parte recta que se une a la *rete testis* y conforma junto a ella la porción inicial de las vías excretoras del esperma. Cada uno de los túbulos seminíferos presenta una longitud considerable, se pliegan y contornean observándose cortes transversales redondeados con una luz central (Figura 3).

2.3.1. Intersticio testicular

Entre los túbulos seminíferos contorneados se encuentra el estroma de tejido conjuntivo o intersticio testicular. El tejido glandular intersticial, está formado por células de Leydig o células intersticiales productoras de hormonas esteroideas, andrógenos, como ser la testosterona y la dihidrotestosterona. Además, en el intersticio testicular se localizan células del tejido conjuntivo laxo, como fibroblastos, mastocitos, macrófagos, etc., así como vasos sanguíneos y linfáticos (Gartner 2021).

2.3.1.1. Células de Leydig

La población de células madre de Leydig prolifera en la vida fetal a través de dos etapas para dar lugar a una célula de Leydig diferenciada terminalmente en la vida adulta. Podemos encontrar una población de células de Leydig fetales y una población inmadura adulta y otra madura adulta. La morfología redondeada es característica de las células de Leydig adultas (Payne & Hardy 2007). Los niveles de actividad enzimática metabolizadoras de andrógenos a través de las enzimas 3B-hidroxiesteroide deshidrogenasa dan la pauta del inicio de la actividad esteroidogénica. En la rata al día 28 post parto las células de Leydig progenitoras se transforman de forma de huso a células redondas y pasan de ser las células de Leydig inmaduras, y luego las células de Leydig adultas adquieren numerosas inclusiones lipídicas, que adoptarán luego un mayor desarrollo de los organelos como el retículo endoplásmico hacia el día 43 a 56 (Chen et al. 2009). Desde el día 28 al 56 postparto, las células de Leydig son inmaduras, en contraste con las células de Leydig adultas, que poseen gotas lipídicas. La población fetal de Leydig es reemplazada alrededor de la pubertad (día 43) por una segunda camada de células de Leydig, que conforman la población adulta (Tapanainen et al. 1984).

2.3.1.2. Esteroidogénesis: síntesis de hormonas lipídicas andrógenos

La testosterona se produce en las células testiculares de Leydig y desempeña un papel importante en la reproducción, el desarrollo y la función sexuales. La deficiencia de testosterona da como resultado un trastorno de los caracteres sexuales secundarios o infertilidad masculina. La esteroidogénesis es un proceso complejo de enzimas esteroideas donde el colesterol se convierte en diferentes hormonas esteroideas. La síntesis de testosterona se inicia mediante el transporte de colesterol a la mitocondria a través de la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR). La enzima CYP11A1 convierte el colesterol en pregnenolona en las mitocondrias. La pregnenolona luego se desplaza desde la mitocondria hacia el retículo endoplásmico liso y es convertida en testosterona por varias enzimas esteroidogénicas, incluyendo 3β-HSD, CYP17A1 y 17b-HSD (Majdic et al. 1998).

El estrés por calor testicular afecta estos procesos de síntesis de esteroides y altera la esteroidogénesis testicular en las células de Leydig. Las células germinales tienen una

alta actividad mitótica y son susceptibles al estrés por calor; por lo tanto, el estrés por calor testicular asociado con criptorquidia o varicocele está involucrado en la insuficiencia espermatogénica y la infertilidad masculina (Ogi et al.).

Durante la vida fetal la población de células madre de Leydig prolifera para dar lugar a células progenitoras fusiformes de Leydig, que comienzan a producir algunas enzimas asociadas con la esteroidogénesis, como la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) codificada por el gen *Hsd3* (Orth & Weisz 1980, Majdic et al. 1998). Durante la vida fetal temprana entre los 12 a 15 días de gestación en ratas comienza a detectarse la enzima 3β-HSD (Mendis-Handagama et al. 1998, Mendis-Handagama & Ariyaratne 2001) con un punto de producción de testosterona a los 18 días de gestación (Majdic et al. 1998).

Las células de Leydig regulan positivamente la expresión de genes esteroidogénicos como *Hsd3b* y *Cyp11.* La mayoría de los pasos en la esteroidogénesis en las células de Leydig son transformaciones irreversibles, incluidas las oxigenaciones catalizadas por la enzima citocromo P450, por la enzima 3β-HSD / Δ5 → Δ4-isomerasa (3β-HSD), y por las enzimas 5α- y 5β-reductasa (Kerr et al. 2006) .

La producción de testosterona por las células de Leydig requiere expresión y función coordinadas de varios factores de transcripción y enzimas esteroidogénicas. Muchos de estos factores están bajo el control de LH (hormona luteinizante), denominada así por su acción en el ovario para la producción de progesterona por el cuerpo lúteo. la LH ejerce sus efectos sobre la espermatogénesis principalmente mediante la estimulación de la secreción del andrógeno testosterona, producido por las células de Leydig. Los andrógenos producidos por ellas actúan como factores testiculares paracrinos en las células que presentan receptores a andrógeno que son tanto las células de Sertoli, Leydig y células peritubulares, pero no se expresan en células germinales, por lo que la mediación de la señal de testosterona en las células germinales es a través de ellas (O'Shaughnessy 2015).

2.3.2. Tejido peritubular

El tejido peritubular es un tejido conjuntivo constituido por múltiples capas que rodea a los túbulos seminíferos. Presenta con fibras colágenas y células que rodean al túbulo seminífero peritubulares denominadas células **mioides** con capacidad contráctil (Pawlina 2016, Gartner 2021).

Las funciones de las células mioides incluyen favorecer el transporte de espermatozoides y líquido testicular a través de los túbulos seminífero por su contracción. En roedores, otra función reconocida de las células peritubulares mioides es la contribución a la barrera hemato-testicular, demostrado a través de estudios donde el pasaje de sustancias desde el intersticio hacia los túbulos se bloquea en la capa de células mioides peritubulares y no penetran en las células de Sertoli (O'Shaughnessy 2015).

Asimismo, las células mioides participan mediando el control androgénico de la espermatogénesis al interactuar con las células de Sertoli y sintetizar componentes de la matriz extracelular que constituye la lámina basal que rodea a los túbulos seminíferos. Las células mioides sintetizan fibronectina, colágenos I y IV y glucosaminoglicanos (Richardson et al. 1995) así como factores de transcripción que promueven la renovación de células germinales (Chen et al. 2016).

Las células mioides peritubulares se encuentran en roedores entre dos capas de lámina basal, hacia un lado con las células de Sertoli en el túbulo seminífero y por otro lado en contacto con el intersticio, y las células endoteliales de capilares sanguíneos y linfáticos. Hacia el día 18 postparto las células mioides comienzas a aumentar y continúan su aumento hasta el día 30 en respuesta a la expansión de los túbulos seminíferos a medida que se desarrolla la espermatogénesis (O'Shaughnessy 2015).

2.3.3. Túbulos seminíferos

Los túbulos seminíferos poseen una parte contorneada, la más importante y larga, donde son producidos los espermatozoides, y una parte recta y corta que se une a la rete testis y forma con ella la parte inicial de las vías excretoras de los espermatozoides. Cada túbulo seminífero contorneado está muy plegado sobre sí mismo, de forma tal que su longitud es considerable. Los túbulos seminíferos contorneados comienzan

cerca de la albugínea por una extremidad ciega o anastomosados con otro túbulo vecino (Barone 2001). Los espermatozoides pasan luego por los conductillos eferentes y entran al epidídimo donde maduran y desarrollan motilidad para posteriormente capacitarse y fecundar en el tracto genital femenino.

Los túbulos seminíferos presentan un diámetro de 260 micrómetros en ratas macho adultas a los 90 días, aumentando a los 360 a una media de 280 micrómetros (Figura 3). Poseen un epitelio estratificado que está compuesto por dos poblaciones de células, las células de Sertoli y las células germinales (Wing & Christensen 1982, Gaytan et al. 1986).

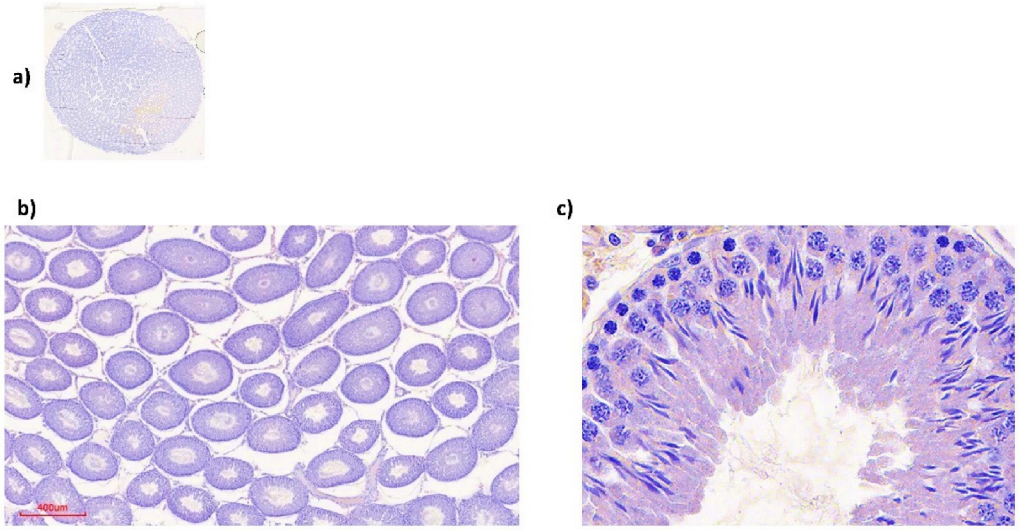


Figura 3. Imágenes histológicas de testículo de rata adulta con hematoxilina-eosina. a) imagen a simple vista de preparado histológico de testículo, b) imagen a menor aumento evidenciando el parénquima testicular donde se observan cortes transversales de túbulos seminíferos y entre ellos el intersticio testicular. c) corte transversal de medio túbulo seminífero, donde se observa el epitelio seminífero en estadio XII, del ciclo del epitelio seminífero Fotos capturadas con escáner de láminas Moticam Scanner, por Graciela Pedrana, año 2020 en Facultad de Odontología, por gentileza de Ronell Bologna y Vanessa Pereira Unidad de Anatomía Patológica,

2.3.3.1. Epitelio seminífero

El epitelio seminífero está formado por dos tipos celulares, las células somáticas o células de Sertoli y las células germinales. La célula somática denominada célula de Sertoli o sustentacular del epitelio seminífero fue descrita hace más de 150 años por Von Ebner y luego por Enrico Sertoli (Leblond & Clermont 1952, Amann 1962). El resto de las células de los túbulos son células germinales en distintas etapas de desarrollo que llevan a la producción de espermatozoides o gametos masculinos (Figura 4).

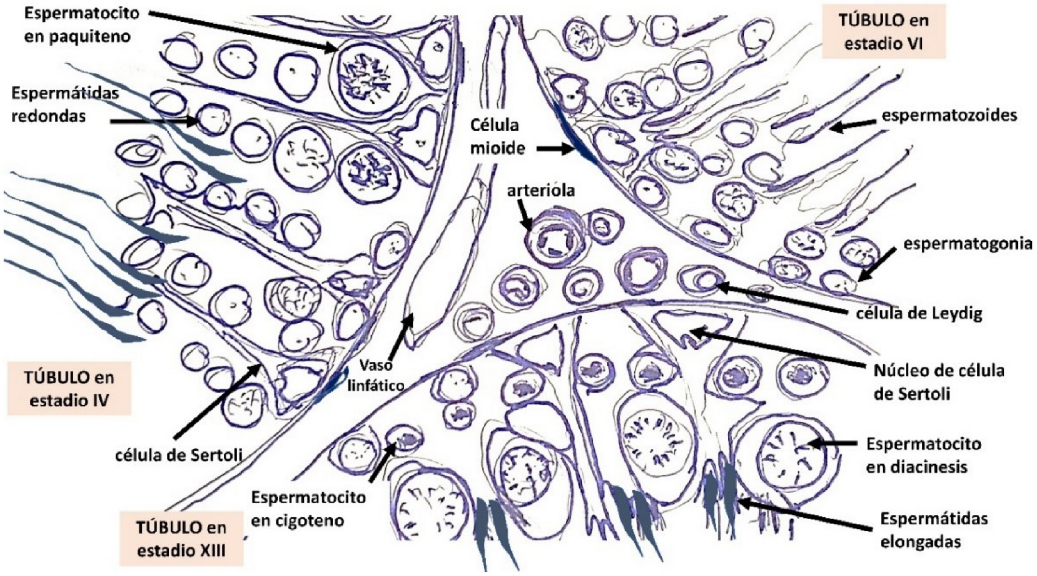


Figura 4. Esquema representativo de sector de parénquima de testículo. Se esquematizan 3 túbulos seminíferos y entre ellos, en el centro del esquema el intersticio testicular. El intersticio testicular contiene vasos sanguíneos y linfáticos, así como células de tejido conjuntivo laxo, macrófagos, y células intersticiales o células de Leydig productoras de hormona testosterona. En los túbulos seminíferos se encuentran desde la lámina basal del túbulo seminífero las células sustentaculares o de Sertoli y las células de la línea germinal. Se detallan 3 túbulos en distintos estadios del ciclo espermatogénico. Elaborado por Pedrana, G.

2.3.3.2.Células de Sertoli

La población de células somáticas corresponde a la población de células de Sertoli o sustentaculares del epitelio seminífero. Las células de Sertoli son células epiteliales columnares polarizadas que proporcionan nutrientes a las células germinales y median señales externas con el fin de apoyar la diferenciación de las células germinales y la espermatogénesis (Griswold y Oatley 2013). El desarrollo adecuado de las células de Sertoli es crucial para que se desarrolle el potencial reproductivo de un individuo (Hochereau-de Reviers *et al.* 1995b; Sharpe *et al.* 2003a; Guan and Martin 2017). Se considera que el número de células de Sertoli está vinculada a la producción de gametos masculinos siendo éstas las encargadas de proveer de sustento nutricional y metabólico, incluyendo la producción de factores de crecimiento esenciales para el desarrollo de la espermatogénesis (Sharpe et al. 2003, O'Shaughnessy & Fowler 2011, de Rooij 2015).

2.3.3.2.1. Número de células de Sertoli y actividad proliferativa

Cada célula de Sertoli puede encargarse de mantener a un determinado número de células germinales (Hochereau-de Reviers et al. 1987, 1995). Por lo tanto, es esencial conocer los momentos donde se desarrolla la actividad proliferativa de dicha célula sustentacular del epitelio seminífero.

En la rata la capacidad proliferativa de Sertoli se extiende durante:

1) La vida fetal desde el día 13 post concepción (Angelopoulou et al. 2008), con su período de actividad mitótica más intenso poco antes del nacimiento, hacia el día 20 de la gestación.
2) La vida postnatal: pico a los 7 días postparto En el período postparto, estudios con marcadores de proliferación celular como PCNA y Ki-67 mostraron actividad mitótica de Sertoli a la semana de nacidos (Angelopoulou et al. 2008)
3) La vida postnatal: continúan proliferando hasta unas 3 semanas después del nacimiento (Orth 1982, Russell & Peterson 1984, Zhengwei et al. 1990, Boulogne et al. 1999) y postnatal temprana (Orth 1982, Sharpe et al. 2003) hasta los 15 a 20 días de edad (Steinberger & Steinberger 1971, Wang et al. 1989, Angelopoulou et al. 2008).

Este ha sido uno de los dogmas de la biología, en que la capacidad proliferativa de Sertoli llega hasta la pubertad.

Sin embargo, estudios recientes en vivo han demostrado el reinicio de la actividad proliferativa de la célula de Sertoli durante la vida adulta en la región de transición entre los túbulos seminíferos y los túbulos rectos de la *rete testis* (Figueiredo et al. 2016). Asimismo, estudios en cultivos celulares de ratón también demostraron capacidad proliferativa de las células de Sertoli obtenidas de túbulos seminíferos, en mayor medida en la zona de transición o túbulos rectos que desembocan en la *rete testis* (Kulibin & Malolina 2016, Malolina & Kulibin 2017).

También, en condiciones patológicas como en el hipotiroidismo se observa reinicio de la actividad proliferativa en células de Sertoli (Alves Auharek & de França 2010). Además, las células de Sertoli no se diferencian de forma terminal en algunos fenotipos de infertilidad y cáncer testicular, sino que retoman la actividad mitótica en

condiciones de tratamiento hormonal de inhibición de las gonadotrofinas en hombres (Tarulli et al. 2013).

Por lo tanto, teniendo en cuenta que la proliferación de células de Sertoli ocurre durante la etapa prenatal y postnatal temprana, y con posibilidad en adultos de producirse cambios en la proliferación de dichas células, los eventos que ocurran durante dichos períodos podrían alterar su proliferación y determinar cambios permanentes en la performance reproductiva de un individuo en su vida adulta.

2.3.3.2.2. Estructura de la célula de Sertoli

Las células de Sertoli en un testículo adulto presentan una forma alargada y con numerosas proyecciones alrededor de las células germinales que se extienden desde la lámina basal hacia la luz de los túbulos seminíferos y que determinan que su citoplasma sea irregular (Figura 5). Las células de Sertoli confieren de soporte físico, estructural y nutricional, mediante funciones metabólicas y secretoras y dirigen su maduración durante el ciclo espermatogénico. Su morfología varía de acuerdo con los estadios del ciclo del epitelio seminífero, y ocupa en los estadios VI al VIII un volumen menor y aumenta el volumen ocupado por Sertoli en los estadios XII a XIV (Kerr 1988a, b, Kerr et al. 2006).

La célula de Sertoli diferenciada en la vida adulta es una célula que presenta un núcleo con escotadura y nucléolo evidente. En el animal adulto el núcleo de la célula de Sertoli está ubicado cercano a la región basal, siendo grande e irregular y su forma varía desde un perfil triangular hasta oval, presentando un profundo repliegue o escotadura. Puede observarse la presencia de uno o dos nucléolos. La posición del núcleo varía de acuerdo con el estadio del ciclo espermatogénico (Figura 5).

La mencionada célula sustentacular del epitelio presenta un retículo endoplásmico liso y escaso retículo rugoso, numerosas mitocondrias y un complejo de Golgi desarrollado. Entre células de Sertoli contiguas se establecen uniones ocluyentes que subdividen a los túbulos en compartimentos aislados de forma concéntrica.

2.3.3.2.3. Compartimentos del epitelio seminífero y barrera hemato-testicular

Las células de Sertoli determinan compartimentos celulares en el túbulo, un compartimento basal, otro intermedio y otro ad-luminal en contacto con la luz del túbulo seminífero (Kerr et al. 2006, Pawlina 2016).

El compartimento basal localizado en la región basal del túbulo separa y forma una barrera hemato-testicular que aísla antigénicamente a las células germinales que inician la meiosis del tejido conjuntivo, ya que células conjuntivas que forman parte del sistema inmune podrían considerarlas extrañas y atacarlas. En dicho compartimento basal, cercano a la lámina basal del túbulo seminífero se encuentran las espermatogonias (Pawlina 2016).

En la rata en el compartimento intermedio o segundo nivel se localizan los espermatocitos pre-leptoténicos. Este compartimento es de tránsito de células germinales tiene uniones más permeables hacia el compartimiento basal y es más impermeable hacia el siguiente, el compartimento ad-luminal (Kerr et al. 2006).

Por último, en el compartimento ad-luminal o tercer nivel cerca del lumen del túbulo seminífero se encuentran localizadas las espermátidas y los espermatozoides. De esta manera, la célula de Sertoli mantiene las asociaciones celulares en todo el proceso de la espermatogénesis y aisladas antigénicamente a las células en proceso de meiosis (Hess and Renato de Franca, 2008; Meistrich and Hess, 2013).

2.3.3.2.4. Uniones estrechas entre Sertoli y la barrera hemato-testicular

Las uniones estrechas entre las células de Sertoli adyacentes constituyen la barrera hemato-testicular y desempeñan un papel importante en la regulación de la diferenciación de células germinales (Hess y Renato De Franca 2008). La barrera hemato-testicular mantiene un flujo selectivo de sustancias entre el fluido luminal, el plasma sanguíneo y el líquido intersticial, creando un entorno inmune privilegiado para las células germinales haploides en el compartimiento de adluminal de los túbulos seminíferos. A lo largo de los túbulos, las células madre espermatogonias o spermatogonial stem cells (SSC) y las espermatogonias indiferenciadas se observan principalmente en las zonas adyacentes a la vasculatura intersticial (Sugimoto et al. 2011).

2.3.3.2.5. Diferenciación de células de Sertoli

Los cambios asociados con la diferenciación terminal de las células de Sertoli en la pubertad incluyen la salida del ciclo celular, finalización de la actividad proliferativa, deteniendo las mitosis y la formación de la barrera hemato-testicular. En condiciones patológicas la pérdida de las proteínas asociadas a las uniones intercelulares de las células de Sertoli como la claudina 11 hacen que se vea afectado el fenotipo de la célula (Mazaud-Guittot et al. 2010, Kaur et al. 2014). Las células de Sertoli necesitan contar con un fenotipo diferenciado para generar un microambiente adecuado y ser el apoyo citoarquitectónico de las células espermatogénicas en desarrollo. La diferenciación de células de Sertoli se acompaña de la expresión de muchos productos génicos que no están presentes en células inmaduras (Chaudhary et al. 2005). Sin

embargo, la diferenciación terminal de Sertoli se ha visto modificada en trasplantes celulares, donde se observó el reinicio de la proliferación de Sertoli en células en cultivo y en trasplante celular (Mital et al. 2014).

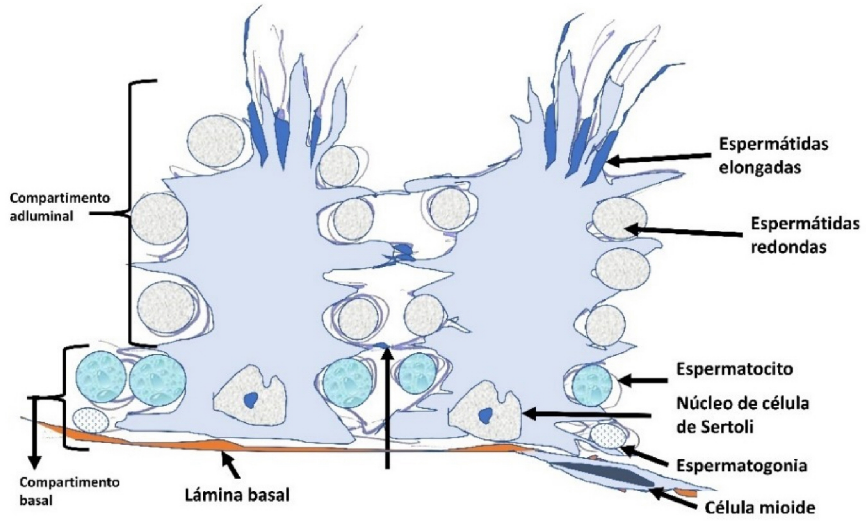


Figura 5. Esquema representativo de las células de Sertoli adultas. Las ramificaciones citoplasmáticas de Sertoli rodean a las células germinales. En la región adluminal se observan espermátidas alargadas o elongadas, luego se observan las espermátidas redondas, en el compartimento intermedio se localizan espermatocitos y en el compartimiento basal se observan espermatogonias. Elaborado por G. Pedrana.

2.3.3.3. Células germinales

Durante la vida fetal las células germinales primordiales germinales (PGC) derivan de las células del epiblasto y migran a los 7 días post concepción en el embrión de roedores y migran por alantoides e intestino posterior hacia la cresta urogenital (Lawson et al. 1991). El epitelio de la cresta genital es derivado de epitelio celómico. Las gónadas indiferenciadas se desarrollan a partir de la cresta urogenital, un engrosamiento del mesodermo en la pared dorsal del celoma embrionario que contribuye a formar la corteza adrenal y las gónadas. A partir de la cara medial del mesonefros, la gónada pasa por un estado indiferenciado hasta que se diferencia a gónada masculina (testículo) alrededor del día 13 post concepción en la rata.

Las células germinales primordiales se originan a partir de la pared del saco vitelino, que luego migran al mesonefros y ocupan posición central en cordones sexuales macizos. El epitelio de revestimiento celómico envía células mesenquimales que invaden la gónada en formación y dan origen a células de Sertoli que bordean los cordones sexuales. Estas a su vez son rodeadas por una capa de células peritubulares mioides (Courot 1962, Hochereau-de Reviers & Courot 1971, Magre & Jost 1991,

Hochereau-de Reviers et al. 1995). Tanto el testículo fetal como el neonatal presentan un parénquima testicular constituido por cordones sexuales o cordones testiculares macizos (Figura 6) y convergen en un área que luego formará la *rete testis* (Mackay, 2000).

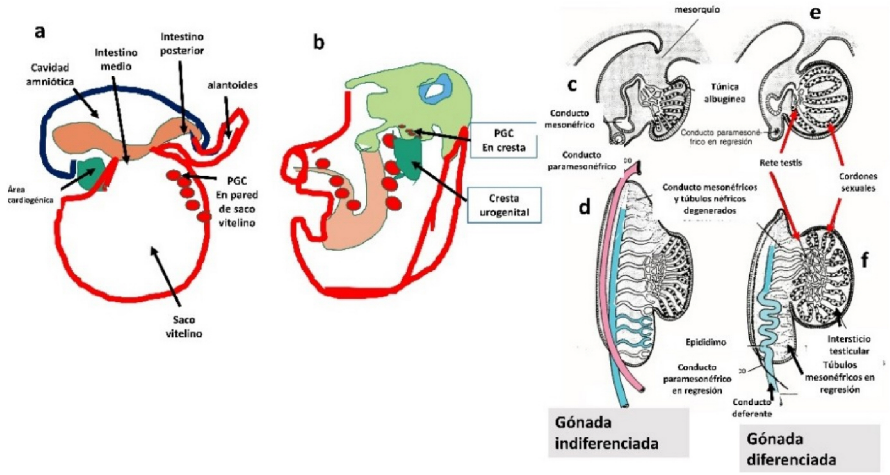


Figura 6. Desarrollo embrionario del testículo. a) Desarrollo de células germinales primordiales a partir de pared de saco vitelino. b) Migración a cresta genital por alantoides e intestino posterior hasta cresta urogenital. c) y d) Cortes transversal y longitudinal respectivamente de gónada durante etapa indiferenciada, e) y f) Etapa de desarrollo de gónada diferenciada, dando origen al testículo, con la regresión de conductos paramesonéfricos. Pedrana adaptado a partir de Sadler (Sadler 2019).

De gonocitos a espermatogonias

Las células germinales durante la etapa fetal y postnatal temprana son llamadas gonocitos, reanudan la mitosis y migran desde su ubicación central en los cordones sexuales macizos para contactar con la membrana basal en la periferia del cordón sexual a los 2 a 5 días después del nacimiento (Kluin et al. 1984, Phillips et al. 2010). Cuando los gonocitos alcanzan esta posición periférica en los cordones sexuales las células germinales son denominadas espermatogonias y forman la población de células madre residentes que se divide por mitosis (ver Figuras 10 y 11). Unas de las células madre espermatogonia se diferencian para ingresar al proceso de meiosis y posteriormente a la espermiogénesis formando los espermatozoides (Mackay 2000).

2.4. Espermatogénesis en mamíferos

La espermatogénesis es un proceso complejo y altamente ordenado que tiene lugar en lo túbulos seminíferos en el testículo (Lagos-Cabré y Moreno 2008). Tiene como resultado a partir de células germinales la producción de espermatozoides maduros y comprende una serie de fenómenos diversos. Incluye tres fases (Figura 7): una serie de divisiones mitóticas de células germinales espermatogonias, dos divisiones meióticas de espermatocitos y la diferenciación de las espermátidas haploides en espermatozoides o espermiogénesis (de Rooij y Russell 2000).

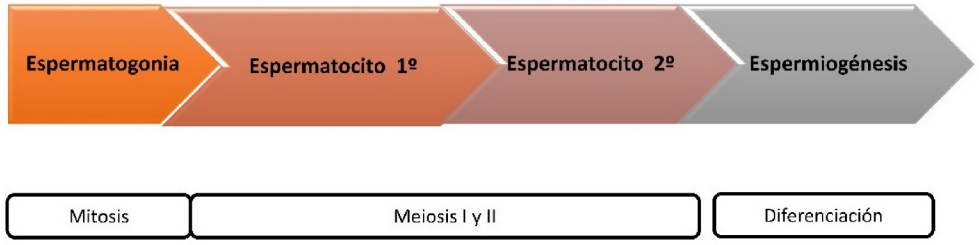


Figura 7. Etapas de la espermatogénesis. Las espermatogonias darán origen a espermatocitos 1 que luego ingresan en la meiosis 1 y luego la meiosis 2, siendo esta última reduccional obtenido un número de células resultantes haploides, las espermátidas, que posteriormente pasan por un proceso de diferenciación celular y se convierten en espermatozoides.

2.4.1. Primera fase: fase proliferativa o mitótica

Las células madre de espermatogonias tipo A residen en la parte basal del epitelio germinal, en contacto con la lámina basal del túbulo seminífero. En esta primera etapa de la fase proliferativa o mitótica, en roedores las espermatogonias denominadas de tipo A, que presentan un núcleo eucromático, comienzan las divisiones mitóticas para dar origen a sucesivas generaciones de espermatogonias tipo A2, A3 y A4.

Posteriormente continúa la diferenciación a las espermatogonias intermedias (In) con aumento de la heterocromatina nuclear y luego a las espermatogonias tipo B (de Rooij & Russell 2000). En promedio, la mitad de la población de las células hijas de tipo A en división mitótica, se diferencia hasta transformarse en células de tipo B y con ello pierden su potencialidad para producir espermatogonias A, mientras que la otra mitad de la población de células hijas no pierde sus características de las progenitoras (Leblond & Clermont 1952, Tancini et al. 2012).

Las células madre SSC forman una pequeña subpoblación de células germinales que se auto- renuevan por medio de proliferación celular por mitosis, para mantener la producción constante de espermatozoides durante toda la vida reproductiva en el macho (Lagos-Cabré y Moreno 2008a). Las SSC residen en el compartimiento basal del epitelio de revestimiento de los túbulos seminíferos y están en estrecha relación con las células de Sertoli que proporcionan factores de crecimiento y diferenciación a las células germinales. Ensayos de trasplante han indicado que todo tipo temprano de espermatogonias denominadas As (Asingle), Ap (Apaired) y Aa (Aaligned) podría tener potencial de células madre (Simon et al. 2010). Las espermatogonias Aa se diferencian a las espermatogonias A1, A3, A3 y A4, espermatogonias de tipo B y luego a espermatocitos pre-leptoténicos que serán ingresados a la meiosis, para ser luego convertidos en espermátidas haploides y en última instancia espermatozoides por espermiogénesis (de Rooij y Russell 2000).

Dentro de cada sección transversal de un túbulo seminífero las células germinales espermatogonias, espermatocitos, y espermátidas, están en íntima asociación física con células somáticas sustentaculares del epitelio seminífero o células de Sertoli. Gracias a ellas las células germinales progresan a través de las distintas etapas del ciclo del epitelio seminífero (de Rooij & Russell, 2000).

2.4.2. Segunda fase: Meiosis

Las células espermatogonias de tipo B se diferencian en espermatocitos primarios o espermatocitos pre-leptoténicos, prontas para entrar en la segunda fase o meiosis, un proceso crucial en la espermatogénesis durante el cual las células germinales diploides se dividen y se diferencian en espermátidas haploides (Jan et al. 2012). Este proceso se lleva a cabo mediante dos divisiones meióticas sucesivas que se denominan primera división meiótica o meiosis I y segunda división meiótica o meiosis II (separación de las cromátidas hermanas en células haploides o meiosis reduccional). La meiosis I involucra procesos complejos que incluyen movimiento de los cromosomas homólogos, cada uno compuesto de un par de cromátidas hermanas, a los polos opuestos de los espermatocitos dando como resultado dos células hijas.

La meiosis se inicia con la profase I, que es una etapa de larga duración y por lo tanto es más fácilmente observable en los túbulos seminíferos. La profase I está caracterizada por el apareamiento e intercambio de los segmentos de los cromosomas homólogos (Hermo et al. 2010).

Profase

La profase I se subdivide en 5 etapas citológicas descritas (Eurell & Frappier 2006, Kerr et al. 2006):

1) **Leptoteno**: en esta etapa los cromosomas se observan como delgados finos y largos filamentos, del griego leptos, cuyo significado es "delgado". Se observa la condensación en finas hebras de cromatina filamentosa unidas a la envoltura nuclear. En esta etapa posterior a la replicación del ADN pre-meiótico los cromosomas son largos. El evento principal durante la etapa de leptoteno implica la aparición de ejes axiales, que son los precursores de los elementos laterales de una estructura proteica denominada complejo sinaptonémico.

2) **Cigoteno o Zigoteno**: en esta etapa se ensambla el complejo sinaptonémico, a lo largo de cada cromosoma homólogo entre cromátides hermanas. Se inicia la unión o apareamiento de los cromosomas homólogos y se observa engrosamiento de cromosomas

3) **Paquiteno**: durante esta etapa se observa acortamiento y engrosamiento de cromosomas, de allí su nombre proviene del griego paqui "grueso" y unión completa de cromosomas pareados. Se caracteriza por crecimiento de núcleo y citoplasma de las células, siendo las más grandes en diámetro de la línea germinal. Además, es una de las más largas en duración siendo de unos 10 días en roedores. En esta etapa los cromosomas están completamente y ocurre el denominado entrecruzamiento o *crossing over*. Al finalizar el paquiteno el elemento central del complejo sinaptonémico comienza a desarmarse y los cromosomas comienzan a repelerse entre sí.

4) **Diploteno**: Durante esta etapa tiene lugar la formación de quiasmas (Jan et al. 2012) y se desprenden los cromosomas de la envoltura nuclear. Diploteno significa "doble", dado que dos homólogos se hacen visibles y permanecen unidos en por los llamados quiasmas.

5) **Diacinesis**: Durante esta etapa se desintegra la envoltura nuclear, dia significa en griego "a través" y cinesis significa "movimiento"o "moverse", indicando la etapa final antes de pasar a la siguiente fase de la meiosis, metafase I. En este punto, los homólogos están conectados sólo por los restos del complejo sinaptonémico que se localiza en los centrómeros.

Posteriormente a la profase I, se continúa con las etapas de:

- Metafase I: donde los cromosomas homólogos se alinean en la placa ecuatorial.
- Anafase I: donde los miembros de cada par migran a polos opuestos de la célula.
- Telofase I: donde las células hijas se separan, aunque permanece un puente citoplasmático entre ellas, originándose los espermatocitos secundarios. Estas células presentan una vida media muy corta debido a lo cual es difícil observarlos (McLachlan et al. 1996).

Como resultado, de cada espermatocito primario diploide se obtienen dos espermatocitos secundarios y de éstos se originan cuatro espermátidas redondas haploides.

2.4.3. Tercera fase: espermiogénesis

Por último, la tercera fase es la denominada espermiogénesis que comprende el proceso de diferenciación celular de las espermátidas redondas e implica una serie de cambios morfológicos hasta llegar a la formación de los espermatozoides. Dichos cambios implican las etapas o fases de Golgi, fase de acrosoma, y fase de maduración (Hafez 2000).

1) **Fase de Golgi**: La fase de Golgi implica el comienzo de la formación del acrosoma, se caracteriza por las enzimas hidrolíticas que se forman en el retículo endoplásmico rugoso y son empaquetadas en el Complejo de Golgi, y comienzan la formación de pequeños gránulos pro-acrosómicos a partir del complejo de Golgi prominente. Luego estos gránulos se acumulan, se fusionan y forma una vesícula acrosómica y gránulo acrosómico, que entra en contacto con la envoltura nuclear, se une a ella y así establece el polo anterior del espermatozoide en desarrollo.

2) **Fase de casquete**: la vesícula acrosómica se extiende hasta la mitad anterior del núcleo a modo de capuchón y se pasa a llamar acrosoma, y contiene enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa entre otras, que le servirá en el inicio de la fecundación para disociar las capas del ovocito. Durante esta etapa comienza a esbozarse, en el lado opuesto a la vesícula acrosómica, la cola del espermatozoide, y los componentes del axonema de la cola se forman a partir de un centríolo distal que comienza la formación del flagelo con una ultraestructura similar a un cilio con 9 pares de microtúbulos periféricos y un par de microtúbulos centrales.

3) **Fase acrosómica:** Durante la fase acrosómica las espermátidas rotan y el acrosoma se orienta hacia la base del túbulo seminífero y el axonema del flagelo se proyecta hacia la luz del túbulo seminífero. Además el núcleo se condensa y se alarga dando origen a las espermátidas elongadas. Las mitocondrias se acumulan alrededor de la porción proximal del flagelo, donde se generan la energía para los movimientos del espermatozoide. En esta etapa se forman las columnas de fibras densas proteicas que luego se rodean de anillos fibrosos que se conocen como hoja fibrosa (Gartner 2021).

4) **Fase de maduración:** Por último, en la fase de maduración, se produce la eliminación del citoplasma de las espermátidas tardías, formándose así los cuerpos residuales que son fagocitados por las células de Sertoli. Finalmente los espermatozoides que se forman son inmóviles y liberados al lumen del túbulo seminífero por el proceso denominado espermiación (Junqueira & Carneiro 2015).

   Los espermatozoides liberados llegan a los túbulos rectos que desembocan en la *rete testis*. Luego prosiguen su camino a través de conductillos eferentes desembocando en el conducto epididimario que forma parte del epidídimo donde completan su maduración. En el epidídimo se almacenan y adquieren movilidad entre otros cambios funcionales y estructurales. Es recién en el aparato reproductor femenino donde se capacitan y son capaces de fecundar (Tadokoro et al. 2002, Lagos-Cabré & Moreno 2008).

2.5. Ciclo espermatogénico o ciclo del epitelio seminífero

Los diferentes tipos de células germinales observables en el epitelio seminífero en los cortes transversales de los túbulos seminíferos forman asociaciones celulares estables que se conocen como estadios del epitelio seminífero (Figura 8). Le Blond y Clermont en 1962 describieron en base a las investigaciones previas de Claudius Regaud en el año 1902 (Del Regato 1976) tomando en cuenta la coloración histoquímica del ácido peryódico de Schiff que marcaba el acrosoma y la morfología del núcleo de las células germinales14 estadios o asociaciones celulares en la rata. Una secuencia completa de 14 estadios constituye un ciclo del epitelio seminífero (Leblond & Clermont 1952, Perey et al. 1961, Phillips et al. 2010).

El ciclo espermatogénico describe el desarrollo periódico de células germinales en los túbulos seminíferos dentro del parénquima del testículo. La dinámica temporal-espacial del ciclo espermatogénico resalta la interacción única, compleja e interdependiente entre las células germinales y células somáticas de Sertoli, que determinan la producción continua de espermatozoides (Hess & de Franca 2009)

La comprensión de la dinámica espacio temporal del ciclo espermatogénico tiene importantes implicaciones en la espermatogénesis. En la rata en cada sección transversal de un túbulo seminífero se pueden identificar en el epitelio seminífero etapas separadas, de acuerdo con las asociaciones celulares observadas, siendo en otras especies como en humanos solo 6 estadios descritos y en área con diferentes estadios en un solo corte transversal de un túbulo seminífero (Gartner 2021).

Las etapas de la espermatogénesis progresan a través de ciclos organizados y cronometrados con alta precisión. Los ciclos de espermatogénesis son esenciales para la producción continua de espermatozoides y dependen de factores tanto intrínsecos de las células de Sertoli y de las células germinales, así como extrínsecos hormonales entre otros. El ciclo espermatogénico o del epitelio seminífero consiste en una serie de etapas o estadios que se constituyen a medida que las células germinales se diferencian y se desplazan progresivamente hacia el lumen del túbulo seminífero, formando asociaciones dinámicas dentro del epitelio seminífero, en cada sección determinada de los túbulos (Cusan et al. 1981). Después de una serie de cambios en la composición celular de cada zona del epitelio seminífero, la composición celular original de cada área reaparece y se inicia de nuevo, dando lugar

a un ciclo del epitelio seminífero (Jan et al. 2012). Estudios previos (Leblond & Clermont 1952) demostraron que hay seis generaciones sucesivas de espermatogonias (A1-A6) y el ciclo empieza con espermatogonias de tipo A si se examinan las asociaciones celulares en todos los segmentos de un túbulo seminífero, y una progresión ordenada desde un estadio del ciclo hacia el siguiente (Leblond & Clermont 1952).

2.5.1. Descripción de estadios del epitelio seminífero en la rata

Las células germinales en diferentes fases del ciclo espermatogénico forman asociaciones celulares identificables que fueron definidos para la rata en 14 estadios del ciclo del epitelio seminífero, designados en números romanos del I al XIV (Leblond & Clermont 1952). Este desarrollo sincronizado puede ser facilitado por la citocinesis incompleta durante las divisiones mitóticas con establecimiento de puentes citoplásmicos entre las células germinales. En la espermiogénesis se detallan 19 etapas con números arábigos del 1 al 19 que corresponden a diferenciación morfológica de espermátidas en espermatozoides (McLachlan et al. 1996). Los espermatozoides formados en la última etapa, etapa 19, se observan en los estadios VII y VIII del ciclo produciéndose posteriormente la espermiación (Kopera et al. 2010).

La duración de toda la sucesión de cambios que se producen representa la duración del ciclo del epitelio seminífero, y su duración permanece constante según la especie. En la rata un ciclo del dura alrededor de 12 días. Es decir que una espermatogonia requiere de 5 ciclos, 65 días, para completar su diferenciación a espermatozoide y ser liberado hacia la luz del túbulo seminífero (Hermo et al. 2010).

A continuación, se describen las asociaciones celulares o estadios en la rata (Leblond & Clermont 1952) que se observan en los túbulos seminíferos formando parte de un epitelio estratificado con células de Sertoli que sostienen a células germinales en distintas etapas de la espermatogénesis (Figura 8). Los estadios del ciclo del epitelio seminífero se identifican en la rata como 14 estadios enumerados con números romanos del I al XIV (Lagarrigue et al. 2011).

1) **Estadio I:** El estadio I se caracteriza por presentar las espermatogonias más diferenciadas o tipo A4. Éstas acumulan más cromatina en la membrana nuclear y

el núcleo tiene forma ovoide. También observamos espermatocitos en paquiteno y espermátidas redondas (en etapa 1) y elongadas (en etapa 15).

2) **Estadio II:** Se observan espermatogonias tipo A1 (con núcleos eucromáticos) y espermatogonias Intermedias, espermatocitos en paquiteno (con citoplasma más voluminoso y con núcleo con cromosomas cortos evidentes), espermátidas redondas (en etapa 2, en fase de capuchón acrosómico) y elongadas (en etapa 16).

3) **Estadio III:** Se observan espermatogonias tipo A1 (con núcleos eucromáticos) y espermatogonias Intermedias, espermatocitos en paquiteno, espermátidas redondas (en etapa 3) y elongadas (en etapa 16).

4) Estadio **IV**: Se observan espermatogonias A1 e intermedias, (I) espermatocitos en paquiteno y espermátidas redondas (en etapa 4) y elongadas (en etapa 17).

5) Estadio **V**: Se observan espermatogonias A1, espermatogonias de tipo B, espermátidas redondas (en etapa 5) y elongadas (en etapa 17).

6) Estadio **VI**: Se observan espermatogonias tipo A1 y Bmaduras, y en paquiteno, y espermátidas redondas (en etapa 6) y elongadas (en etapa 18).

7) **Estadio VII**: Se observan espermatogonias tipo A1 y espermatocitos pre-leptoténicos espermátidas redondas (en etapa 7) y elongadas (en etapa 19).

8) **Estadio VIII**: El estadio VIII se caracteriza por presentar espermatogonias A1, espermatocitos preleptoténicos y espermatocitos primarios en paquiteno y espermátidas elongadas (en etapa 8) y espermatozoides justo antes de la espermiación (etapa 19) en la luz del túbulo,

9) **Estadio IX:** Se observan espermatogonias A1maduras, espermatocitos en leptoteno y espermatocitos en paquiteno, espermátidas elongadas (en etapa 9).

10) **Estadio X:** Se observan espermatogonias tipo A2, espermatocitos en leptoteno y espermatocitos en paquiteno, espermátidas elongadas (en etapa 10).

11) **Estadio XI:** Se observan espermatogonias tipo A2, espermatocitos en lepteno y espermatocitos en paquiteno, espermátidas elongadas (en etapa 11).

12) **Estadio XII**: Se observan espermatogonias tipo A2 maduras, espermatocitos en cigoteno y espermatocitos en paquiteno, espermátidas elongadas (en etapa 12).

13) **Estadio XIII**: Se observan espermatogonias tipo A3, espermatocitos en cigoteno y espermatocitos en diploteno y diacinesis, espermátidas elongadas (en etapa 13).

14) **Estadio XIV**: Se observan espermatogonias tipo A3 maduras, espermatocitos en paquiteno y espermatocitos secundarios, espermátidas elongadas (en etapa 14) (Figura 8 y Figura 9).

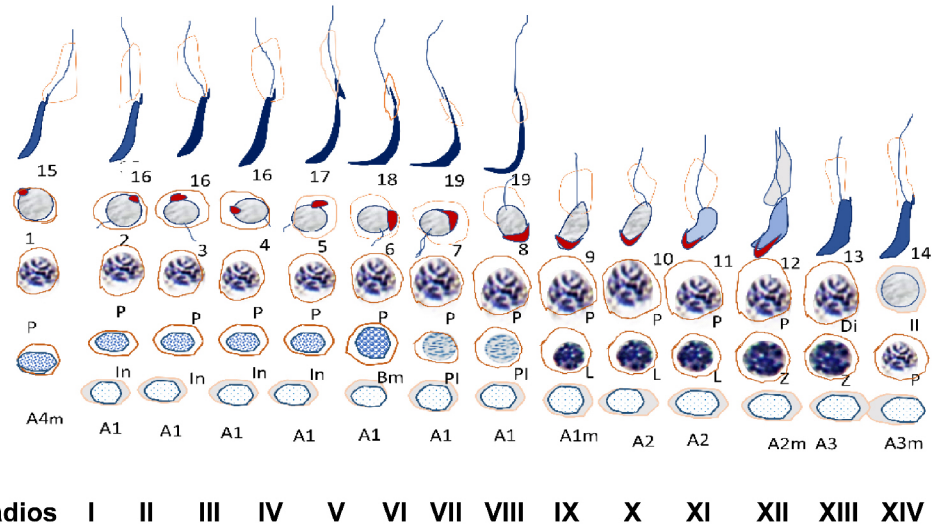


Figura 8. Esquema representativo de los estadios del ciclo espermatogénico o ciclo del epitelio seminífero con las 14 asociaciones celulares posibles de observar en los túbulos seminíferos de la rata. Pedrana a partir de Kerr et al. 2006 (Kerr et al. 2006). Espermatogonia: A1, A1m, A2, A2m, A3, A3m, A4m, In, Bm. Espermatocitos: en meiosis I pre-leptoténicos Pl, en leptoteno L, en zigoteno Z, en paquiteno P, en diploteno Di, en meiosis II. Espermátidas: redondas del 1 al 7, en elongación del 8 al 18, y 19 espermatozoide previo a su liberación o espermiación.

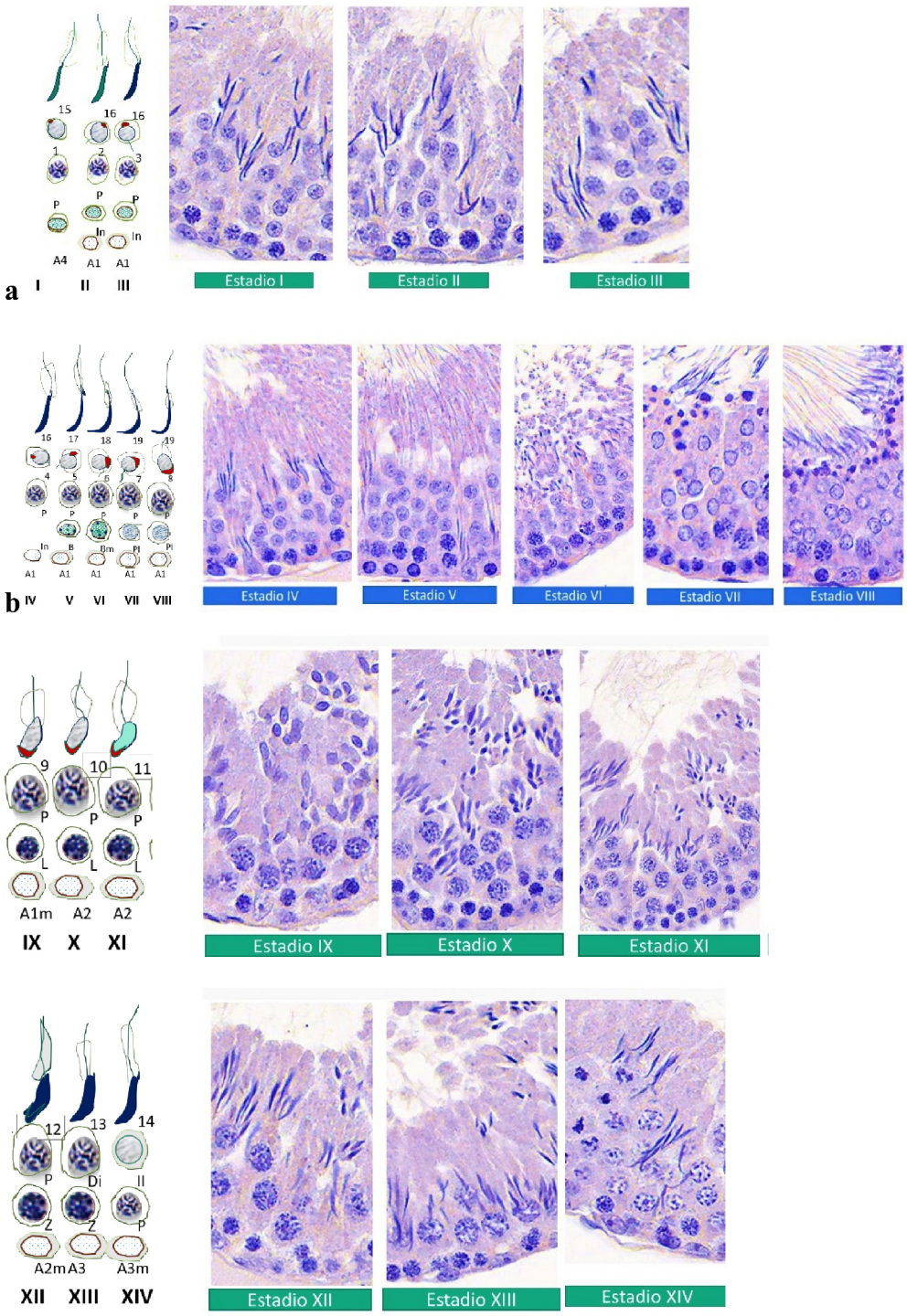


Figura 9. Imágenes representativas de los estadios del ciclo espermatogénico en la rata. a) Estadios del I al III, b) Estadios del IV al VII del epitelio seminífero. Imágenes histológicas testículos de rata. c) Estadios IX al XIV del epitelio seminífero. Imágenes histológicas testículos de rata. Fotografías de túbulos seminíferos G Pedrana 2020. Esquema de asociaciones de células germinales adaptado de Lagarrigue et al. 2011 (Lagarrigue et al. 2011) y Kerr et al. 2006 (Kerr et al. 2006).

2.6. Desarrollo testicular: ontogenia de células de Sertoli y células germinales

El testículo tiene origen en la cresta gonadal, que surge a partir de cara medial de cada mesonefros. El epitelio de la cresta gonadal es derivado de epitelio celómico (Hyttel et al. 2010). El proceso de diferenciación perinatal de gonocitos y de células germinales primordiales a células germinales más maduras, se establece a partir de la primera onda y de sucesivas ondas de espermatogénesis. Este período de desarrollo testicular se asocia con considerables cambios estructurales en el epitelio seminífero (Mackay, 2000). Durante este periodo perinatal el tamaño de los testículos aumenta por encima de 80 veces en roedores. Esta expansión es debida al hecho de que las células de Sertoli somáticas que sustentan a las células germinales proliferan extensamente hasta 12-16 días después del nacimiento de roedores (Vergouwen et al. 1991).

En ratas luego del día 13 post concepción el número de células de Sertoli aumenta rápidamente (Angelopoulou et al. 2008). Las células de Sertoli muestran en la rata su período de actividad mitótica más intenso poco antes del nacimiento, hacia el día 20 de la gestación y continúan proliferando hasta unas 3 semanas después del nacimiento (Orth 1982, Russell & Peterson 1984, Zhengwei et al. 1990, Boulogne et al. 1999). En el período postparto, estudios con marcadores de proliferación celular como PCNA y Ki-67 mostraron actividad mitótica de Sertoli con un pico a los 7 días postparto (Angelopoulou et al. 2008).

Se ha postulado que este período de tiempo temprano, durante el cual se produce simultáneamente la proliferación de células de Sertoli y células germinales tiene requisitos. Con cada división de células de Sertoli se crea un nuevo potencial nicho de células madre, que sería ocupado por la continua proliferación de espermatogonias madre / progenitoras seguido por la migración lateral de estas células a lo largo de la lámina basal (de Rooij & Russell 2000). A partir de entonces el proceso cíclico de espermatogénesis, iniciada desde el nicho de células madre espermatogonias durante la primera onda espermatogénica se mantiene durante toda la vida adulta. El stock de gonocitos se determina durante el desarrollo fetal y participa en la determinación del número de células madre germinales presentes en la edad adulta. La inducción experimental de la disminución del número de gonocitos durante el desarrollo fetal

lleva a la disminución en el conteo de espermatozoides en la edad adulta (Brown et al. 1986).

En el siguiente esquema se resume los eventos que ocurren durante el desarrollo del testículo en la vida fetal y postnatal hasta la vida adulta. En él se esquematizan los períodos de proliferación de células germinales y células somáticas de Sertoli y de Leydig (Figura 10).

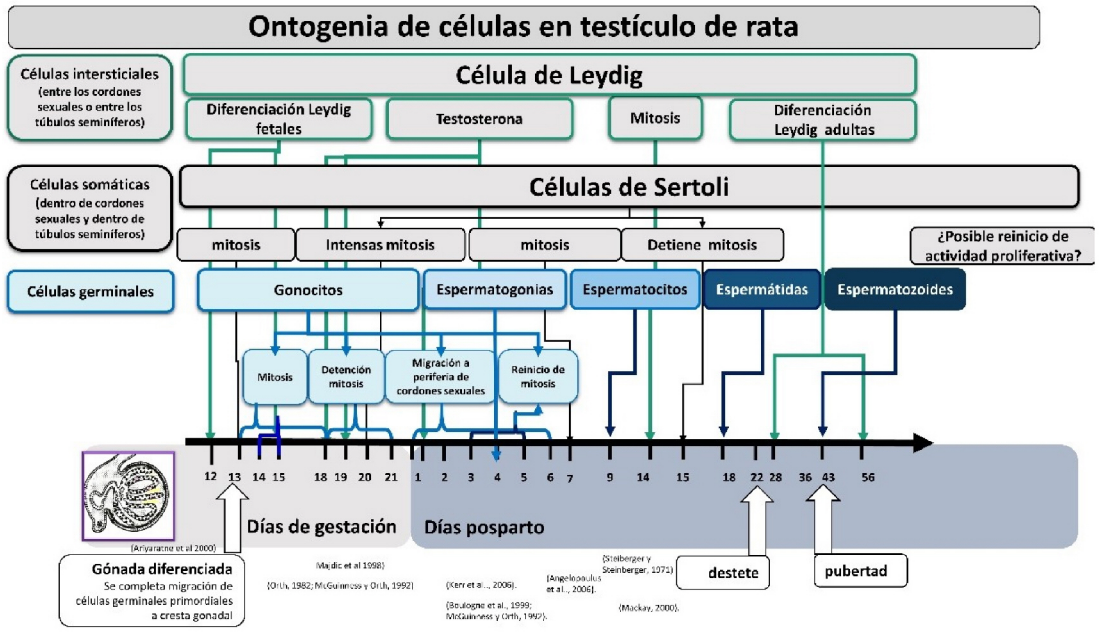
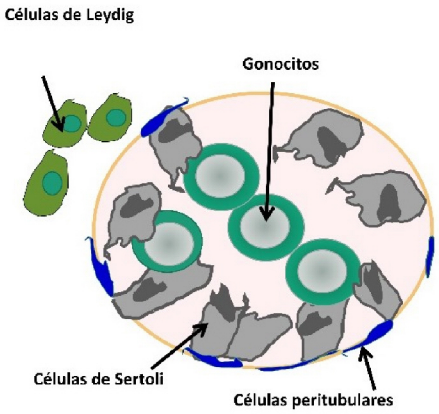


Figura 10. Ontogenia de células de Sertoli, germinales y células de Leydig en el testículo de rata. Al día 14 de gestación: se completa migración de células germinales o gonocitos, a los 13 a 18 de gestación: gonocitos proliferan y gonocitos entran en detención mitótica hasta luego del parto, del día 14 a 15 de gestación: diferenciación de células de Leydig fetales a partir de células mesenquimales entre los cordones sexuales, del día 18 a 19 de gestación: células de Leydig (pico testosterona fetal), día 20 de gestación: Sertoli actividad mitótica más intensa. Día 1 postparto: pico de testosterona, multiplicación y diferenciación de Leydig, día 4 (3 a 5) días posparto se reanuda la mitosis de gonocitos (Boulogne y col., 1999; McGuinness y Orth, 1992). Migración hacia la periferia del cordón sexual (Kerr y col., 2006) hasta contactar con la lámina basal (Orth, 1982; McGuinness y Orth, 1992), transformándose en espermatogonias y luego la proliferación cesa (Kerr y col., 2006). Primera onda de espermatogénesis en ratas: día 3 posparto- gonocitos se diferencian en espermatogonias, día 9 posparto espermatogonias se transforman en espermatocitos, día 18 posparto se forman primeras espermátidas haploides, Día 14 posparto: Leydig mitosis, Día 28 a 56: Leydig diferenciación a adultas, día 43 posparto los primeros espermatozoides (de Rooij 1998). día 15 posparto: Sertoli detiene su multiplicación. El desarrollo normal de los gonocitos en los primeros días postnatales es crítico para el desarrollo de una espermatogénesis apropiada en el adulto (Orth y col., 1988; De Rooij, 1998).

a)



b)

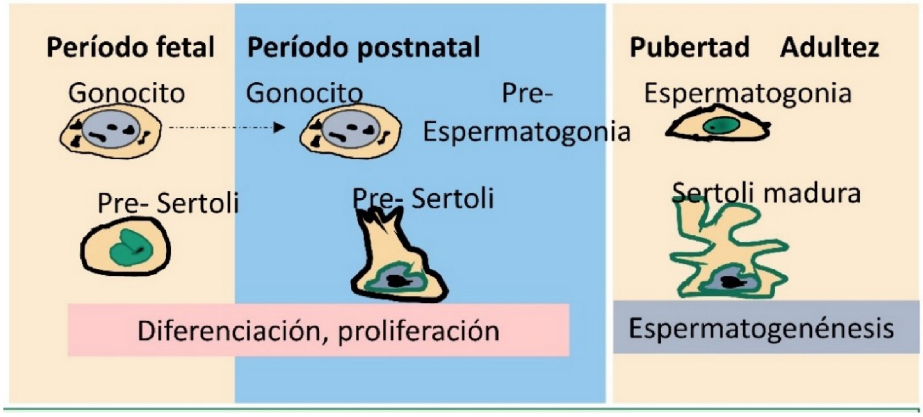


Figura 11. Esquema representativo de las poblaciones celulares en el testículo de rata durante de vida fetal y postnatal temprana, a) esquema de corte trasversal de cordón sexual con gonocitos en posición central y células de Sertoli en la periferia durante la etapa fetal, b) esquema de los cambios morfológicos de células germinales espermatogonias y Sertoli durante el desarrollo fetal y postnatal. Pedrana a partir de artículo de Sharpe et al. 2008).

2.7.Factores involucrados en el desarrollo de una espermatogénesis normal, balance entre proliferación y apoptosis

En el testículo de mamíferos, el nicho de células madre espermatogonias (SSC) reside en un microambiente especializado que regula la homeostasis testicular mediante el equilibrio entre los procesos de autorrenovación y diferenciación de SSC. El nicho de células madre se compone de células, componentes de la matriz extracelular y **factores solubles locales** presentes que regulan el destino celular. La base estructural para el nicho de SSC en el testículo es el compartimiento basal de los túbulos seminíferos que se compone de **células de Sertoli** y las **células mioides peritubulares** (Dadoune 2007). Juntos, las células de Sertoli y las células peritubulares mioides secretan los componentes de la membrana basal a los cuales las SSC están conectadas a través de

las moléculas de adhesión (Tung et al. 1987). La importancia de las células de Sertoli para la diferenciación de células germinales se demuestra por el trasplante de células de Sertoli normales en los testículos de los receptores estériles con defecto en las células de Sertoli y el inicio exitoso de la espermatogénesis (Sofikitis et al. 2005).

Considerando los aspectos reproductivos en machos, el proceso de espermatogénesis abarca una serie de eventos celulares perfectamente cronometrados que tienen lugar dentro del testículo, en un epitelio altamente organizado como es el epitelio seminífero. Varias proteínas incluyendo las proteínas de shock térmico (Erata et al. 2008), proteínas apoptóticas (Kojima et al. 2001) y factores de crecimiento (Kubota et al. 2004) están presentes en estas etapas de forma específica regulando la espermatogénesis.

2.7.1. Proteínas apoptóticas en el testículo

La apoptosis y la proliferación celular juegan un rol de gran importancia en el balance de las células testiculares y por ende en la espermatogénesis (Boulogne et al. 1999). La producción de espermatozoides en la edad adulta depende en parte de la gametogénesis fetal y de la capacidad de diferenciarse en gonocitos y en espermatogonias, así como de las demás poblaciones de células somáticas del testículo que determinan el microambiente testicular desde el comienzo de la vida fetal, establecido a partir de período de masculinización (Scott et al. 2009). El balance entre los procesos de apoptosis y proliferación celular son esenciales para un adecuado proceso de espermatogénesis (Boulogne et al. 1999). Durante el desarrollo postnatal de los testículos en la rata, se observa una mayor incidencia de células en degeneración en los túbulos seminíferos a los 16 a 32 días de nacidos, siendo menor en los adultos (Billig et al. 1996;de Rooij y Russell 2000).

Estudios previos en ratas han demostrado que la apoptosis de células germinales aumenta en la vida postnatal desde el día 16 al 32 (Billig et al. 1996). La administración materna de hormonas esteroideas vinculadas a estrés como los glucocorticoides afecta la inmunoexpresión de las proteínas pro-apoptóticas caspasa-3 y Bax y anti-apoptótica como Bcl-2 en testículos de animales pre-púberes en testículos de ovinos fetales y postnatales prepúberes (Pedrana et al.2013). Por otra parte, las células de Sertoli también sufren apoptosis en la rata (Benbrahim-Tallaa et al. 2008). El proceso de apoptosis de las células de Sertoli es directamente responsable de la formación de la

luz de los túbulos seminíferos durante el desarrollo postnatal normal (Cavicchia y Dym 1977).

2.7.1.1. Proteína apoptótica caspasa-3 en el testículo

Las denominadas caspasas o cisteinil aspartato proteasas son proteasas que juegan un papel clave en el proceso de apoptosis celular (Damavandi et al. 2002). La familia de las caspasas está constituida por más de doce proteasas caracterizadas por la presencia de residuos de cisteína en su sitio activo. Estas proteínas están ampliamente conservadas en el proceso evolutivo y comparten secuencias estructurales comunes y se localizan a nivel testicular formando parte de la onda de apoptosis al inicio de la primer onda espermatogénica (Jahnukainen et al. 2004). Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos que se convierten en la forma activa por rotura proteolítica. Una vez activas las caspasas producen la hidrólisis a partir de residuos de ácido aspártico en la proteína sustrato. Así, la activación inicial de una caspasa provoca una reacción en cadena que conduce a la activación de otras caspasas y a la muerte de la célula. Por lo tanto, la regulación de la activación de las caspasas es fundamental para determinar la supervivencia celular.

Aunque la familia de las caspasas comparte una estructura común, los análisis filogenéticos han demostrado la existencia de subfamilias que presentan diferentes características y que por lo tanto pueden tener distinto papel en el proceso de apoptosis. Encontramos las caspasas iniciadoras caspasas -2, -8, -9, -10 que presentan pro-dominios funcionales que permiten la asociación de estas moléculas con complejos de señalización. Por otra parte, encontramos las caspasas ejecutoras, caspasas -3, -6,-7 que son activadas por las caspasas iniciadoras y son las responsables de la interacción con otras moléculas que desencadenan la cascada de la apoptosis. La tercera subfamilia de caspasas es la de las caspasas procesadoras de citoquinas, constituidas por las caspasas-1, -4, -5, -12, -13, -14.

Se ha descrito que las caspasas 1 se activa por la ausencia de factores de crecimiento que hidroliza a la caspasa 3 in vitro y que promueve el procesamiento y activación de la interleucina-1ß (IL-1ß), sustancia implicada en la muerte neuronal. En cuanto a la caspasa 2, se activa por su unión a una molécula adaptadora que a su vez se une a una parte del complejo de señalización del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF)(Earnshaw et al. 1999).

Los marcadores apoptóticos se pueden utilizar potencialmente para evaluar la fertilización de los espermatozoides. Por ejemplo, los marcadores de pérdida de potencial mitocondrial son buenos marcadores de la fertilización de los espermatozoides (Ortega-Ferrusola et al. 2009). El aumento de la actividad de la caspasa, la tinción de anexina-V y la fragmentación del ADN también pueden servir como marcadores importantes para la supervivencia de los espermatozoides y la capacidad de fertilizar. Los espermatozoides con baja motilidad expresan una mayor actividad de caspasa y exposición de fosfatidilserina. La fragmentación del ADN se detecta en espermatozoides con menor movilidad (Grunewald et al. 2007). Por lo tanto, es evidente que los marcadores de apoptosis también pueden servir como parámetros de diagnóstico para la fertilización de los espermatozoides(Said et al. 2010).

2.7.1.2. Proteína apoptótica Bax en el testículo

En animales knock out para Bax o la sobreexpresión de Bcl-2 o Bclx bloquea la ola temprana de apoptosis que se produce normalmente en animales, por lo que se produce como resultado una acumulación de espermatogonias y espermatocitos, y los animales son infértiles (Furuchi et al. 1996, Russell et al. 2002).

En ratones deficientes en Bcl-2 la espermatogénesis normal, mientras que los que expresan sobreexpresión de Bax o niveles más bajos de Bcl-xL demuestran un aumento de la muerte de las células germinales (Yamamoto et al. 2001).

Por lo tanto, las alteraciones del equilibrio entre las proteínas protectoras de la apoptosis y las que inducen la apoptosis en los testículos son suficientes para perturbar el desarrollo normal de la espermatogénesis funcional (Russell et al. 2002, Shaha et al. 2010).

2.7.1.3. Proteína apoptótica Bcl-2 en el testículo

La proteína B-2 encontrada en célula de linfoma o Bcl-2 pertenece a una familia de proteínas de la familia BCL-2 que orquestan la vía mitocondrial apoptótica en las mitocondrias y el retículo endoplásmico. y están involucradas en otros procesos como la autofagia y la respuesta proteica no plegada que conducen a diferentes tipos de muerte celular. Las proteínas de la familia BCL-2 (Bcl-2 y Bax) están

predominantemente involucradas en la vía intrínseca, en la que regulan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Esta permeabilización da como resultado la liberación de factores desencadenantes de la apoptosis, como la liberación del citocromo c, desde el espacio intermembrana mitocondrial hacia el citosol en el que activan una cascada de caspasas iniciadoras y luego ejecutoras que llevan a los eventos proteolíticos generalizados que conducen a la muerte celular.

La espermatogénesis es un proceso dinámico y sincronizado de maduración de las espermatogonias a espermatozoides maduros, que tiene lugar en los túbulos seminíferos de los testículos. Este proceso implica el desarrollo mitótico de las espermatogonias y su diferenciación en espermatocitos que sufren la meiosis, seguido de la formación de espermátidas y espermatozoides maduros. Como en muchos tejidos del cuerpo, el número de células en los túbulos seminíferos de los testículos está determinado por un equilibrio dinámico entre la proliferación y la muerte celulares apoptótica (Russell et al. 2002). Tanto la muerte celular espontánea como el aumento debido a estímulos desencadenantes, ya sea por carencia de testosterona intratesticular y gonadotropinas, tóxicos que afecten a las células de Sertoli, o fármacos se producen por apoptosis.

2.7.2. Factores de crecimiento, factores de transcripción y hormonas producidos por células de Sertoli involucrados en la espermatogénesis

Para el éxito de la espermatogénesis, existe evidencia que múltiples factores de crecimiento y citoquinas están implicados en los mecanismos de control locales intra-testiculares. Dichos factores de crecimiento intra-testiculares son producidos por las células de Sertoli e influyen en la renovación por mitosis de células madre, así como promueven la diferenciación celular y en el ingreso a la meiosis de los espermatocitos pre-leptoténicos (Petersen & Soder 2006, Sofikitis et al. 2008).

Las células de Sertoli secretan numerosas glicoproteínas que funcionan como factores de crecimiento o factores paracrinos, tales como la sustancia inhibidora del conducto de Müller (MIH) o también llamada hormona anti-Mülleriana (AMH), ligando de c-kit, factor de células madre o SCF que estimula la supervivencia y la proliferación de espermatogonias, así como la inhibina y el factor neurotrófico derivado de células

gliales o GDNF y el factor de transcripción etv variante del gen 5 ETV5 (Sofikitis et al., 2005).

Una de las vías de regulación de células testiculares implica al factor de crecimiento transformante beta o TGFbeta que pertenece a una superfamilia que incluye a las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), la hormona anti-Mülleriana (AMH), factor de diferenciación y crecimiento (GDF), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y las activinas/inhibinas. El TGFbeta controla numerosos procesos celulares incluyendo la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis, tanto durante la embriogénesis como en la edad adulta (Moreno et al. 2010).

2.7.2.1.Factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I)

Entre los factores producidos por las células de Sertoli encontramos a la hormona o factor de crecimiento similar a insulina IGF-I. A nivel local en el testículo es producida por las células de Sertoli, con acción sobre el crecimiento de las células germinales (Griffeth et al. 2014).

Se han registrado receptores a IGF-I IGFR1 en las células de Sertoli, germinales de Leydig y mioides, por lo cual tiene acciones tanto autocrinas como paracrinas (Cannarella et al. 2017, Neirijnck et al. 2018b).

Por un lado, promueve la proliferación de células de Sertoli y su acción aumenta con la acción de la hormona FSH. También tiene acciones paracrinas sobre las células de Leydig estimulando la producción de andrógenos testiculares. Además, el IGF-I regula el metabolismo de la glucosa y el lactato en las células de Sertoli, que son metabolitos cruciales para la salud de las células germinales.

Asimismo, inhibe la apoptosis de células a través de mecanismos de activación de fosfatidilinositol 3 quinasa que a su vez promueve un aumento de Bcl-2 evitando la activación de caspasa-3.

Los receptores a IGF-I también se han detectado con expresión reducida en espermatocitos primarios y altamente expresados en espermatocitos secundarios y espermátidas tempranas. En los ratones knock out para IGF-I se observó retraso del crecimiento posnatal e infertilidad caracterizada por una disminución severa de la espermatogénesis y la producción de testosterona. En ratones a los 35 de edad se detectaron transcriptos en el epitelio seminífero en espermátidas. Los transcriptos a

receptors a IGF1R se detectaron por hibridación in situ a 14 y 35 días de edad, en células de Leydig, peritubulares y en algunas espermatogonias (Baker et al. 1996).

2.7.2.2.Hormona inhibina

La inhibina es una glicoproteína heterodimérica formada con 2 subunidades unidas por puentes disulfuro (heterodímero), que forman distintos tipos de inhibina y que tienen la propiedad de regular la síntesis de la hormona estimulante del folículo FSH por la hipófisis (de Kretser & Robertson 1989). La inhibina es producida por la célula de Sertoli en los testículos y suprime la secreción de FSH (Sharpe et al. 1999). La concentración de inhibina B en sangre está directamente relacionada con el número de células de Sertoli, lo que podrían proporcionar información sobre la cantidad de células de Sertoli en los testículos (Buzzard et al. 2004, De Kretser et al. 2004, Atanassova et al. 2005).

Por otra parte, en los hombres con alteración de la espermatogénesis en el síndrome de solo células de Sertoli o síndrome de Klinefelter) generalmente presentan niveles de inhibina B sérica muy bajos o indetectable. Asimismo, se demostró que en la rata adulta, las células de la línea germinal son necesarias no solo para la heterodimerización de la subunidad beta de inhibina, sino también para la expresión de esta subunidad en la célula de Sertoli (Suescun et al. 2004).

2.7.2.3. Factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF)

El proceso de proliferación de las células de Sertoli está finamente regulado por una variedad de factores hormonales y paracrinos / autocrinos, que regulan la velocidad y el grado de proliferación. Entre los factores autocrinos y paracrinos más importantes implicados en la regulación de la proliferación de células de Sertoli, así como los mecanismos de señalización por los que ejercen sus efectos se encuentra el factor neurotrófico derivado de células gliales o GDNF (Johnston et al. 2011, Jiang et al. 2020)

El GDNF es una glicoproteína perteneciente a la familia del factor de crecimiento transformante beta (Spinnler et al. 2010), secretada por las células de Sertoli (Yang y Han 2010). Existe evidencia in vitro e in vivo que el GDNF promueve la auto-renovación de SSC a través de GFRA1, una proteína extracelular unida a la membrana plasmática que contiene la región de unión a ligando que interactúa con GDNF

(Schlesser et al. 2008a). Se encontró que los ARNm de GDNF se expresan en muchos órganos y tejidos como cerebro, riñón, intestino, estómago, músculo, cartílago, pulmón y testículos (Tadokoro et al. 2002). La expresión de ARNm de GDNF en el testículo está relacionada con la expansión de la población de células de Sertoli.

Por lo tanto, GDNF contribuye a la regulación autocrina de proliferación de Sertoli, y regulación parácrina de renovación de SSC y diferenciación en espermatogonias (Ji et al. 2011). La adición de GDNF en cultivos de ratón aumentó la población de células madre SSC. Sin embargo, un aumento de expresión de GDNF en los testículos de ratones transgénicos resultó en acumulación de espermatogonias indiferenciadas *in vivo*. Por lo tanto, se sugirió que el GDNF inhibe la diferenciación de espermatogonias y aumenta la renovación de las SSC (Meng et al. 2000). Se ha demostrado que se requiere una combinación de GDNF y de su receptor GFRa1 soluble para la expansión in vitro de las SSC y la renovación de las SSC in vitro (Kubota et al. 2004). El GDNF secretado por las células de Sertoli es entonces un regulador clave del nicho SSC y actúa a través de Ret (receptor tirosina quinasa) y GFRa1 (co-receptor) (Oatley et al. 2005). La producción de GDNF por las células de Sertoli se ve reforzada por la FSH en cultivos de células de ratones postnatales (Tadokoro et al. 2002) y por el TNF-alfa (Spinnler et al. 2010).

El factor de transcripción GDNF ha sido encontrado en los testículos de diferentes especies, incluyendo ratón y rata (Kubota et al. 2004) bovinos (Ryu et al. 2005) y en primates (Oatley et al. 2007, Maki et al. 2009) que expresan el receptor GFR-A1 para GDNF (França et al. 2016). El glicosil-fosfatidil-inositol (molécula de unión-TFG a1) y la molécula de tirosina quinasa transmembrana son el complejo receptor funcional para GDNF (Oatley et al. 2007).

2.7.2.4.Factor de transcripción etv variante del gen 5 ETV5

El factor de transcripción etv variante del gen 5 ETV5 es también conocido como ERM o ets-related molecule o transcription variant (Tyagi et al. 2009). Se expresa tanto en células de Sertoli como en las células germinales y es esencial para la renovación de SSC (Simon et al. 2010). La pérdida de ETV5 parece dañar la capacidad de las células de Sertoli para sustentar a las espermatogonias, posiblemente por una disminución de los niveles de claudina-5 (CLDN5) en ratones knockout, lo que afecta la función de la barrera hemato-testicular (Tyagi et al. 2009). En los ratones knock-out del gen *Etv5*

(Etv5-/) ocurre la primera onda de espermatogénesis, pero todas las SSC se pierden durante este tiempo, causando un fenotipo de solo células de Sertoli y azoospermia en adultos (Schlesser et al. 2008a).

Se ha determinado que en ratone *Etv5- /-,* los pesos corporales postnatales se reducen lo que indica un papel de ETV5 en el crecimiento. El desarrollo inicial de los testículos es normal en ratones *Etv5- /-* a pesar de una disminución del peso corporal, pero la pérdida de SSC comienza entre 4 y 8 días de la edad, lo que indica que ETV5 tiene efectos a partir del período neonatal temprano (Tyagi et al. 2009). Los pesos de los testículos en *Etv5- /- y* de fenotipo salvaje fueron similares al 4 día postnatal, pero los pesos testiculares se redujeron al día 8 y posteriormente, lo que indica que el ETV5 impacta en el crecimiento testicular postnatal. Los ratones *Etv5-/-* son infértiles, incluso cuando se produce el esperma, lo que indica que la pérdida de ETV5 tiene otros efectos, además de la falta de autorrenovación SSC y perjudica la fertilidad. La interrupción focalizada del gen *Etv5* da como resultado el mantenimiento defectuoso de la población de SSC, mientras que la diferenciación de espermatogonias parece ser afectada por esta mutación (Schlesser et al. 2008a).

2.7.3. Proteínas de shock térmico y factor de transcripción HSF-1

Las proteínas de shock térmico (Hsps) fueron descubiertas por primera vez por el científico italiano Ferruccio Ritossa en el año 1960. Cuando Ritossa se encontraba estudiando la síntesis del ácido nucleico en las glándulas salivales de la mosca *Drosophila melanogaster,* por una elevación de la temperatura de incubación, se observó una actividad transcripcional y nuevas proteínas (De Maio et al. 2012). Se las describió como una cohorte de proteínas fuertemente inducidas por shock térmico y otros tipos de estrés químico y físico. Por lo tanto, son conocidas como "proteínas de estrés", altamente conservadas durante la evolución y expresadas tanto en organismos procariotas como eucariotas (Georgopoulos & Welch 1993). Las Hsps se han caracterizado como proteínas chaperonas moleculares, que tienen en común la propiedad de modificar las estructuras e interaccionar con otras proteínas, como los receptores a hormonas esteroideas como los glucocorticoides, estrógenos y andrógenos (Beckmann et al. 1990). Las Hsps pueden clasificarse de acuerdo con su peso molecular, expresado en kiloDaltons: HSP15-30, HSP-40, HSP-60, HSP-70, HSP-90 y HSP1 (Kampinga et al. 2009).

Las Hsps también son sintetizadas en respuesta a estrés ambiental, en condiciones fisiológicas, así como en eventos patológicos y protegen por mediación de plegamiento de proteínas. Hsps son inducidas no sólo durante el estrés, sino que también se expresan constitutivamente en niveles bajos en virtud de las condiciones fisiológicas normales (Niino et al. 2000).

Se encuentran en prácticamente todos los organismos vivos desde las bacterias hasta los seres humanos, poseen función citoprotectora y son chaperonas moleculares para otras proteínas celulares. Cuando ocurre un estrés crónico o agudo se activa una señalización inapropiada, debido al mal plegamiento o agregación de las proteínas y disrupción de los complejos reguladores y dichas chaperonas a través de sus propiedades intentan restablecer el equilibrio (Lanneau et al. 2008). Las Hsps promueven la supervivencia celular manteniendo la integridad estructural y funcional de las proteínas cliente, que regulan la supervivencia, proliferación y apoptosis celular (Saribek et al. 2006). Algunos de los factores que intervienen en la inducción de las HSP son la hipertermia, estrés oxidativo, inflamación, daño celular, hipoxia, isquemia y agotamiento de la energía celular y desempeñan un rol en el desarrollo (Ohsako et al. 1995). Las Hsps en mamíferos regulan tanto la señalización como la ejecución de las principales vías de la muerte celular inhibiendo la apoptosis (Beere et al. 2000). En consecuencia, las Hsps juegan un rol principal en la resistencia a una variedad de agentes tóxicos y situaciones estresantes. Asimismo, desde hace varios años han sido consideradas como biomarcadores potenciales que se incluyen en los programas de bio monitoreo, mostrando un patrón específico de respuesta a estímulos seleccionados (Radlowska & Pempkowiak 2002). El rol de estas proteínas dentro de los principales mecanismos de protección celular los hace buenos marcadores de estrés en un organismo. Las ventajas son que dan información sobre las condiciones generales de salud y proporcionan alertas tempranas de intoxicación, antes de que las funciones complejas se vean comprometidas (Fabbri et al. 2008).

En los testículos las HSPs regulan el proceso de apoptosis durante la espermatogénesis con el fin de mantener una población adecuada de células germinales y eliminar espermatozoides anormales (Lanneau et al. 2008, Ji et al. 2012, Purandhar et al. 2014). Durante el proceso de espermatogénesis los pasos de transformación y diferenciación celular se ven acompañados por la expresión de las HSPs (Neuer et al. 2000). Algunas

de las proteínas de shock térmico están estrechamente relacionadas con el desarrollo de las gónadas y la espermatogénesis vinculadas a los procesos de apoptosis en el testículo (Saribek et al. 2006).

2.7.3.1. Proteína de shock térmico HSP70 en reproducción masculina

La familia de las proteínas de shock térmico de 70 kDa de peso molecular, está formada por las proteínas de 72 kDa inducible Hsp-70 y la de 73 kDa como la HSP-70 constitutiva (Hsp72/73), la HSP-7075 mitocondrial (GRP75) y la HSP-70 de 78 kDa del retículo endoplásmico (BIP, GRP78), y la Hsp-70 vinculante, un péptido de 72 y 74 kDa (PBP72/73) (Salo et al. 1991, Sarge & Cullen 1997, Selim et al. 2012, Au et al. 2015) .

La proteína HSP70 es una proteína de shock térmico implicada en el mantenimiento del nucléolo y la integridad del centrosoma en células tumorales sometidas a shock térmico y la protección de las células contra el estrés citotóxico.

En el testículo, la HSP70 juega un papel importante durante la meiosis en ratón, para la separación de los complejos sinaptonémicos durante la profase meiótica en espermatocito (Dix 1997, Eddy 1999). Los ratones que carecen de HSP70 son estériles y ello se asocia con alteraciones en la morfología de los espermatozoides y baja concentración espermática (Sarge & Cullen 1997). En lo que refiere a HSP70 en la reproducción masculina, se ha determinado que ratones knock-out para el gen de *Hsp70-2* producen espermatocitos paquiténicos que se convirtieron en apoptóticos y que fueron detenidos en la transición de la fase G2/M de la meiosis I (Mori et al. 1997). Además, el complejo de ciclina B1-CDC2 requerido para la transición G2 a la fase M no se pudo ensamblar y fue convertido en una quinasa activa en los espermatocitos mutantes. Los testículos de ratones juveniles knock-out del gen de *Hsp70-2* son estériles y carecen de espermátidas y espermatozoides en la edad adulta (Dix et al. 1997). Por lo tanto, el fenotipo de los ratones knock out para en gen *Hsp70*-2 indica la necesidad de la presencia de la HSP70 en el control del ciclo celular en la proliferación celular, así como en la fase meiótica y en la apoptosis de células germinales. Por otra parte, el aumento en la expresión de HSP70 parece ser un mecanismo de protección contra la apoptosis en los espermatozoides en hombres infértiles (Erata et al. 2008).

2.7.3.2. Proteína de shock térmico HSP90 en reproducción masculina

Se ha visto una marcada expresión de HSP90 en diferentes fases de la espermatogénesis en testículos de ratas (Purandhar et al. 2014). En el testículo la HSP90 es una proteína vinculada a la estabilización y activación de quinasas post-meióticas (Jha et al. 2013). Estudios previos determinaron que una sobre expresión de HSP90 se produce a nivel de las células de la línea germinal en etapas tempranas del desarrollo, sugiriendo que dicha proteína es necesaria para el normal desarrollo embrionario temprano del testículo (Sreedhar et al. 2004). Por otra parte, durante la espermatogénesis las HSPs regulan la apoptosis, a través de mecanismos anti apoptóticos como pro apoptóticos. Por lo tanto, las proteínas de shock térmico mantienen un número adecuado de células germinales y de Sertoli, eliminando espermatozoides anormales. De esta manera se asegura la supervivencia y se previene el desarrollo defectuoso en la próxima generación (Ji et al. 2012). Luego de un shock térmico la HSP90 se incrementa y parte se relocaliza en el núcleo (Biggiogera et al. 1996).

La HSP90 es una de las chaperonas moleculares más abundantes en el citosol de células eucariotas, siendo un regulador clave conformacional. Se diferencia de otras chaperonas en que interactúa con un gran número de co-chaperonas y que no se une a las cadenas de polipéptido naciente o no plegadas. Por el contrario, la HSP90 interactúa con un conjunto limitado de proteínas cliente parcialmente plegadas, más aún que la HSP70 siendo esta última una chaperona que asocia con la cadena de polipéptido recién sintetizado (Röhl et al. 2013). Hay múltiples proteínas cliente de HSP90α, incluyendo los receptores de hormonas esteroides tales como el receptor de estrógenos, proteínas quinasas, proteínas del ciclo celular y factores de transcripción que promueven la proliferación celular, supervivencia, evasión de apoptosis (Workman y Powers 2007). Por otra parte, los mecanismos subyacentes de las Hsps en la progresión tumoral y la resistencia a tratamiento se vinculan a estabilización de membranas lisosomales e inhibición de la formación del apoptosoma por lo que la expresión de proteínas de shock térmico juega un papel clave en células tumorales en la evasión de la apoptosis (Gyrd-Hansen et al. 2004). También participa en diversos procesos celulares como transducción de señales, transporte intracelular y degradación de proteínas (Li & Buchner 2012). HSP90 interviene en los procesos de homeostasis

celular, regulación transcripcional y reparación de ADN (Pennisi et al. 2015) y constituye el 1-2% del total de las proteínas celulares en condiciones normales (Lanneau et al. 2008). Se encuentra en su mayoría en el citoplasma, aunque puede translocarse hacia el núcleo en condiciones de estrés (Taipale et al. 2010). Se encuentra expresada en gran cantidad en células eucariotas normales y en células tumorales (Saribek et al. 2006). HSP90 α y HSP90β son las dos isoformas principales que se encuentran en el citoplasma de las células de los mamíferos. La HSP90α se expresa bajo condiciones de estrés, mientras que HSP90β se expresa constitutivamente (Li & Buchner 2012). La proteína de shock térmico HSP90α responde expresándose rápidamente como isoforma cito protectora, mientras que HSP90β actúa a largo plazo en la adaptación celular y facilitando la evolución celular. HSP90β regula funciones celulares normales como el mantenimiento de la arquitectura celular, diferenciación y citoprotección (Sreedhar et al. 2004). Es un homodímero y contiene tres regiones enlazadas flexibles, un N-terminal ATP-dominio de unión (Dominio-N), un dominio medio (Dominio-M) y un dominio de dimerización C-terminal (Dominio-C) (Li & Buchner 2012). La proteína de shock térmico HSP90 está codificada en ratas por el gen *Hsp90* ubicado en el cromosoma 7: 27,226,569-27,240,533 y posee dos transcriptos, HSP90b1-202 que se encuentra formado por 3168 pares de bases y 643 aminoácidos, y HSP90b1-201 formado por 2799 pares de bases y 804 aminoácidos.

(http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Gene/Summary?g=ENSRNOG00000026963;r=7:27226569-27240533)

2.7.3.3. Factor de transcripción de shock térmico HSF1 en reproducción masculina

La respuesta al shock térmico implica la inducción de proteínas de choque térmico cuya expresión está regulada principalmente por el factor de shock térmico 1 HSF1. La respuesta al estrés por calor y el factor de shock térmico HSF1, protege a las células del estrés proteo tóxico al inducir a las proteínas de shock térmico como chaperonas moleculares (Ferlin et al. 2010).

En el testículo la síntesis de testosterona testicular comienza con el transporte de colesterol a las mitocondrias a través de la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) en las células de Leydig. Se sabe que el estrés por calor agudo obstruye la esteroidogénesis testicular mediante la represión transcripcional de StAR. En contraste, el estrés por calor crónico, como la criptorquidia o el varicocele, generalmente no afecta la esteroidogénesis testicular, lo que sugiere que las células de Leydig se adaptan al estrés por calor y retienen su capacidad de síntesis de esteroides (Oka et al. 2017). El rol de HSF1 en la esteroidogénesis de células de Leydig es clave, ya que mantiene el transporte de colesterol mediante la recuperación de StAR bajo estrés por calor crónico (Furukawa et al. 2019).

En hembras se ha estudiado que el factor de shock térmico HSF1 protege la proliferación de células germinales durante la diferenciación ovárica temprana en peces teleósteos. La alta temperatura del agua inhibe la proliferación de células germinales de tipo femenino e induce la masculinización de XX en algunos casos durante la diferenciación sexual gonadal. HSF1 protege la proliferación de células germinales de tipo femenino inhibiendo la expresión del gen que codifica para la hormona anti-Mülleriana en células somáticas gonadales (Furukawa et al, 2019).

Por otra parte, el factor de shock HSF1 es el principal regulador de la respuesta inducible por estrés, que se caracteriza por una expresión rápida y transitoria de genes que codifican proteínas de choque térmico (Hsps). La función de HSF1 depende de la activación del estrés y la unión a elementos de shock térmico (HSE) ubicados en las regiones promotoras de los genes diana de HSF1. En los mamíferos, la actividad de unión de HSF1 está regulada diferencialmente en los órganos intraabdominales

mantenidos a 37 ° C y en los testículos, que se encuentran fuera de la cavidad corporal y permanecen a una temperatura más baja.

Por ejemplo, HSF1 está vinculado a HSE a 37 ° C en células germinales, mientras que esta actividad de unión al ADN requiere una temperatura más alta en las células somáticas. Cuando la criptorquidia impide la migración de las gónadas masculinas a una posición extra abdominal, HSF1 se activa de forma persistente y la espermatogénesis, que incluye una asociación estrictamente regulada de proliferación de espermatogonias y división meiótica de los espermatocitos, se ve gravemente alterada.

2.8. Importancia en la espermatogénesis de los factores hormonales inhibina B, factores de crecimiento IGF-I y de transcripción GDNF y ETV5 producidos por las células de Sertoli

Los factores antes mencionados inhibina, IGF-I, GDNF y ETV5 estimulan de manera autocrina la proliferación y el desarrollo funcional de las células de Sertoli y renovación de las células germinales durante el periodo posnatal temprano del desarrollo de los testículos de ratas (Figura 12). Los efectos del GDNF como ETV5 producido por las células de Sertoli, son efectos positivos de estimulación autocrina (Yang & Han 2010) estimulando la proliferación de las células de Sertoli que los sintetizan.

Por otra parte, los factores antes mencionados tienen acción paracrina, estimulando la proliferación de las células de la línea germinal (Dai et al. 2017). En consecuencia promueven el desarrollo de una correcta espermatogénesis (Schlesser et al. 2008b, Tyagi et al. 2009, O'Bryan et al. 2012).

Por lo tanto, cambios durante el desarrollo que produzcan alteraciones en dichos factores producidos por las células de Sertoli en el testículo podrían alterar su funcionamiento y por ende afectar la espermatogénesis.

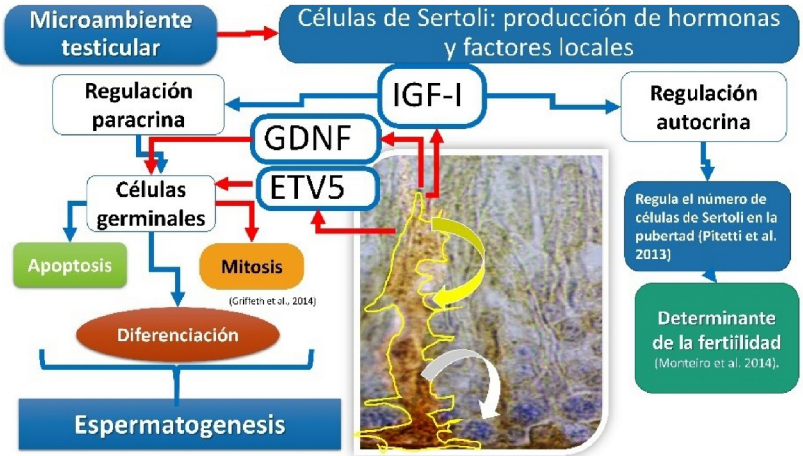


Figura 12. Factores reguladores del microambiente testicular. Los factores producidos por las células de Sertoli IGF-I, ETV5 y GDNF que actúan sobre las células germinales promoviendo procesos de proliferación, así como sobre las células de Sertoli (regulación autocrina) Esquema realizado por Pedrana a partir de los artículos (Pitetti et al. 2013a, Escott et al. 2014, Neirijnck et al. 2018a)

2.9. Programación fetal: Orígenes durante el desarrollo de la salud y enfermedad

La programación del desarrollo es un concepto desarrollado para comprender cómo un estímulo o insulto materno durante un período crítico del desarrollo fetal tiene efectos a largo plazo en la descendencia (Funston et al. 2010). Se considera que el ambiente intrauterino es uno de los factores determinantes del crecimiento fetal y produce consecuencias de por vida (Godfrey & Barker 2001, Guilloteau et al. 2009). El estudio de los factores que actúan en momentos clave del desarrollo y que generan enfermedades que se manifiestan a lo largo de la vida en el adulto y que determinan a largo plazo cambios en el funcionamiento de tejidos, órganos o sistemas es de suma importancia tanto a nivel de la salud humana como animal (El-Heis & Godfrey 2015). En humanos estudios epidemiológicos han dado lugar a la teoría del "origen fetal de las enfermedades en adultos" o hipótesis de Barker o programación fetal (Barker & Clark 1997). Dicha teoría busca comprender los orígenes durante el desarrollo de la salud y las enfermedades con una tendencia creciente a lograr una medicina preventiva (Ho et al. 2017, Oestreich & Moley 2017, Jazwiec & Sloboda 2019) (Figura 13).



Figura 13. Esquema resumido de teoría de programación fetal. Los factores adversos que afecten el desarrollo gestacional pueden alterar la estructura y función de órganos predisponiendo a enfermedades durante su vida adulta (Rhind et al. 2001, Drake et al. 2005, Fowden et al. 2006, Barker 2007, Seckl & Holmes 2007, Aiken & Ozanne 2013).

2.9.1. Enfermedades reproductivas durante el desarrollo en el hombre o síndrome de disgenesia testicular

Los factores que actúen durante el desarrollo y que desencadenen cambios en el delicado equilibrio entre los procesos de muerte celular y multiplicación celular por ejemplo a nivel testicular determinarán consecuencias negativas en la producción de espermatozoides en la vida adulta (Abbott et al. 2005). La hipótesis del origen fetal de enfermedades en el adulto o programación fetal se sustenta en numerosos informes clínicos y experimentales. Por ejemplo el tratamiento prenatal en mujeres gestantes con un estrógeno agonista muy potente, dietil-estil-bestrol (DES) produce el síndrome disgenesia testicular en sus niños nacidos, con alteraciones futuras en la calidad del esperma y una mayor incidencia de malformaciones genitales, criptorquidia (Skakkebaek et al. 2001) y cáncer testicular que en la población control (Strohsnitter et al. 2001) (Figura 14).

El desarrollo testicular anormal tiene numerosas causas primarias, que lleva a disfunciones hormonales de las células de Leydig y de Sertoli durante la diferenciación sexual masculina, lo que aumenta el riesgo de trastornos de la reproducción (Sloboda et al. 2005). Estudios epidemiológicos señalaron que el DES parece tener un efecto negativo en el conteo de espermatozoides si se administra en dosis alta durante el primer semestre de la gestación, siendo determinante el período de tiempo específico de tratamiento (Storgaard et al. 2006). Otro ejemplo de programación fetal se refiere a los xenobióticos como los ftalatos que producen efectos negativos en concentraciones ambientales sobre el desarrollo del tracto reproductivo masculino humano y el aumento de la concentración urinaria de ftalato materna durante el embarazo se correlaciona inversamente con la distancia anogenital al nacimiento (Delbès et al. 2006).

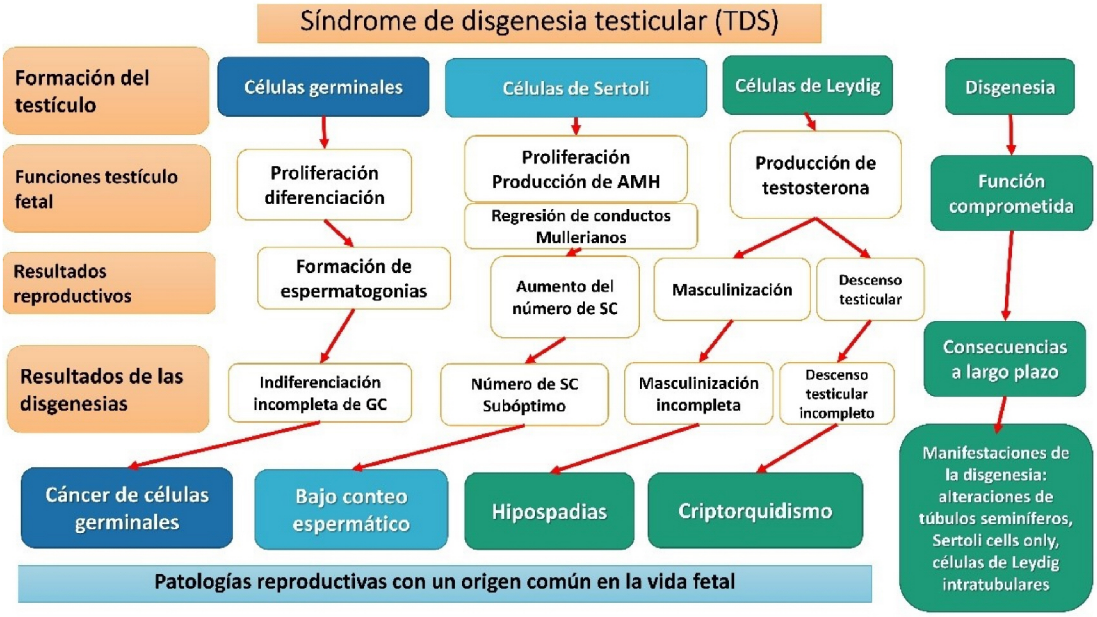


Figura 14. Esquema del síndrome de disgenesia testicular propuesto por Sharpe y Skakkebaek (2008) abreviado. En el desarrollo fetal del testículo se describen las principales células y sus acciones en el desarrollo fetal y cuáles son los posibles resultados de las alteraciones generando las patologías a largo plazo en la vida adulta.

2.9.2. Subnutrición materna como factor de programación fetal: efectos sistémicos

Entre los factores de programación fetal se considera que el estado nutricional de la madre juega un rol crítico en el crecimiento y desarrollo fetal, pudiendo alterar el estado epigenético del genoma fetal e imprimir la expresión génica (Wu et al. 2004). La nutrición de las madres durante la gestación y lactancia es uno de los factores que impactan sobre el crecimiento y desarrollo de los animales de producción. Numerosos estudios a nivel de producción animal han determinado que la nutrición influye en la salud y la productividad animal durante el período posnatal (Ward & Stickland 1991, Caton et al. 2019, Bautista et al. 2019). Por ejemplo, la subnutrición materna afecta no sólo la cantidad sino la calidad de la carne producida por las crías y determina su futuro como animales reproductores (Ward & Stickland 1991, Wallace 2000).

La subnutrición materna es uno de los factores ambientales intrauterinos de programación fetal, generando cambios epigenéticos (Langley-Evans & Muhlhausler 2018, Crispi et al. 2018). De acuerdo con la teoría de Baker, el estado nutricional de la madre durante la gestación puede alterar el desarrollo fetal disminuyendo el peso al nacer, y programando a largo plazo alteraciones en la vida adulta (Barker 2007). La subnutrición en las etapas tempranas de la gestación, aumenta la predisposición a la obesidad y enfermedades cardiovasculares (Varvarigou 2010, Heindel & Vandenberg 2015), así como predispone a enfermedades metabólicas como hiperinsulinemia, y patologías reproductivas (Chechi et al. 2009, Smith et al. 2014).

Asimismo, en adultos el estado nutricional es uno de los principales factores que regulan la respuesta reproductiva. La subnutrición materna durante la gestación reduce el crecimiento fetal y placentario. Existe evidencia que durante los períodos de pre-implantación y el periodo de rápido desarrollo placentario el crecimiento fetal es más vulnerable a la deficiencia nutricional en la madre (Wu et al. 2004). Dichas alteraciones en la nutrición fetal y estatus endócrino pueden resultar en una adaptación del desarrollo permanente, provocando cambios a nivel de la estructura y función de las crías, predisponiendo a sufrir enfermedades metabólicas, endocrinas y cardiovasculares en los adultos. El feto detecta el entorno adverso y reprograma el genoma, favoreciendo la supervivencia, pero predispone a enfermedades metabólicas

en la vida adulta. El desarrollo de estas enfermedades depende del grado de desajuste en el ambiente pre y posnatal. Una restricción calórica moderada o grave, da como resultado un menor peso corporal, hiperfagia y alteraciones metabólicas como adiposidad, hipertensión, hiperinsulinemia, hiperleptinemia y expresión genética alterada (Lakshmy 2013). Los embriones tienen la capacidad de responder a las influencias ambientales como ser el shock térmico sintetizando proteínas protectoras de shock térmico a través de la transcripción de nuevo ARN mensajero (Rhind et al. 2001). Si se produce la subnutrición durante un período en que un órgano, y sus tipos celulares ya se han desarrollado éste no será afectado por dicho tratamiento, pero si se ve afectado si ocurre en células madre, en pleno desarrollo y multiplicación celular (Rhind et al. 2001).

2.9.3. Efectos de la subnutrición materna sobre IGF-I

En ovinos las restricciones nutricionales maternas de un 50% de los requerimientos energéticos durante la gestación tardía en ovejas afectan los niveles del factor de crecimiento similar a insulina IGF1 durante la vida fetal y alteran el desarrollo reproductivo en el cordero neonatal, con posibles consecuencias negativas permanentes en el rendimiento reproductivo futuro de la descendencia (Hoffman et al. 2018).

2.9.4. Subnutrición materna como factor de programación fetal: efectos reproductivos

¿Qué conocemos y qué falta por conocer en cuanto a la programación fetal por subnutrición?

¿Cuáles son los efectos de la subnutrición durante la preñez en la reproducción en machos?

Los efectos de la subnutrición materna sobre las crías macho adultas en distintos modelos experimentales son varios y los podemos resumir en la siguiente Tabla (Tabla1).

Entre los principales efectos de la subnutrición materna sobre las crías macho encontramos los siguientes

1) **Infertilidad en el macho por subnutrición materna**

A nivel de la reproducción se ha demostrado que una restricción de nutrientes durante la preñez provoca infertilidad en machos en la vida adulta (Zambrano et al. 2014). Estudios con suministro de dietas maternas bajas en proteínas altera la fertilidad a un 50% en animales con restricción durante la preñez y el recuento de espermatozoides disminuyó en los restringidos en preñez y en preñez y lactancia (Zambrano et al. 2005).

En su revisión Wu y colaboradores mencionan que el estado nutricional materno puede alterar el estado epigenético del genoma fetal y alterar la expresión génica. Los cambios epigenéticos son alteraciones estables de la expresión génica a través de modificaciones covalentes del ADN y las histonas centrales en los embriones tempranos y pueden trasladarse a etapas posteriores del desarrollo. Uno de los mecanismos que median los efectos epigenéticos son la metilación del ADN y la modificación de las histonas (acetilación y metilación). La metilación puede regular la expresión génica modulando la unión de proteínas de unión a ADN sensibles a metilo, lo que afecta la conformación regional de la cromatina. La expresión génica puede verse afectada por la acetilación o metilación de histonas que pueden alterar la posición de las interacciones histona-ADN y la afinidad de la unión de las histonas al ADN (Wu et al. 2004).

2) Disminución de volumen ocupado por cordones testiculares y de células de Sertoli macho por subnutrición materna

La subnutrición materna en ovejas disminuye el número de células de Sertoli en las crías en corderos (Bielli et al. 2001, 2002) y en la etapa puberal (Kotsampasi et al. 2009, Rodriguez-Gonzalez et al. 2012).

En ovinos los corderos cuyas madres fueron alimentadas con dietas altas en energía presentan testículos que tienden a ser más pesados en comparación con los subnutridos en la gestación, así como el volumen absoluto por cordones testiculares y el número de células de Sertoli tendiente a ser mayores. Dependiendo de la capacidad de la población de células de Sertoli para recuperarse entre el nacimiento y la pubertad, esto puede limitar el número final de células de Sertoli y, por lo tanto, la capacidad futura para la producción de esperma y la fertilidad (Bielli et al. 2002).

3) Disminución de la producción de espermatozoides por subnutrición materna

En ratas adultas subnutridas durante el desarrollo fetal y postnatal, se ha visto que se afecta la producción de espermatozoides (Rodríguez-González et al. 2012).

Dietas bajas en proteína durante la preñez y/o lactación afectaron el desarrollo del sistema reproductivo en ratas macho, con un retraso en el desarrollo del sistema reproductivo y una disminución de la fertilidad, y en el número de espermatozoides a los 70 días de vida. Se encontró que el mayor efecto persistente en el crecimiento testicular fue debido a la restricción alimentaria de la madre en el periodo de lactación. Esto coincide con la temporización postnatal de la división celular y el crecimiento en ratas (Zambrano et al. 2005) (Figura 15).

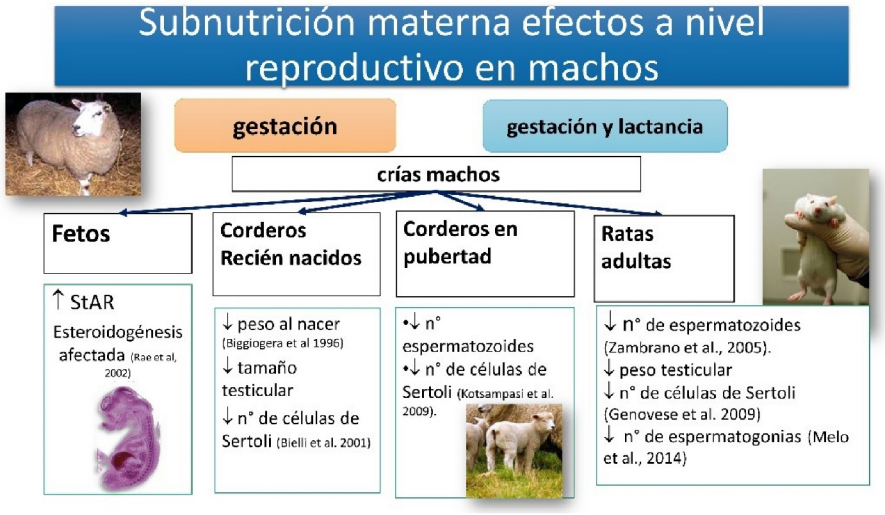


Figura 15. Selección de los principales efectos estudiados de la subnutrición materna en las crías macho. Efectos en fetos, animales recién nacidos, púberes y adultos.

Tabla 1. Efectos de la subnutrición materna en ratas y ovinos según el período sobre la reproducción en el macho. P = Preñez y L= lactancia

Especie	Dieta materna	Período de subnutrición	Efecto observado
Ovino[10]	subnutrición	P	Efecto observado en recién nacidos: Aumenta la expresión de ARNm para la proteína androgénica responsable de la esteroidogénesis.
Ovino[11]	subnutrición	P	Efecto observado en recién nacidos: Disminución de las concentraciones de testosterona y volumen testicular. Efecto observado en prepuberales: Retraso en el inicio de la pubertad.
Rata[2]	Restricción proteica (6% proteína)	P	Efecto observado en prepuberales y adultos: Reducción de número de células de Sertoli y de recuento de espermatozoides, aumento del número de anomalías morfológicas, en animales puberales y adultos.
	50% de la dieta control	P (0 a 110 d)	Efecto observado en recién nacidos: No hubo efecto en Sertoli ni en la expresión de genes apoptóticos en testículos fetales.
Ovino[8]	50% de la dieta control	P (31-100d)	Efecto observado en prepuberales: No tuvo efecto en la pubertad. Efecto observado en adultos: Disminución del número de Sertoli y el diámetro de los túbulos seminíferos.
Ovino[9]	subnutrición	P (70d al parto)	Efecto observado en recién nacidos: Menor número de células de Sertoli y menor volumen de cordones testiculares al nacer.
Rata[6]	50% de la dieta control	P y L	Efecto observado en recién nacidos: Disminución de niveles de FSH en las crías macho en período perinatal sin afectar a las concentraciones de LH y testosterona. Efecto observado en pre-destete y destete Retraso drástico del crecimiento testicular con reducción del área del diámetro y lumen de los túbulos seminíferos en animales recién destetados. Efecto observado en prepuberales: Retraso en el inicio de la pubertad
Rata[1]	Hipoproteica	P y L	Efecto observado en prepuberales: Disminución del diámetro de los túbulos seminíferos, células germinales y células de Sertoli
Rata[5]	Hipoproteica	P y L	Efecto observado en recién nacidos: Retraso en el descenso testicular, reducción de niveles de LH y testosterona, Efecto observado en adultos: Baja tasa de fecundidad con disminución de espermatozoides
Rata[3]	Hipoproteica	L	Efecto observado en pre-destete y destete Aumento de testosterona plasmática y testicular, reducción de estradiol y aromatasa testicular, enzima indicadora de células germinales en recién destetados.
Rata[4]	Hipoproteica e hipocalórica	L	Efecto observado en adultos: Disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos, y en el tamaño y número de células de Sertoli.

[1] Rodríguez-González, 2012; [2] Toledo, 2011; [3]Vilanova Teixeira, 2007; [4] Ramos, 2006; [5] Zambrano, 2005; [6] Leonhardt, 2002; [7] Andrade, 2013; [8] Kotsampasi, 2009; [9] Bielli, 2002; [10] Rae, 2002; [11]Da Silva, 2001.

2.9.5. Posibles moléculas que median los efectos de programación fetal

Por todo lo anteriormente expuesto, los efectos de la subnutrición materna en períodos claves del desarrollo de las crías sobre la reproducción en machos adultos han sido estudiados en varias especies. Sin embargo, los mecanismos subyacentes que generan dichas alteraciones y las vías biológicas moduladoras de los procesos de programación fetal aún no han sido dilucidados. Por lo tanto, surgen las siguientes preguntas:

¿Cuáles son los mecanismos que actúan en la subnutrición materna que afectan al desarrollo del testículo y afectan su estructura y función en la vida adulta?

¿Cuáles son las posibles moléculas que pueden mediar los efectos de la subnutrición materna sobre el testículo?

Entre las moléculas plausibles de mediar cambios se encuentran los **factores de transcripción y factores de crecimiento,** producidos por las células de Sertoli, así como las proteínas de **shock térmico** y proteínas **apoptóticas** antes mencionados en células germinales. Esta hipótesis se sustenta en su importancia descrita previamente en los antecedentes sobre la espermatogénesis, por lo que las hace ser moléculas candidatas para mediar los eventos de programación fetal por su vinculación con el desarrollo de las gónadas, y por ser esenciales en el proceso de espermatogénesis.

3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

En producción animal la subnutrición materna es un factor de programación fetal que determina efectos sobre la reproducción animal. Sin embargo, los mecanismos intrínsecos subyacentes no han sido aún esclarecidos. Por lo tanto, el presente trabajo fue diseñado para evaluar los mecanismos subyacentes en la programación fetal por subnutrición materna. La tesis buscó resolver las siguientes preguntas en torno a la programación por subnutrición materna:

1. ¿Cómo impacta la subnutrición materna en los distintos momentos clave del desarrollo (durante la preñez, lactancia y/o la preñez y lactancia) en la expresión de los factores producidos por las células de Sertoli en el testículo de animales adultos?
    a. Factores de transcripción
    b. Factores hormonales
    c. Proteínas de shock térmico
    d. Factores apoptóticos
2. ¿En qué momento del desarrollo se promueven mayores cambios?
   ¿Cuál es el período ventana del desarrollo que produce mayor impacto a largo plazo en la expresión de los factores de crecimiento testiculares, proteínas de shock térmico y proteínas apoptóticas?

Los resultados de este estudio permitirán concluir cuál es el período más sensible de la programación por subnutrición materna que repercute a nivel reproductivo en la espermatogénesis mediado por los factores de transcripción, factores de crecimiento, así como las proteínas de shock térmico y apoptóticas testiculares.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

La subnutrición materna durante los periodos clave de la preñez y lactancia promueve cambios a largo plazo en los testículos de la descendencia adulta. Estos cambios están mediados por factores de transcripción, factores de crecimiento intra testiculares y repercuten en las proteínas de shock térmico y proteínas apoptóticas que implican alteraciones en la espermatogénesis.

4.2. Objetivos

4.2.1. Objetivo General

Determinar los factores involucrados en los mecanismos subyacentes de la subnutrición materna durante la gestación y lactancia que producen alteraciones a nivel testicular.

4.2.2. Objetivos Específicos

5.2.1 Determinar los efectos de la subnutrición materna, durante los períodos de la preñez, lactancia y en ambos períodos sobre la morfología testicular, así como la frecuencia de estadios del ciclo del epitelio seminífero

5.2.2 Analizar los efectos de la subnutrición materna, durante los períodos de la preñez, lactancia y en ambos períodos, sobre la hormona hipofisaria FSH.

5.2.3 Determinar los efectos de la subnutrición materna, durante los períodos de la preñez, lactancia y en ambos períodos, sobre la producción hormonal de inhibina producida por las células de Sertoli.

5.2.4. Determinar los efectos de la subnutrición materna, durante los períodos de la preñez, lactancia y en ambos períodos sobre los factores de crecimiento como IGF-I, y sus receptores intratesticulares

5.2.5. Determinar los efectos de la subnutrición materna, durante los períodos de la preñez, lactancia y en ambos períodos sobre los factores de transcripción GDNF y ETV5 producidos por la célula de Sertoli

5.2.6. Analizar los efectos de la subnutrición materna, durante los períodos de la preñez, lactancia y en ambos períodos sobre la regulación intratesticular de los

procesos de proliferación a través de la expresión de la proteína Ki-67 vinculada a la proliferación celular.

5.2.7. Determinar los efectos de la subnutrición materna, durante los períodos de la preñez, lactancia y en ambos períodos sobre las proteínas de shock térmico HSP70 y HSP90.

5.2.8. Determinar los efectos de la subnutrición materna sobre la esteroidogénesis testicular, a través de la inmunoexpresión de enzimas esteroidogénicas clave como la enzima 3 Beta hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β-HSD) y el factor de transcripción HSF1.

5.2.9. Analizar los efectos de la subnutrición materna, durante los períodos de la preñez, lactancia y en ambos períodos, sobre la regulación intratesticular de los procesos pro- apoptóticos a través de la expresión de las proteínas de caspasa-3 y Bax y anti-apoptóticos de la proteína Bcl-2.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En los **Anexos 1 (artículo publicado) y 2 (artículo enviado a publicar),** se encuentra la descripción detallada de Materiales y Métodos utilizados.

5.1. Animales y diseño experimental

Se utilizó un modelo de subnutrición materna en ratas, utilizando 4 grupos: 1) grupo control alimentado con dieta estándar, 2) grupo de madres subnutridas durante la gestación (UNP), 3) grupo de madres subnutridas durante la lactación (UNL), 4) grupo de madres subnutridas durante ambos períodos (UNPL). Los animales fueron sacrificados en la edad adulta a los 160 días de edad.

Los trabajos experimentales con animales fueron aprobados bajo las pautas del Comité de Ética Animal de la Universidad de Auckland (R402). En el presente estudio utilizamos un modelo establecido de programación del desarrollo basado en la manipulación de la nutrición materna (Howie et al. 2012). Se utilizaron ratas Wistar hembras (120 días de edad; n = 24) que se obtuvieron de la Unidad Vernon Jansen de la Universidad de Auckland, donde se había desarrollado el modelo animal. Se aparearon en el tiempo utilizando un monitor de ciclo estral (Fine Science Tools, Foster City, CA, EE. UU.) Posteriormente, se alojaron individualmente en jaulas estándar para ratas, con libre acceso al agua, a una temperatura constante de 25 ° C. y un ciclo de luz: oscuridad 12:12 horas.

Las madres gestantes se asignaron al azar a uno de 4 grupos (6 hembras por grupo):

1) grupo CONTROL en el que las madres fueron alimentadas *ad libitum* durante la gestación y la lactancia con una dieta estándar (proteína 18%, grasa 5%; energía digestible 3,4 kcal / g; Dieta Teklad Global 18% Protein, Diet 2018)

2) grupo UNP en el que las hembras fueron alimentadas con el 50% de la ingesta de CONTROL durante la gestación, luego alimentadas *ad libitum* durante la lactancia;

3) grupo UNL en el que las hembras fueron alimentadas *ad libitum* durante la gestación y luego alimentadas con el 50% de la ingesta de CONTROL durante la lactancia.

4) grupo UNPL en el que las madres fueron alimentadas con el 50% de la ingesta de CONTROL durante la gestación y la lactancia y alimentadas *ad libitum* post destete.

5.2. Estrategia de la investigación

La estrategia de la investigación se subdividió en etapas vinculadas a los 2 manuscritos:

5.2.1. Etapa 1: Estudios hormonales de FSH, inhibina, IGF-I, estadios del ciclo espermatogénico, esteroidogénesis y morfometría testicular.

Estudios hormonales sobre la regulación del eje hipofisario-gonadal medición de FSH sérica y estudios hormonales de células de Sertoli: medición de inhibina sérica. Estudios de factores hormonales intra-testiculares IGF-I y los transcriptos de sus receptores en el testículo. Estudios morfométricos e histológicos del testículo: análisis de diámetro de túbulos seminíferos, frecuencia de estadios del ciclo del epitelio seminífero. Estudios de esteroidogénesis mediante análisis de la inmunoexpresión del factor HSF1, y la enzima esteroidogénica 3beta hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β HSD). Estudio de proliferación celular: determinación de tasa proliferativa de células germinales por inmunoexpresión de proteínas de ciclo celular: ki-67

5.2.2. Etapa 2: Estudios de factores de transcripción, proteínas apoptóticas y de shock térmico

Estudios de factores de transcripción intra testiculares mediante inmunohistoquímica para GDNF y ETV5, promotores de proliferación celular en el testículo. Análisis de inmunoexpresión de proteínas de shock térmico (HSP) HSP70 y HSP90. Determinación de proteínas anti apoptóticas por media de Bcl-2. Estudios de proteínas pro-apoptóticas en el testículo: caspasa-3 y Bax.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Resultados y discusión. Presentación de los trabajos

En el desarrollo de la presente Tesis Doctoral en Producción Animal se han realizado 2 publicaciones científicas en revistas arbitradas, una ya publicada y otra enviada a revista y en proceso de revisión. En cada manuscrito se describe en detalle los objetivos planteados, resultados, discusión y las conclusiones de cada estudio realizado. En todos los trabajos incluidos en la presente tesis he participado activamente tanto en el diseño experimental, realización de los experimentos, redacción de los manuscritos publicados, así como en la formación de recursos humanos de 2 tesis de grado vinculadas al factor neurotrófico derivado de células gliales GDNF y a la proteína de shock térmico HSP90. Al igual que los Materiales y Métodos, los resultados y discusión se presentan en los Anexos I y II.

6.1.1. Manuscrito I

En el Anexo 1, se presenta el manuscrito publicado en la revista internacional: *Journal of Developmental Origins of Health and Disease,* abril, 2020

Etapa 1:

1. Resultados y discusión de los efectos de la subnutrición materna sobre aspectos morfológicos del crecimiento del animal, inicio de la pubertad, peso testicular.
2. Resultados y discusión de los efectos de la subnutrición materna sobre las hormonas FSH e inhibina séricas e inmunoexpresión de inhibina testicular.
3. Resultados y discusión de los efectos de la subnutrición materna sobre los factores hormonales intratesticulares IGF-I y sobre los transcriptos de sus receptores en el testículo.
4. Resultados y discusión de los efectos de la subnutrición materna sobre los aspectos morfométricos e histológicos del testículo, frecuencias de estadios del ciclo espermatogénico.

- **Principales resultados del Manuscrito I**

6.1.1.1. Resultados y discusión de los efectos de la subnutrición materna sobre el peso a la pubertad, edad a la pubertad, peso a los 160 días, peso testicular e índice gonadosomático.

Los resultados indican que en los grupos subnutridos la pubertad en animales subnutridos fue anticipada en comparación a los controles. Asimismo, el peso a la pubertad fue menor en los 3 grupos subnutridos y en peso adulto se observó un crecimiento compensatorio (catch up growth) a los 160 día de edad en los grupos UNP y UNL. Sin embargo, los subnutridos durante gestación y lactancia no llegaron a alcanzar a los animales controles (Figura 16).

Se define al crecimiento compensatorio como el proceso por el cual un organismo acelera su tasa de crecimiento después de un periodo de desarrollo restringido, debido a la reducción del consumo de alimento a disminución de los requerimientos energéticos o proteicos. La respuesta de un organismo varía de acuerdo con los factores genéticos y la duración de los factores nutricionales. Los animales subnutridos durante la vida fetal y /o postnatal pueden generar un crecimiento compensatorio por el incremento en el consumo de alimento; que repercute en la ganancia de peso y altera en metabolismo general del animal. Esto se observa en los animales subnutridos en preñez en el aumento de FSH, inhibina séricos e IGF-I testicular.

El crecimiento compensatorio se cuantifica a través de un índice, que es el valor relativo de la diferencia entre el peso al final del periodo de restricción y el peso al final del estudio un valor de 100% indica recuperación total, pero este es escasamente observado, generalmente, el valor de este índice es entre 50 y 100 % (Hornick et al., 2000). En este sentido, los animales subnutridos en la preñez solo o en lactancia solo y con alimentación *ad libitum* pudieron lograr un crecimiento compensatorio. Sin embargo, los animales subnutridos en lactación y preñez no lograron recuperar su peso.

Estudios previos describen el mecanismo de crecimiento compensatorio luego de la subnutrición materna y ligado a la posterior nutrición *ad libitum* post destete (Hazra et al. 2013, Pampanini et al. 2017) y en adultos (Guan et al. 2016). Las reducciones observadas en el peso corporal en la pubertad y en el adulto debido a la subnutrición materna representa un efecto de la restricción de nutrientes con un atraso en el

desarrollo, en el que se genera una adaptación sistémica cambia la expresión del genoma fetal y reduce la división celular tasas de tejidos y órganos tal como mencionan estudios previos (Engelbregt et al. 2000, Cavariani et al. 2019). A los 160 de vida posnatal, los animales cuyas madre fueron subnutridas durante la preñez y lactancia tuvieron el peso corporal más bajo que los controles, lo que demuestra que no lograron alcanzar un crecimiento compensatorio en cuanto al crecimiento corporal cuando la subnutrición se extiende durante ambos periodos tal como mencionan otros autores en estudios de subnutrición materna con bajos niveles de proteínas (Zambrano et al. 2005, Guzmán & Serrano 2006).

En cuanto al índice gonadosamático es menor en los animales cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez, lo que indica una menor inversión en el tejido gonadal en esos animales.

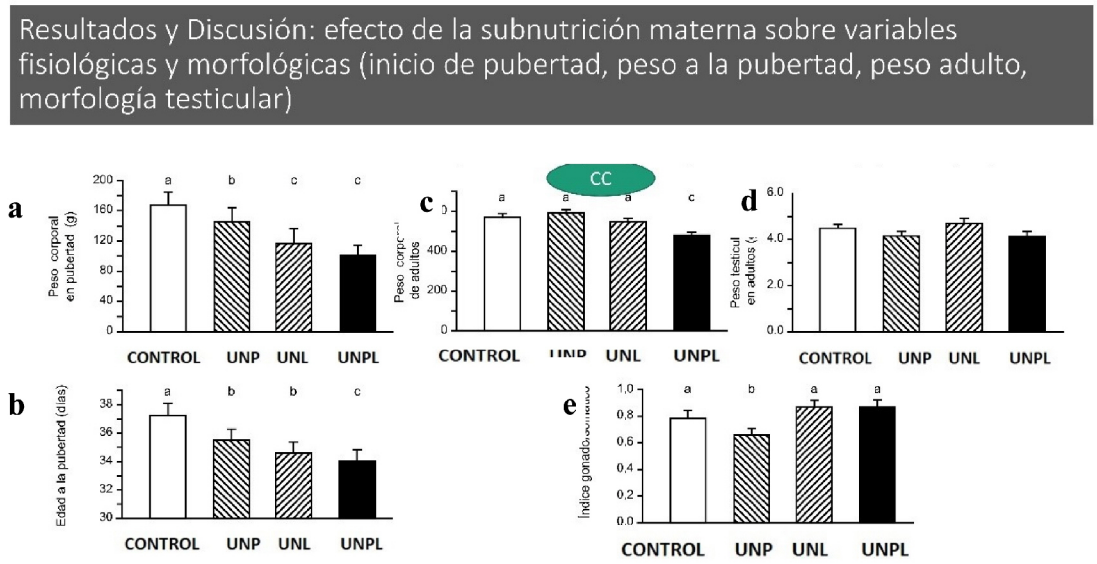


Figura 16. Resultados de morfología peso a la pubertad, edad a la pubertad, peso a los 160 días, peso testicular e índice gonadosomático. La subnutrición materna afectó el peso a la pubertad (a) y el inicio de la separación balano-prepucial, considerada como mediada de inicio de pubertad en el macho fue anterior en los animales cuyas madres fueron subnutridas en todos los periodos, siendo más precoz en los subnutridos en preñez y lactancia (UNPL) (b). El peso de adultos a los 160 días de edad fue menor en los animales del grupo UNPL, no observándose diferencias entre

los subnutridos en preñez (UNP) y lactancia (UNL) en comparación con los animales control (c), en los cuales se observó un crecimiento compensatorio (CC).

Inicio temprano de la pubertad

En cuanto al inicio temprano de la pubertad asociado con el crecimiento compensatorio el rápido aumento de peso aumenta la adiposidad, por lo que aumenta la concentración de IGF-I y provocando resistencia a la insulina, quizás desencadenando el desarrollo puberal temprano al promover la actividad del pulso de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). El vínculo entre la pubertad temprana y el IGF-I es muy fuerte en animales desnutridos - además de determinar la función en testículos, IGF-I regula el inicio de la pubertad a través de acciones a nivel sistema nervioso (Ibáñez et al. 2011, Soliman et al. 2014, Devesa & Caicedo 2019).. En los niños, se ha determinado posibles vínculos entre el inicio de una pubertad temprana y el riesgo de cáncer testicular (Maule et al. 2012). Asimismo, en estudios epidemiológicos, un hallazgo común es una tendencia hacia una menarquia más temprana en aquellos de menor peso al nacer o masa corporal baja (Gluckman & Hanson 2006).

6.1.1.2. Efectos de la subnutrición materna sobre la morfología y espermatogénesis: estadios del ciclo espermatogénico y morfología testicular, diámetro túbulos seminíferos y proliferación de espermatogonias.

Se determinaron cambios en la morfología testicular y en los estadios del ciclo espermatogénico. Los cambios morfométricos registrados fueron en el diámetro de túbulos seminíferos y altura de epitelio seminífero, en el número de células de Sertoli y número de células espermatogonia Ki-67 positivas.

En cuanto a la disminución del diámetro delos túbulos seminíferos registrado en los testículos de animales del grupo UNP y UNPL, nuestros resultados coinciden con estudios previos de animales prepuberales con restricción de proteína materna, donde se observó también una disminución del diámetro de los túbulos seminíferos (Lesage et al. 2002, Horn et al. 2006).

En cuanto a análisis de la proliferación celular de espermatogonias se realizó en función del número de células espermatogonias marcadas positivamente con Ki-67, utilizado como marcador de células en mitosis. La proteína Ki - 67 está caracterizada a nivel molecular y se usa ampliamente como marcador de proliferación como requisito para la progresión a través de la división celular. El número de espermatogonias positivas fue mayor en todos los testículos de animales adultos cuyas madres fueron subnutridas en la preñez y/o lactancia en comparación con los animales del grupo control (Figura 17). Asimismo, se observó que la subnutrición materna aumentó el número de células de Sertoli en todos los grupos subnutridos en comparación con el grupo control.

Estos resultados coinciden con los encontrados en condiciones patológicas como en los tumores testiculares donde se observa un aumento exagerado de células germinales o de células de Sertoli similar a lo registrado en los animales subnutridos durante la preñez, lactancia o ambos períodos (Skakkebaek et al. 2001). Estudios recientes plantean que la capacidad proliferativa de Sertoli en la población de células adultas de Sertoli podría mantenerse en determinadas condiciones, por lo cual podría no diferenciarse terminalmente, sino que podría revertir a una etapa previa de indiferenciación con aumento de su capacidad proliferativa en determinadas circunstancias (Tarulli et al. 2012, Figueiredo et al. 2016).

Por lo tanto, el aumento observado en el número de células de Sertoli podría estar dado por una de-diferenciación de células y retorno a capacidad proliferativa, tal como fue mencionado previamente (Nicholls et al. 2012, Haverfield et al. 2015). Asimismo, el tratamiento térmico induce la re-expresión de la citoqueratina 18 en las células de Sertoli, lo que demuestra que tienen la capacidad de presentar características de un estado inmaduro de Sertoli en respuesta a estímulos nocivos (Tarulli et al. 2012, Guan et al. 2016).

Además, la frecuencia de los estadios del ciclo espermatogénico se vio afectada observando una disminución de los estadios VII y VIII en animales cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez y /o lactancia, en comparación con los animales del grupo control (Figura 17-g). Esta disminución sugiere una alteración en los procesos normales del ciclo espermatogénico donde está establecida la frecuencia de

estadios del ciclo espermatogénico para cada especie incluyendo a la rata (Johnston et al. 2008).

En ratas la mayor frecuencia observada normalmente corresponde al estadio VII, previo a que ocurra la espermiación momento en el cual se produce la liberación de espermatozoides a la luz de los túbulos seminíferos (Hess et al. 1990).

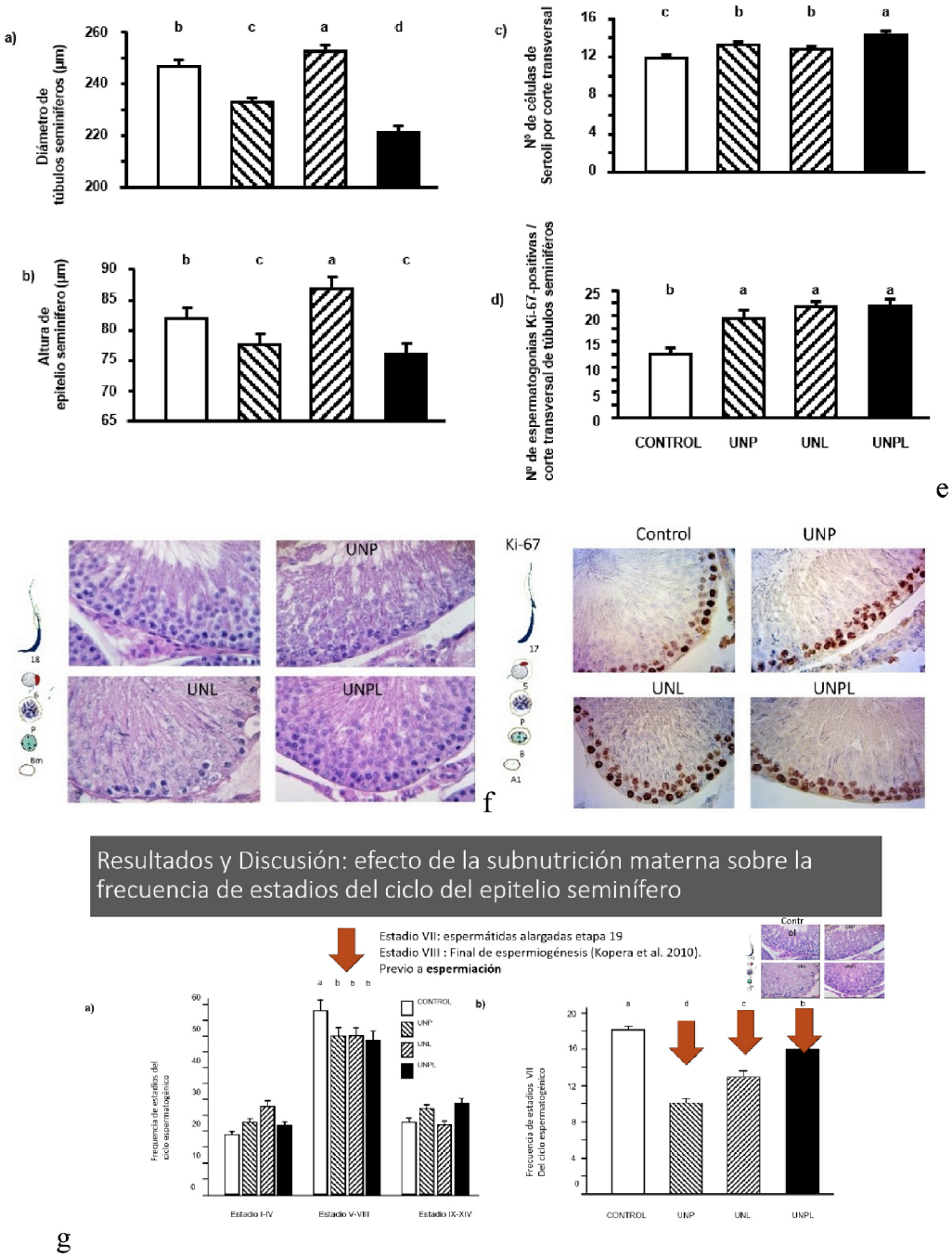


Figura 17. **Efectos de la subnutrición materna durante la preñez y /o lactancia sobre la morfología testicular de ratas en la vida adulta.** a, b, c, d) Gráficos de morfometría testicular incluyendo diámetro de túbulos seminíferos y altura del epitelio seminífero, número de células de Sertoli por corte transversal de túbulo seminífero y

número de espermatogonias en mitosis Ki-67 positivas. Los literales diferentes indican diferencias significativas entre los grupos (P <0,05). e) Imágenes histológicas de testículos con técnica de hematoxilina-eosina en animales cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez (UNP), lactación (UNL) o ambos períodos (UNPL). f) imágenes de inmunohistoquímica contra Ki-67. Se observan cortes del espesor del epitelio seminífero con marcada inmunoexpresión de color marrón con de Ki-67 en los núcleos de las espermatogonias ubicadas en la periferia de los túbulos seminíferos contra la lámina basal. Esquema a la izquierda representa las asociaciones celulares observables en el estadio en que se encuentran los túbulos seminíferos de las imágenes (ver detalles en Figura 8 y 9 en sección antecedentes). g) Frecuencia de estadios agrupados del I al IV, V al VIII, IX al XIV (a), y solo en el estadio VII, donde se observa disminución de la frecuencia de dicho estadio en todos los grupos subnutridos. Diferentes literales sobre las barras indican diferencian significativas, p<0,05.

6.1.1.3. Hormonas FSH e inhibina sérica e inhibina testicular: efecto de la subnutrición materna sobre eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.

La subnutrición materna durante la preñez aumentó la concentración sérica de FSH, de la inmunoexpresión de la inhibina y de inhibina testicular (Figura 18).

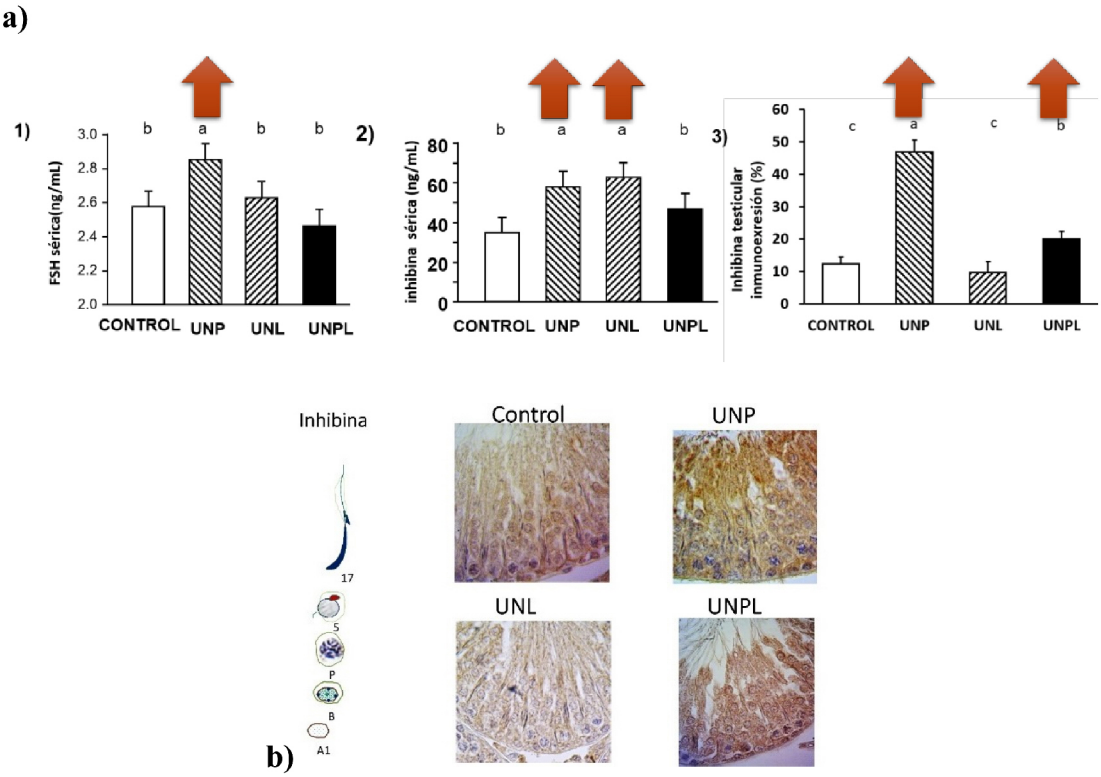


Figura 18. Efectos de la subnutrición materna sobre la concentración sérica de FSH e inhibina y sobre la inmunoexpresión testicular de inhibina. a) gráficos de concentración de FSH (1) e inhibina sérica (2), e inmunoexpresión (3) de inhibina en el testículo de ratas adultas cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez (UNP), lactación (UNL) o ambos períodos (UNPL). b) imágenes representativas del estadio V

del ciclo espermatogénico, donde se observa un aumento en la inmunomarcación testicular de inhibina en los grupos UNP y UNPL. Esquema a la izquierda representa las asociaciones celulares observables en el estadio de los túbulos seminíferos de las imágenes (ver detalles en Figura 8 y 9 en sección antecedentes).

Los resultados indican que la subnutrición materna aumentó la hormona testicular inhibina producida por las células de Sertoli y Leydig. La inhibina es un potente regulador paracrino de la esteroidogénesis ya que modula la LH (de Winter et al. 1992). En la rata la producción de inhibina está a cargo de las células de Sertoli y de Leydig y está regulada por las células germinales (Risbridger et al. 1989, Pineau et al. 1990, Risbridger 1996, Noguchi et al. 1997b). Además de la acción reguladora de la FSH también regula la LH, inhibiendo su producción. Sin embargo, en animales cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez y lactancia la inhibina está aumentada sugiriendo una repercusión en la esteroidogénesis, así como en el microambiente testicular. Además, la inhibina es conocida como un marcador clave de la actividad en tumores de células de Sertoli y de Leydig (Iczkowski et al. 1998). En estudios previos se determinó la reducción a la sensibilidad a la inhibina en células gonadotropas por anti-betaglicanos (Lewis et al. 2000, Wiater et al. 2009).

6.1.1.4. Enzima 3B- HSD y Factor de transcripción HSF-1: efectos de la subnutrición en la regulación de la esteroidogénesis

La subnutrición materna aumentó la inmunoexpresión de la enzima esteroidogénica 3β-HSD en los testículos de su progenie en la vida adulta (Figura 19). Esto sugiere que la subnutrición genera un efecto a largo plazo en una de las enzimas vinculadas a la síntesis de hormonas esteroideas testiculares, como la testosterona y también en la producción de estrógenos producidos por las células de Sertoli.

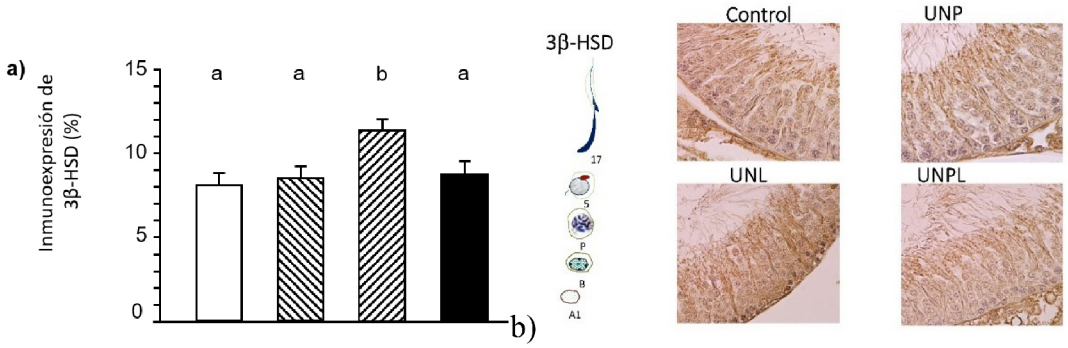


Figura 19. Efectos de la subnutrición materna sobre la inmunoexpresión testicular de 3β-HSD. a) gráfica de área inmunomarcada. Diferentes literales indican diferencias significativas entre grupos, $p< 0,05$. b) Se observan cortes transversales de túbulos seminíferos con sectores del epitelio seminífero. Se evidencia una mayor inmunoexpresión de la enzima esteroidogénica en los animales del grupo UNL en el estadio V. Imágenes de testículos de ratas adultas cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez (UNP), lactación (UNL) o ambos períodos (UNPL). Esquema a la izquierda representa las asociaciones celulares observables en el estadio en que se encuentran los túbulos seminíferos de las imágenes (ver detalles en Figura 8 y 9 en sección antecedentes).

Esteroidogénesis testicular

La producción de andrógenos está determinada por enzimas esteroideas presentes en el retículo endoplásmico liso y en las mitocondrias de las células de Leydig, como la enzima 3 beta hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) (Geslin & Auperin 2004), así como factores que mantienen el transporte de colesterol, como es el factor de transcripción HSF-1 (Oka et al. 2017).

La subnutrición materna durante la lactación aumentó tanto la inmunoexpresión de la enzima esteroidogénica 3 beta HSD y el factor de transcripción HSF1 en los testículos de ratas adultas (Figura 20).

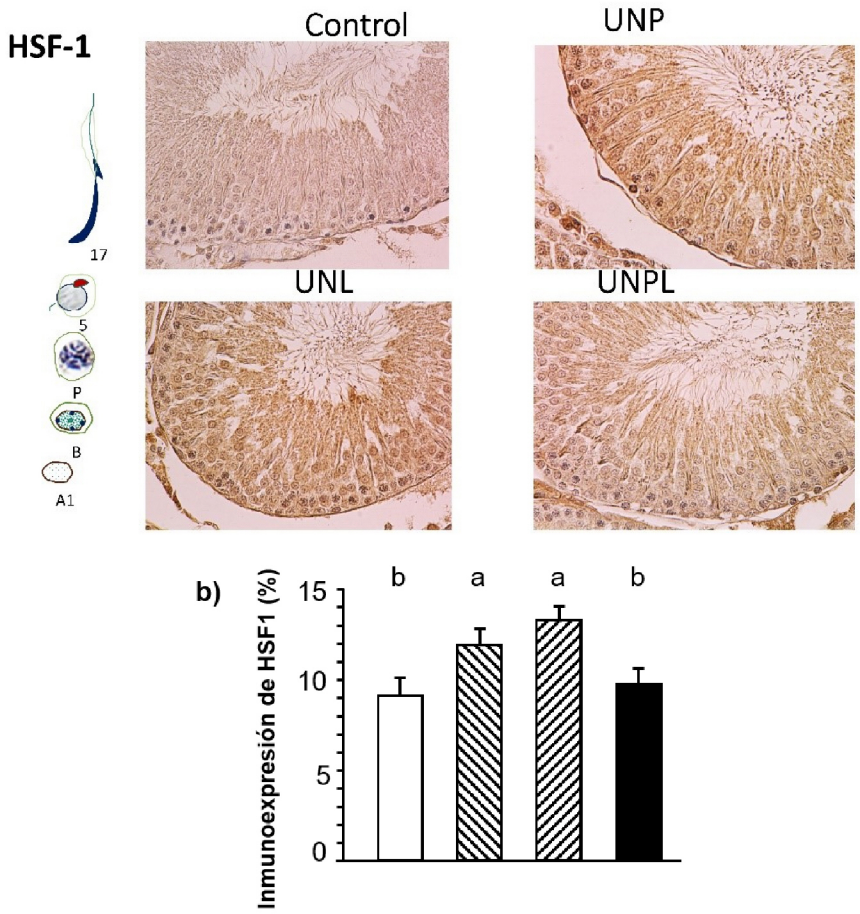


Figura 20. Efectos de la subnutrición materna durante la preñez y /o lactancia sobre la inmunoexpresión testicular del factor de transcripción HSF1 en testículos de ratas de la progenie en la vida adulta. a) Imágenes de inmunohistoquímica de testículos de ratas adultas cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez (UNP), lactación (UNL) o ambos períodos (UNPL). Se observan sectores del epitelio seminífero con una mayor inmunoexpresión en las células de Sertoli de los animales de los grupos UNP y UNL en el estadio V. b) cuantificación del área inmunomarcada de HSF1 en testículos de ratas adultas. los literales diferentes indican diferencias significativas entre los grupos (P <0,05).

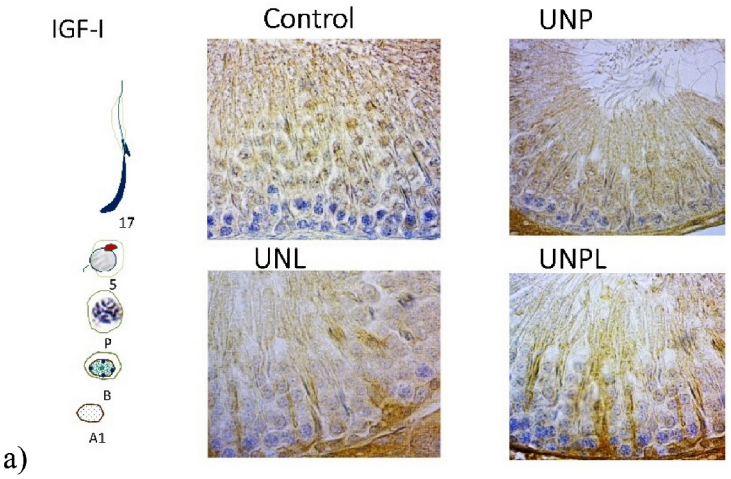
Estos resultados coinciden con los reportados en experimentos de subnutrición materna donde aumenta la enzima esteroidogénica StAR en fetos y aumenta la testosterona (Rae et al. 2002, Chadio et al. 2016). El aumento de HSF1 también se ha visto en condiciones de estrés por calor crónico para protección de espermatogonias (Salmand et al. 2008) y en células germinales femeninas (Furukawa et al. 2019). Por otra parte, el HSF1 presenta un rol apoptótico, regulando la calidad de espermatocitos durante la meiosis (Izu et al. 2004).

6.1.1.5. subnutrición materna efectos sobre el factor de crecimiento IGF-I testicular.

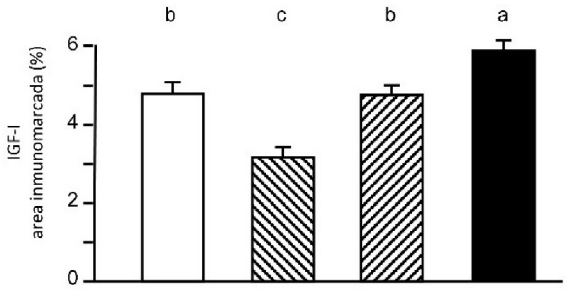
La subnutrición materna durante la preñez y lactancia aumentó la inmunoexpresión del factor IGF-I en los testículos de ratas adultas (Figura 21). En los animales cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez y lactancia se observó un aumento de la inmunoexpresión de IGF-I en las células de Sertoli. Sin embargo, la inmunoexpresión de IGF-I en animales con madres subnutridas sólo durante la preñez fue menor.

Por otra parte, disminuyeron los transcriptos de receptores a IGF-I en los testículos de los grupos subnutridos de lactancia y en preñez y lactancia. El aumento de IGF-I en los animales del grupo UNPL y disminución de sus receptores sugiere una insensibilización del testículo a la hormona, similar a lo que ocurre en la resistencia insulínica, condición con una señalización deficiente de la insulina causada por mutaciones o modificaciones postraduccionales de su receptor o de moléculas efectoras (Gutiérrez-Rodelo et al. 2017). Asimismo, en estudios previos la subnutrición proteica se asoció con una combinación de resistencia a la hormona de crecimiento GH e IGF-I (Fazeli & Klibanski 2014). También se ha determinado resistencia a IGF-I en niños, caracterizada por niveles de IGF-I normales o elevados y retraso del crecimiento (Jain et al. 1998).

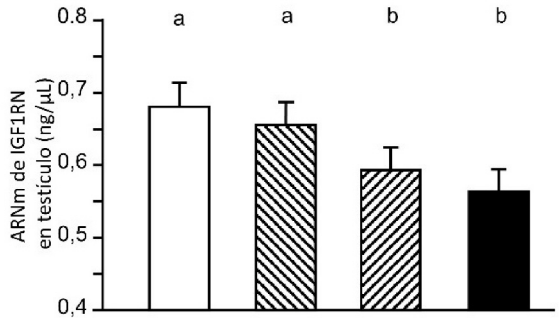
Por otra parte, en estudios previos en ratones knock out del gen *Igf1r* que codifica para los receptores de IGF1R se determinó alteración de la espermatogénesis y disminución del número de células de Leydig (Baker 1993). Además, el IGF-I tiene un rol importante en la regulación de la proliferación, maduración y determinación del pool de células de Sertoli maduras (Pitetti et al. 2013), por lo cual se sugiere que la subnutrición materna altera el sistema IGF-I-IGFR1 en el testículo que repercute dando como consecuencia alteraciones morfológicas y morfométricas observadas en el presente estudio.



a)



b)



c)

Figura 21. Efectos de la subnutrición materna durante la preñez y /o lactancia sobre la inmunoexpresión testicular del factor de crecimiento similar a insulina IGF-I en testículos de ratas de la progenie en la vida adulta. a) Imágenes de inmunohistoquímica de testículos de ratas adultas cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez (UNP), lactación (UNL) o ambos períodos (UNPL). Se observa epitelio seminífero con una marcada inmunoexpresión en los citoplasmas de las células de Sertoli de los testículos animales en el grupo UNPL en el estadio V. Esquema a la izquierda representa las asociaciones celulares observables en el estadio en que se encuentran los túbulos seminíferos de las imágenes (ver detalles en Figura 8 y 9 en sección antecedentes). b) cuantificación del área inmunomarcada de IGF-I en los testículos de ratas adultas. los literales diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$).c) cuantificación de los transcriptos receptores a IGF-I a nivel testicular.

6.1.2. Manuscrito II

En el Anexo II, se presenta el artículo enviado a la *revista Reproduction, Fertility and Development* para su evaluación. En dicho artículo los resultados hacen referencia a Etapa 2:

- Factores de transcripción
- Proteínas apoptóticas
- Proteínas de shock térmico
- Proteínas anti-apoptóticas

Principales resultados del Manuscrito II

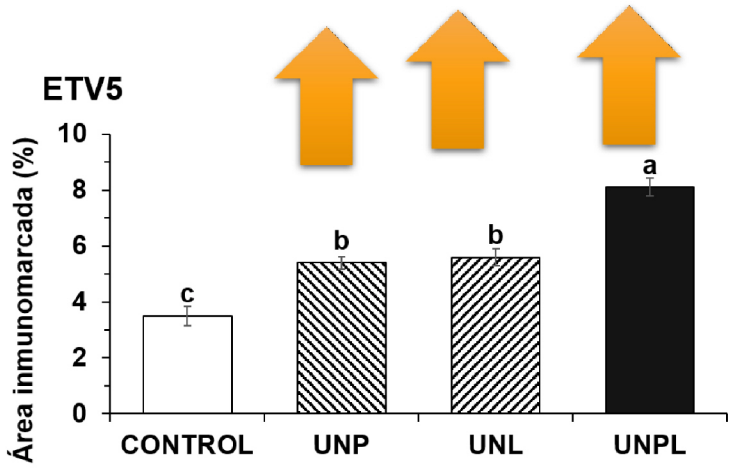
6.1.2.1. Aumento ETV5 y GDNF: Efecto de la subnutrición materna sobre los principales factores de transcripción en el testículo

La inmunoexpresión del factor de transcripción ETV5 en el testículo de ratas adultas fue mayor en todos los grupos cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez y/o lactancia (Figura 22). El factor de transcripción ETV5 es esencial para la renovación de SSC y se expresó tanto en células de Sertoli y células germinales, tal como menciona estudios previos (Tyagi et al. 2009; Simon et al. 2010).

En los ratones knock out del gen *Etv5 (Etv5-/-)* ocurre la primera onda de espermatogénesis, pero todas las SSC se pierden durante este tiempo, causando un fenotipo de solo células de Sertoli y azoospermia en adultos (Schlesser et al. 2008). Por lo tanto, la subnutrición materna produce el aumento de ETV5 sugiere un posible un aumento de la proliferación de espermatogonias, lo que coincide con el mayor número de espermatogonias en proliferación observadas en nuestros resultados.

Por el contrario, la pérdida de ETV5 parece dañar la capacidad de las células de Sertoli para sustentar a las espermatogonias, posiblemente por una disminución de los niveles de claudina-5 (CLDN5) en ratones knock out, lo que afecta la función de la barrera hemato-testicular (Tyagi et al. 2009).

a)



b)

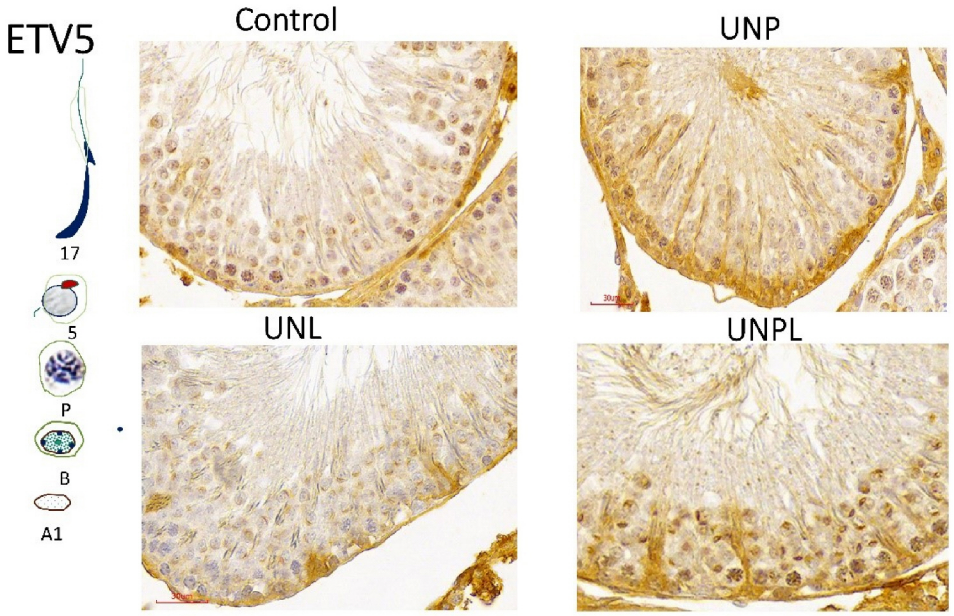


Figura 22. Efecto de la subnutrición materna sobre la inmunoexpresión del factor de transcripción ETV5. a) Gráfica de inmunoexpresión de ETV5 en el testículo de ratas adultas subnutridas en preñez (UNP) y en preñez y lactancia (UNPL). se observa una mayor inmunoexpresión de ETV5 en todos los grupos subnutridos. Diferentes literales indican diferencias significativas entre grupos, $p< 0,05$. b) Se observa intensa coloración marrón en células germinales en testículos de animales subnutridos. Asimismo, el ETV5 se localizó en Sertoli y en espermátidas redondas en región del acrosoma, con mayor inmunoexpresión en los grupos subnutridos en todos los períodos (UNP, UNL: subnutridos en lactación, UNPL). En UNP se observa intensa inmunoexpresión en espermatogonias y Sertoli. Esquema a la izquierda representa las asociaciones celulares observables en el estadio en que se encuentran los túbulos seminíferos de las imágenes (ver detalles en Figura 8 y 9 en sección antecedentes).

De la misma forma, en los testículos de ratas adultas la inmunoexpresión del factor de transcripción GDNF el testículo de ratas adultas fue mayor en todos los grupos cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez y/o lactancia. La inmunoexpresión de GDNF fue mayor en las espermátidas elongadas tanto a nivel nuclear como citoplasmática, y a nivel citoplasmático en espermatocitos y espermatogonias de los animales subnutridos (Figura 23).

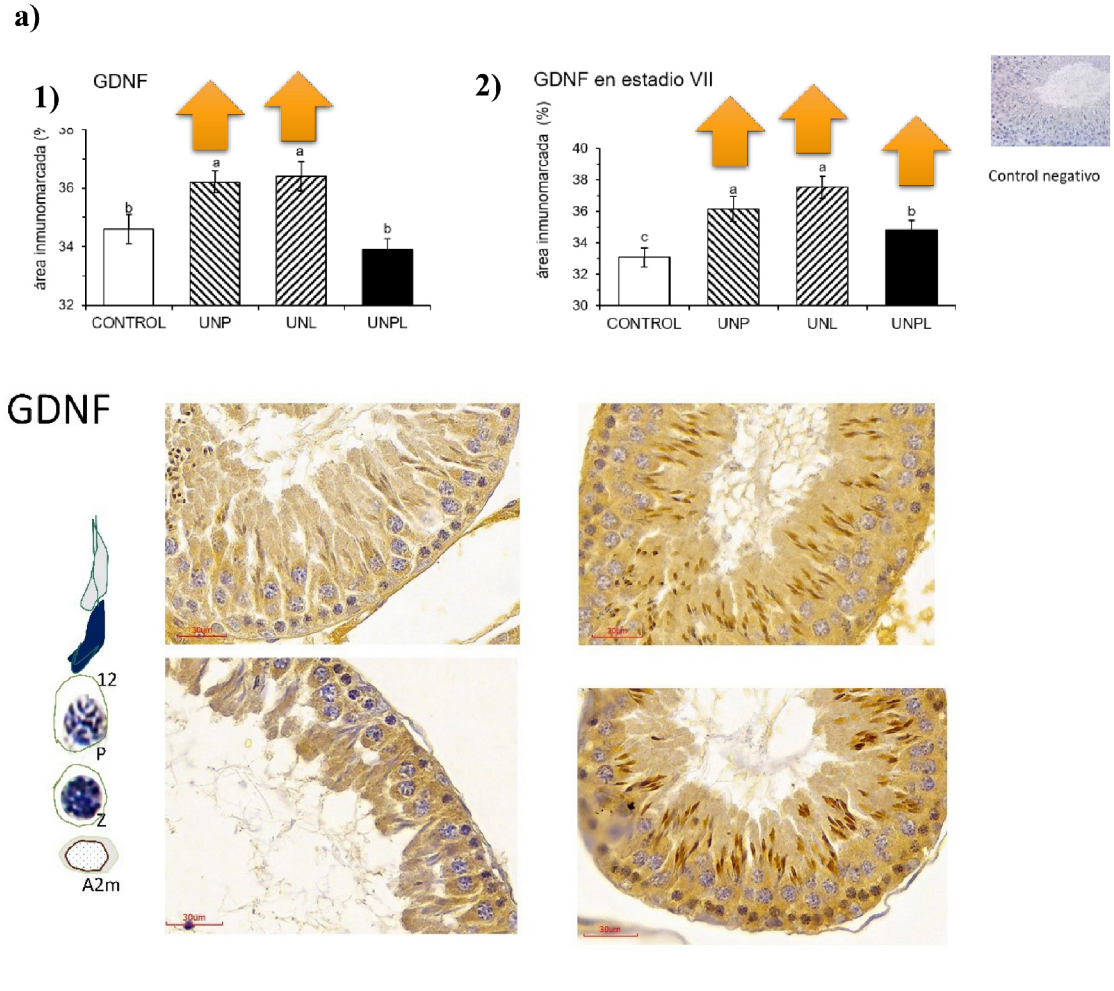
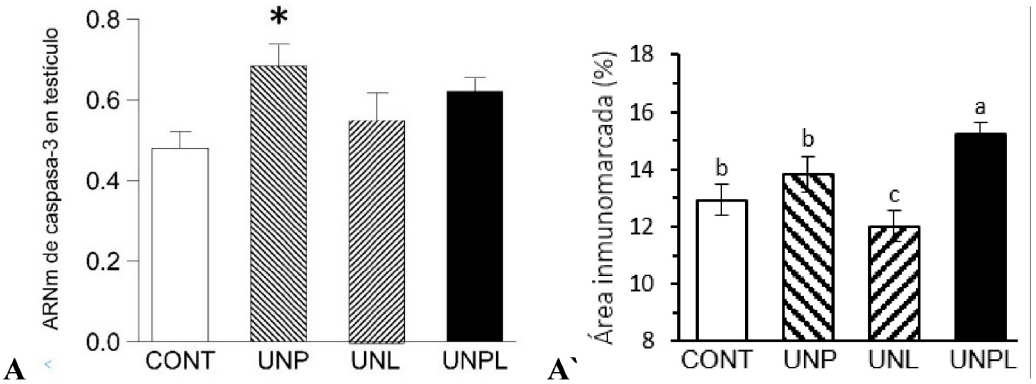


Figura 23. Efecto de la subnutrición materna sobre la inmunoexpresión del factor de transcripción GDNF. a) 1) Gráfica de inmunoexpresión de GDNF en testículo en ratas adultas subnutridas durante la preñez (UNP), lactancia (UNL) o ambos períodos (UNPL) en comparación con dietas control (CONTROL). a) 2) gráfica de inmunoexpresión de GDNF en estadio VII. Diferentes literales indican diferencias significativas entre grupos, $p< 0,05$. Se observa intensa coloración marrón en células germinales en testículos de animales subnutridos en comparación con los animales control. El GDNF se localizó intensamente en espermátidas elongadas en región nuclear con mayor inmunoexpresión en los grupos subnutridos en todos los períodos (UNP y UNPL). En el grupo UNL se localizó intensamente en los citoplasmas de los espermatocitos en paquiteno y en leptocigoteno, así como en citoplasma de espermátidas elongadas. Esquema a la izquierda representa las asociaciones celulares

observables en el estadio en que se encuentran los túbulos seminíferos de las imágenes (ver detalles en Figura 8 y 9 en sección antecedentes).

6.1.2.2. Aumento de caspasa-3 y Bax: Efecto de la subnutrición materna sobre la expresión de proteínas apoptóticas en el testículo de crías adultas

La subnutrición materna afectó la expresión de la caspasa-3 detectando un aumento de los transcriptos de caspasa-3 en el testículo de ratas macho adultas cuyas madres fueron subnutridas en la preñez. Sin embargo, la inmunoexpresión de caspasa-3 activada fue mayor en los testículos de los animales cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez y la lactancia, diferencia que puede ser atribuida a la activación de la caspasa-3 estimulada por otros mecanismos intra testiculares (Figura 24).



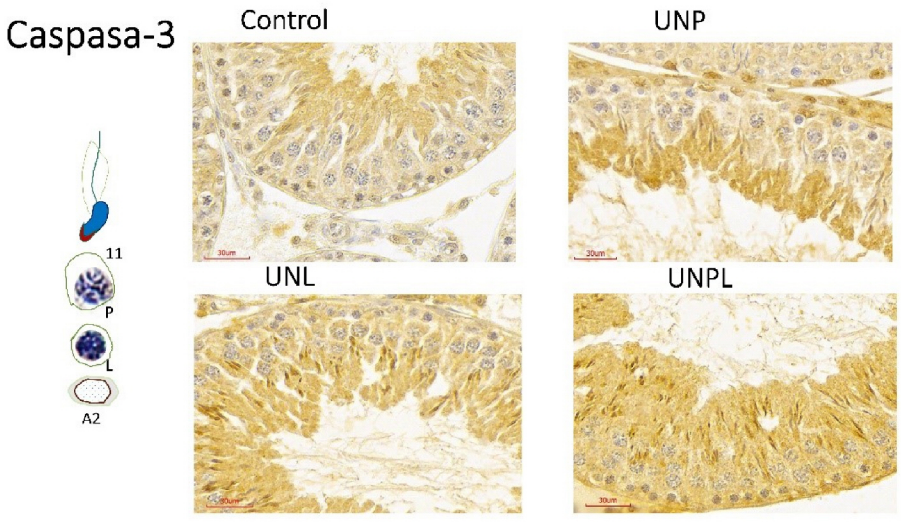


Figura 24. Efecto de la subnutrición sobre ARNm de caspasa-3 y la inmunoexpresión de caspasa-3 activa en testículo de ratas adultas. A) Gráfico de cuantificación de transcriptos de casapa-3 en testículo. Diferentes literales sobre barras indican diferencias significativas, $p<0,05$. Se observa mayor cantidad de trascriptos de caspasa-3 en testículos de animales subnutridos en preñez (UNP). A`) gráfico de

inmunomarcación de caspasa-3 activa en testículos de ratas. Se observa mayor área inmunomarcada de casapasa-3 activa en animales subnutridos en preñez y lactancia (UNPL) y menor área inmunomarcada en subnutridos en lactación (UNL). Diferentes literales indican diferencias significativas entre grupos, p< 0,05. B) Se observa intensa inmunomarcación en UNPL. En el estadio 11 se observa intensa inmunomarcación en espermátidas elongadas en los grupos subnutridos, tanto a nivel nuclear como citoplasmático. Esquema a la izquierda representa las asociaciones celulares observables en el estadio en que se encuentran los túbulos seminíferos de las imágenes (ver detalles sobre estadios del ciclo espermatogénico en Figura 8 y 9 en sección antecedentes).

En cuanto a la expresión de transcriptos de Bax no hubo diferencias entre grupos (Figura 25.a). Sin embargo, se observó un aumento en la inmunoexpresión de la proteína Bax en los testículos de animales adultos cuyas madres fueron subnutridas durante la lactación (Figura 25.b) En cuanto a la distribución y localización d3e Bax se observó en células de Sertoli y en células germinales espermatogonias (Figura 25.c).

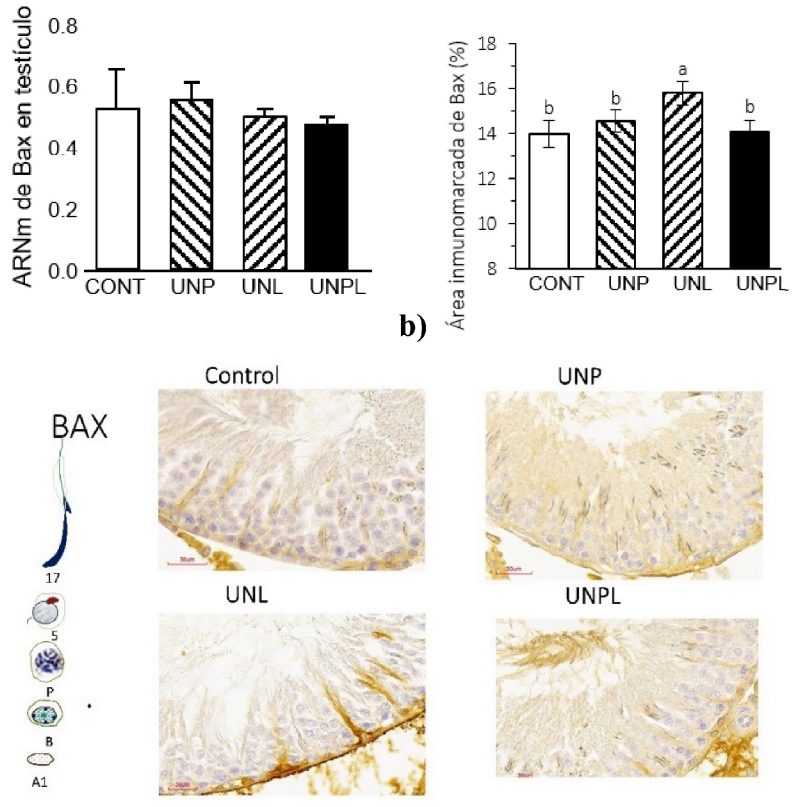


Figura 25. Efecto de la subnutrición materna sobre los transcriptos de Bax y la inmunoexpresión de Bax en el testículo de ratas adultas. a) ARNm de Bax, b) área inmunomarcada de Bax, Se observa una mayor inmunoexpresión de Bax en el grupo de animales subnutridos en lactación (UNL). Diferentes literales indican diferencias significativas entre grupos, p< 0,05. c) inmunolocalización de Bax en células testiculares. Se observa intensa inmunomarcación de Bax en el citoplasma de las células de Sertoli en el grupo UNL, así como se observa intensa inmunomarcación en

espermatogonias. Imágenes histológicas de testículos de animales cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez (UNP), lactación (UNL) o ambos períodos (UNPL). Esquema a la izquierda representa las asociaciones celulares observables en el estadio de los túbulos seminíferos de las imágenes (ver Figura 8 y 9 en sección antecedentes).

6.1.2.3. Aumento de HSP70 y disminución de HSP90: Efecto de la subnutrición materna sobre la expresión e inmunoexpresión de proteínas de shock térmico

Proteína de shock térmico HSP70 en el testículo de ratas adultas subnutridas

La subnutrición materna durante la preñez y/o lactancia determinó un aumento de la inmunoexpresión de HSP70 en testículos de ratas adultas. La inmunoexpresión de HSP70 se observó en espermátidas elongadas tanto a nivel citoplasmático como nuclear, así como en espermatocitos y espermatogonias.

Estudios previos determinaron que el aumento en la expresión de HSP70 es un mecanismo de protección contra la apoptosis en los espermatozoides en hombres infértiles (Erata et al. 2008).

Por lo tanto, la subnutrición aumentó la inmunoexpresión testicular de la proteína de shock térmico HSP70 implicada en la espermiogénesis como en los procesos de reparación de proteínas.

Las HSP70 está vinculada a procesos de plegamiento de proteínas, así como aumentan frente a condiciones de estrés celular, por lo que su aumento sugiere un mecanismo del testículo de enfrentar a largo plazo los efectos de la subnutrición como forma de compensar el daño en las células testiculares (Figura 26).

Asimismo, el aumento de HSP70 se ha reportado como factor que inhibe la apoptosis y evita la activación de caspasas al unirse a Apaf1 y bloquear la activación enzimática (Purandhar et al. 2014). Por lo tanto, la subnutrición materna activa una de las proteínas que bloquea la apoptosis, coincidiendo con nuestros datos de aumento de Bcl-2 observado en todos los animales subnutridos.

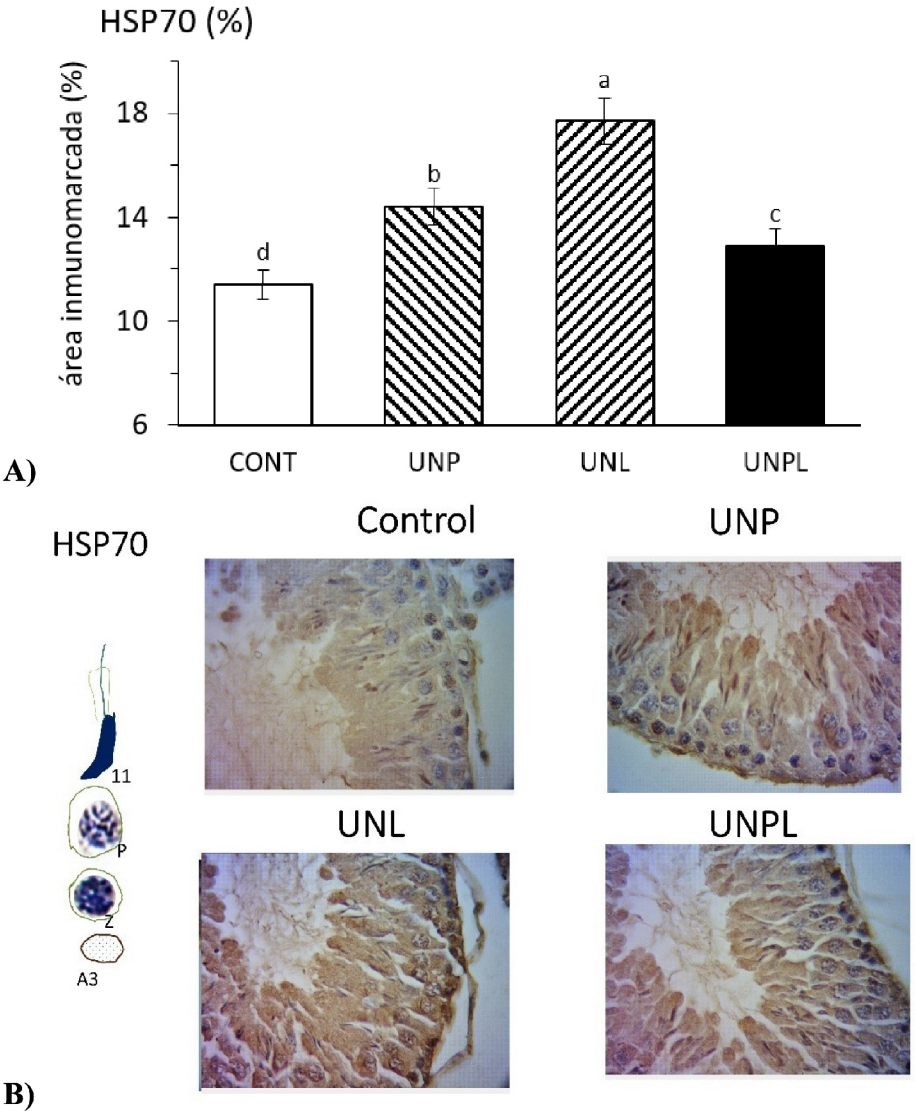
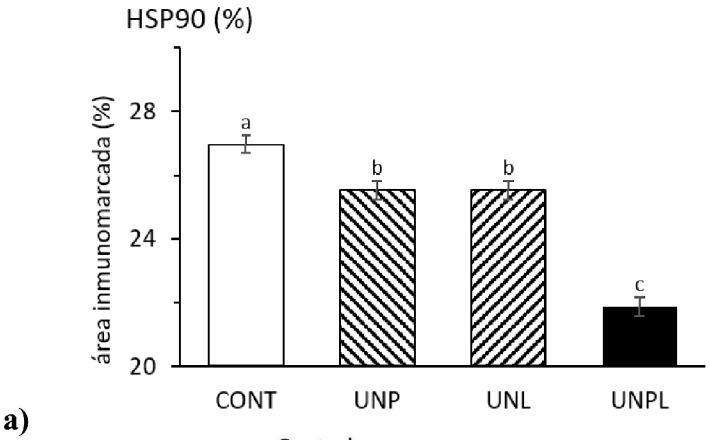


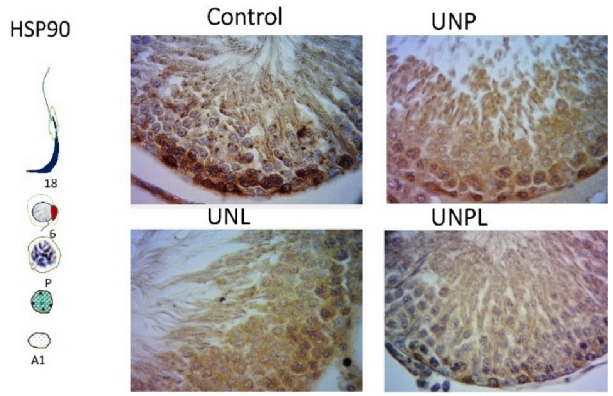
Figura 26. Efecto de la subnutrición materna durante la preñez y/o lactancia sobre la inmunoexpresión de la proteína de shock térmico HSP70 en el testículo de sus crías adultas. A) Gráfico de inmunoexpresión de HSP70 en el testículo de ratas. Se observa mayor inmunoexpresión en todos los grupos subnutridos. Diferentes literales indican diferencias significativas entre grupos, $p< 0,05$. B) Imágenes histológicas de testículo de rata donde se observa a mayor aumento la pared de túbulos seminíferos de animales de los grupos subnutridos en preñez (UNP), en lactancia (UNL) o en ambos períodos (UNPL) y del grupo control (CONT). Se observa de color marrón la inmunoexpresión de la proteína HSP70 en las espermátidas elongadas, a nivel nuclear y citoplasmático, y en el citoplasma de espermatocitos paquiténicos en cortes transversales de túbulos seminíferos en estadio XI del ciclo del epitelio seminífero. El esquema a la izquierda representa las asociaciones celulares observables en el estadio en que se encuentran los túbulos seminíferos de las imágenes (ver detalles en Figura 8 y 9 en sección antecedentes).

Proteína de shock térmico HSP90 en el testículo de ratas adultas subnutridas

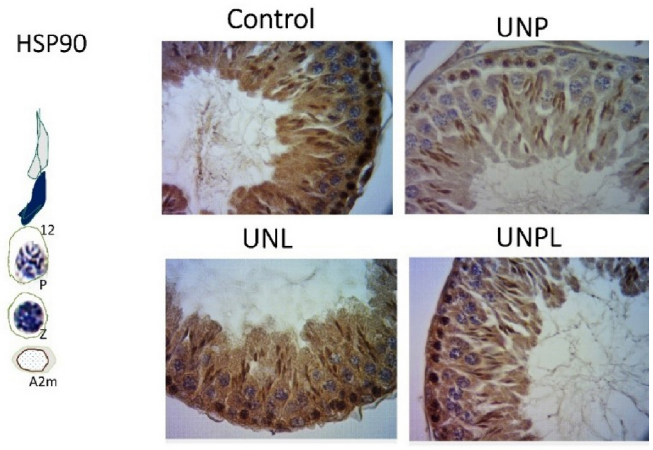
En cuanto a la inmunoexpresión de la proteína de shock térmico HSP90 se expresa en células germinales madre espermatogonias en animales control en estadio VI (Figura 26). Sin embargo, en animales cuyas madres fueron subnutridas en la preñez y/o lactancia la inmunoexpresión de HSP90 disminuyó.



a)



b)



c)

Figura 27. Efecto de la subnutrición materna durante la preñez y/o lactancia sobre la inmunoexpresión de la proteína de shock térmico HSP90 en el testículo de sus crías adultas. a) Gráfico de inmunoexpresión de HSP90 en testículo de ratas. Se observa menor inmunoexpresión en todos los grupos subnutridos. Diferentes literales indican diferencias significativas entre grupos, $p< 0,05$. b) imágenes de

inmunohistoquímica de testículo con observando túbulo seminífero en estadio 6 y c) estadio XII del ciclo espermatogénico. Esquema a la izquierda representa las asociaciones celulares observables en el estadio en que se encuentran los túbulos seminíferos de las imágenes (ver detalles del ciclo del epitelio seminífero en Figura 8 y 9 en sección antecedentes).

Inmunoexpresión de la proteína HSP90 en el estadio 6 del ciclo espermatogénico

En las imágenes histológicas representativas de testículo de rata control para la proteína de shock térmico HSP90 se observa una intensamente la inmunomarcación en las células madre espermatogonias en la región más basal del túbulo seminífero.

Esta inmunomarcación intensa en las células madre espermatogonia en testículos de animales control es una señal indicativa de protección de dichas células (Figura 27 a).

En las espermátidas redondas en los animales control la inmunoexpresión de la proteína HSP90 también fue intensa en la región del acrosoma en el estadio VI del ciclo espermatogénico, lo que sugiere una importancia en la formación del acrosoma y las enzimas que se incluyen en dicha estructura como parte esencial del proceso de espermiogénesis. Sin embargo, en los animales subnutridos, no se observa la inmunomarcación de HSP90 en espermátidas redondas en el mismo estadio VI.

En cuanto a los espermatocitos en estadio 6 se observa inmunomarcación a nivel citoplasmático tanto en espermatocitos paquiténicos en UNP y UNL (Figura 27 a).

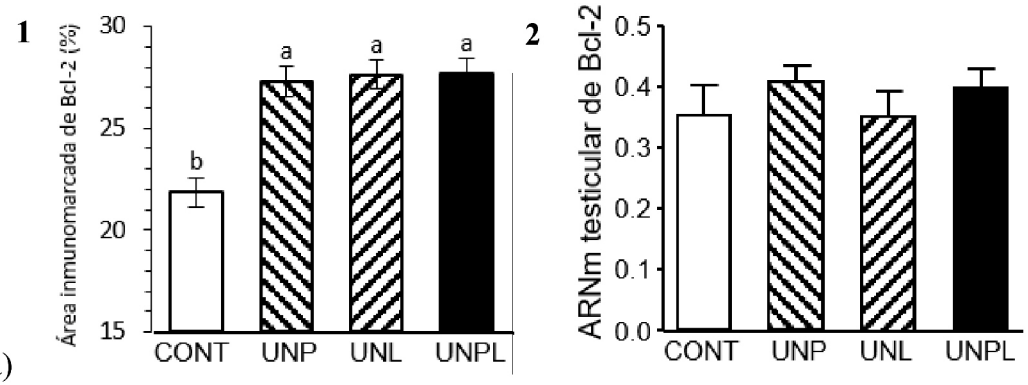
En el estadio XII se observan en los controles intensa inmunomarcación en espermatogonias, en espermatocitos y espermátidas elongadas.

Estudios previos demostraron que la proteína de shock térmico HSP90 está vinculada a la estabilización y activación de quinasas post-meióticas (Jha et al. 2013). Por lo tanto, la subnutrición materna disminuyó una proteína vinculada a la espermiogénesis, por lo cual su desarrollo post meiótico está comprometido. Esto coincide con la disminución en la frecuencia de los túbulos con estadios VII y VIII, etapas claves de la espermiogénesis. Asimismo, se ha visto en ratones knock out para el gen *Hsp90* los testículos desarrollan espermatozoides con globozoospermia, espermatozoides con cabeza redondeada que carecen de acrosoma y que presentan una membrana nuclear aberrante y defectos en la pieza intermedia y un acrosoma defectuoso (Sagare-Patil et al. 2017).

6.1.2.4. Aumento de Bcl-2: Resultados de la inmunoexpresión de factor anti-apoptótico en células testiculares.

Se determinó un aumento en la inmunoexpresión de la proteína Bcl-2 en todos los grupos subnutridos. La inmunoexpresión se localizó en las células germinales y en Sertoli. En los grupos subnutridos se observó intensa inmunoexpresión en acrosoma y citoplasma de los grupos UNL y UNPL (Figura 28).

a)



b)

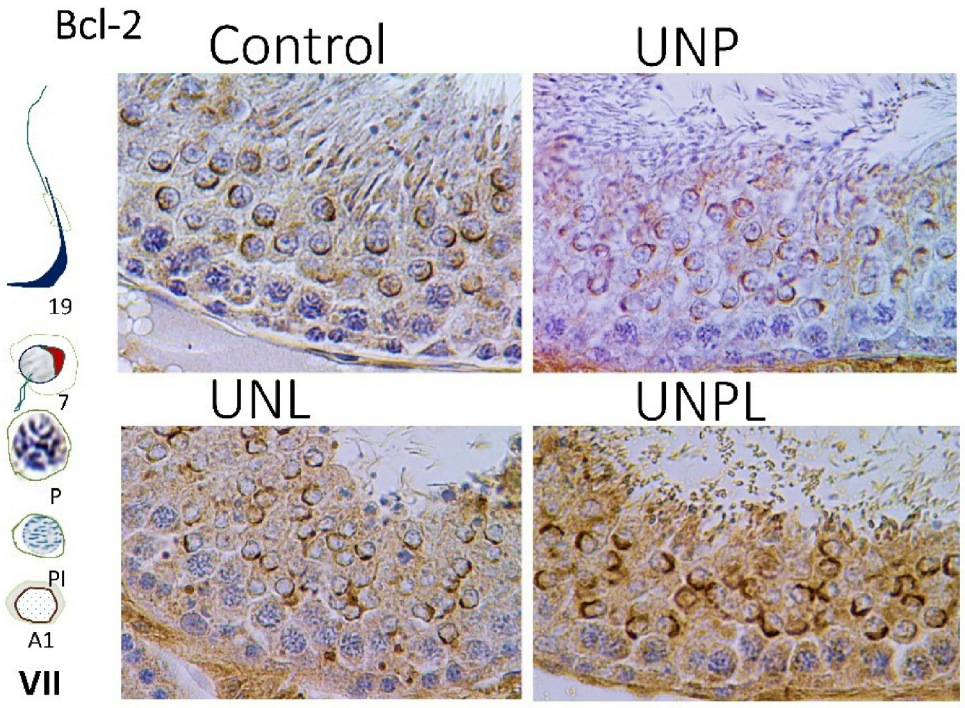


Figura 28. Efecto de la subnutrición maternal sobre la expresión de trasncriptos de Bcl-2 e inmunoexpresión de Bcl-2 en testículo de ratas adultas. a) 1) Gráfica de inmunoexprsión de Bcl-2, 2) gráfico de cuantificación de transcriptos ARNm de Bcl-2. Diferentes literales indican diferencias significativas entre grupos, $p< 0,05$. b) imágenes de inmunohistoquímica en epitelio seminífero de testículo de ratas subnuntridas durante la preñez (UNP), durante la lactancia (UNL) , ambos períodos (UNPL), o grupo control con dieta estándar (CONT). Se observan túbulos en estadio VII con espermáticas redondas (etapa 7) y espermátidas elongadas (etapa 19) en la

región más cercana a la luz de los túbulos seminíferos. La inmunoexpresión de Bcl-2 se localiza en la región del acrosoma en todos los grupos, con un aumento en los subnutridos donde se localiza además en los citoplasmas de espermatocitos paquiténicos y de espermátidas redondas. Esquema a la izquierda representa las asociaciones celulares observables en el estadio en que se encuentran los túbulos seminíferos de las imágenes (ver detalles en Figura 8 y 9 en sección antecedentes).

La inmunoexpresión aumentada de Bcl-2, una proteína anti-apoptótica, sugiere un aumento de los mecanismos de control para evitar la muerte celular, y promover la proliferación de células. Asimismo, la actividad de Bcl-2 aumentada en los grupos subnutridos es indicativa de un mecanismo intrínseco testicular de control de sus poblaciones celulares en contra de la subnutrición. Estudios previos indican que la sobreexpresión en espermatogonias de Bcl-2 produce acumulación de células germinales pre-meióticas de forma anormal durante la primera onda espermatogénica, de manera similar a lo que sucede en animales que carecen de Bax, alterando el desarrollo de la espermatogénesis en adultos (Meehan et al. 2001). En todos los grupos subnutridos la inmunoexpresión de Bcl-2 fue más intensa fue intensa en células espermatogonias, no observándose en los animales del grupo control (Figura 298).

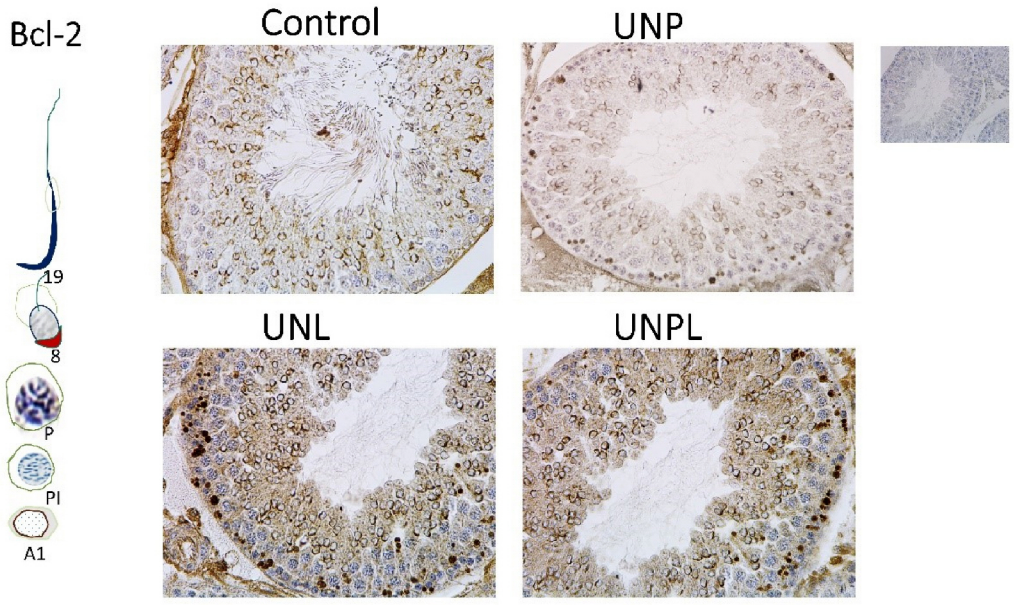


Figura 29. Efecto de la subnutrición materna sobre la inmunoexpresión de Bcl-2 en túbulos seminíferos de testículo adulto de en estadio VIII. En la región basal del túbulo la inmunoexpresión de Bcl-2 se localiza intensamente en células espermatogonias en todos los grupos subnutridos y no se observa en animales del grupo control. En las espermátidas elongadas en etapa 8, en los grupos subnutridos UNL y UNPL se localiza además en los citoplasmas. UNP: grupo subnutrido durante la preñez, UNL: grupo subnutrido durante la lactancia, UNPL: grupo subnutrido en ambos períodos, Control: grupo control con dieta estándar. Se observan túbulos en

estadio VIII con espermatozoides en espermiación en la luz y espermátidas en etapa 19 en la región más cercana a la luz de los túbulos seminíferos. Esquema a la izquierda representa las asociaciones celulares observables en el estadio en que se encuentran los túbulos seminíferos de las imágenes (ver detalles en Figura 8 y 9 en sección antecedentes).

6.2. DISCUSIÓN GENERAL

Los estudios realizados en la presente tesis evidencian algunos de los mecanismos que están involucrados en la programación fetal por subnutrición materna durante la preñez y/o lactancia en varios niveles, con énfasis en los factores reguladores intra testiculares y su repercusión sistémica. Confirmamos la hipótesis que la subnutrición materna afecta la espermatogénesis de las crías adultas a través de los cambios en los factores intra testiculares producidos por Sertoli que modulan a las células germinales en el modelo utilizado de rata.

¿Cuál es el período de subnutrición materna que genera más alteraciones?

En cuanto al período con más consecuencias por la subnutrición materna podemos afirmar, basados en los resultados obtenidos, que se producen más cambios cuando la subnutrición materna se realiza durante la preñez. Se alteran numerosos mecanismos testiculares e hipofisarios de las crías adultas por efecto de la subnutrición materna durante la preñez e incluso disminuye el índice gonadosomático evidenciando una menor inversión dirigida hacia el tejido gonadal. Sin embargo, cuando la subnutrición materna abarca los períodos de preñez y lactación las alteraciones incluyen una disminución del peso del animal adulto que no alcanza el de los animales del grupo control.

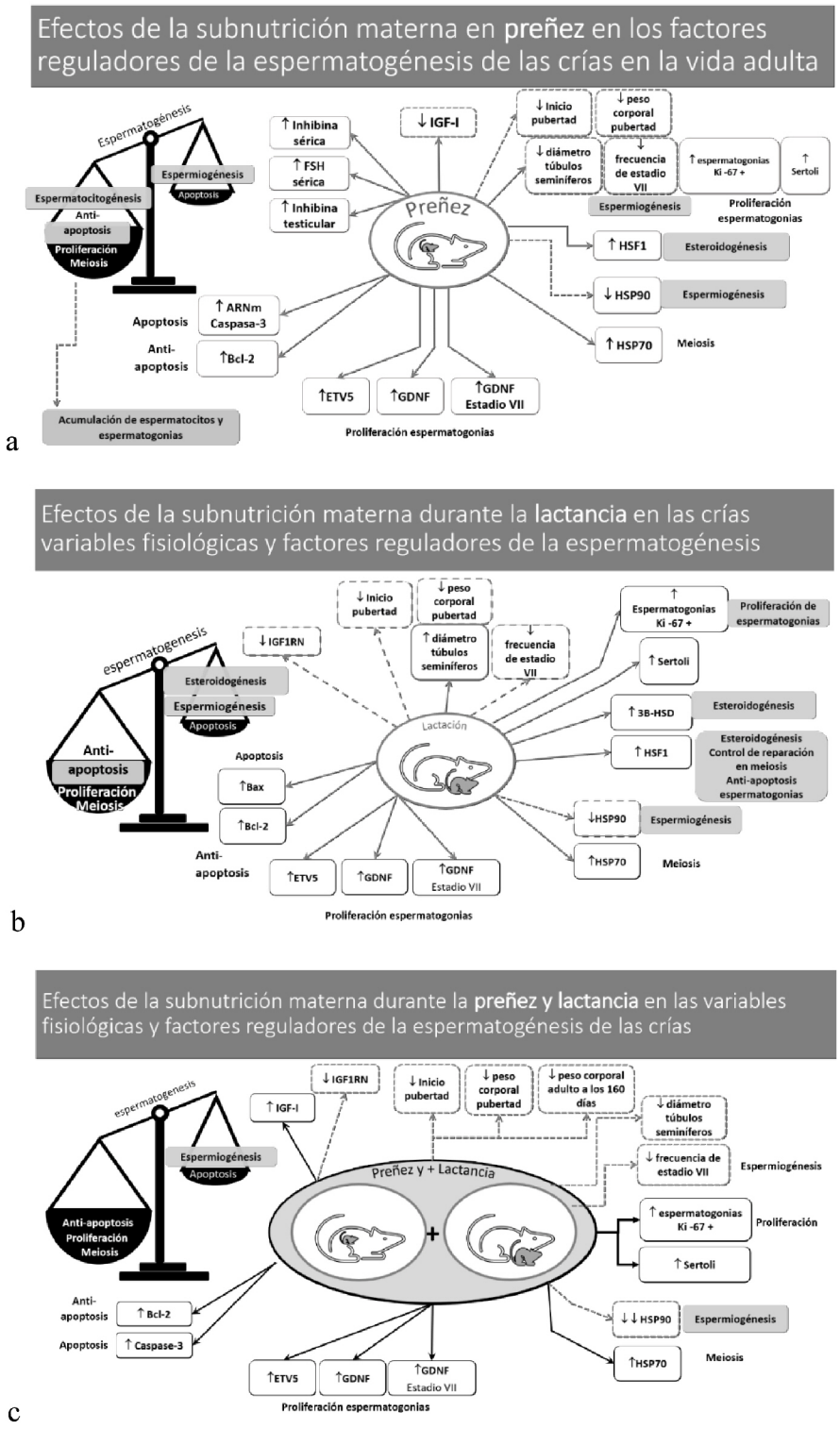


Figura 30. Resumen de resultado y discusión de los efectos de la subnutrición materna durante la preñez (a), lactancia (b) o ambos periodos (c) sobre el testículo de animales adultos y algunos de los mecanismos subyacentes de programación fetal.

6.2.1. Alteración del eje FSH hipofisaria – inhibina testicular por efecto de la subnutrición materna

En el presente estudio se determinó que en las crías macho adultas de madres subnutridas durante la gestación aumentó la concentración sérica de FSH e inhibina. Las células de Sertoli en el testículo de animales adultos producen inhibina (Sharpe et al. 1999) que inhibe la secreción de FSH generada por las células de la adenohipófisis animales en condiciones normales (Bilezikjian et al. 1993, Makanji et al. 2014). Sin embargo, en los testículos de las crías adultas cuyas madres fueron subnutridas en gestación esta retroalimentación negativa se vio afectada. Por lo tanto, el mecanismo de control negativo (feed back negativo) de la inhibina testicular de animales adultos sobre la FSH fue afectado por la subnutrición materna en gestación. Las causas que explican el aumento de FSH por la subnutrición pueden ser varias, pero se sugiere una alteración en los receptores a la inhibina en la adenohipófisis que a futuro se deberá corroborar (Figura 18, Figura 31).

En animales adultos cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez, el aumento de la hormona inhibina sérica e inmunoexpresión de inhibina en las células testiculares de Sertoli no es acompañado de una disminución de la FSH, sino por un aumento de dicha gonadotrofina por las células gonadotropas de la adenohipófisis. Esto sugiere una falla en la retroalimentación negativa de la inhibina en las células hipofisarias, que podría estar mediado por alteración o disminución en los receptores a inhibina en la hipófisis o bloqueo de las inhibinas tal como fue observado en estudios de eliminación de betaglicanos y con el agregado de una proteína IgG anti-betaglicano lo que disminuyó la potencia del antagonismo de la inhibina en las células gonadotropas de una manera dependiente de la dosis con una reducción en la sensibilidad a la inhibina (Lewis et al. 2000, Wiater et al. 2009).

Las distintas subunidades de inhibina están presentes en varios tipos de células en los testículos que incluyen células de Leydig y Sertoli y la expresión relativa de las subunidades (α, βA y βB) en ratas (Pineau et al. 1990, Noguchi et al. 1997a, Buzzard et al. 2004). En ratas, las células de Sertoli son la fuente principal de inhibina circulante y para expresar α, βB pero en menor medida la subunidad βA. También se encontró

que la expresión de ARNm de la subunidad βB de inhibina era intensa en células germinales desde espermatogonias hasta espermátidas redondas distintas de las células de Sertoli en testículos humanos adultos. Los niveles séricos circulantes de inhibina B son fuertes y correlacionado positivamente con el volumen testicular y los espermatozoides (Hildorf et al. 2019)HI.

La inhibina además de la regulación negativa de la hipófisis para la secreción de FSH, también actúa como potencial regulador paracrino y autocrino de proliferación, diferenciación de células de Leydig y Sertoli y esteroidogénesis in vitro (Ramaswamy & Weinbauer 2014).

La expresión de inhibina βB por las células de Sertoli depende de la coexistencia de actividad espermatogénica dentro de estos túbulos seminíferos, lo que explica por qué el nivel de inhibina B es bajo en pacientes con síndrome de solo células de Sertoli (Meachem et al. 2001).

Según mencionan trabajos actuales en humanos y trabajos en animales el nivel de inhibina sérica podría ser un indicador de daño testicular (Suescun et al. 2004, Moffit et al. 2013, Hildorf et al. 2019). Por lo tanto, el aumento indicado de inhibina sérica en los animales hijos de madres subnutridas durante la preñez o durante la lactancia podría sugerir daño testicular. Por otra parte, estudios previos han demostrado en ratas (Sharpe et al., 1999) que el número de células de Sertoli se corresponde con un cambio correspondiente en las concentraciones de inhibina B, y en modelo de orquitis la diminución de inhibina sérica es indicativo de alteración en la célula de Sertoli y en las germinales (Suescun et al. 2004).

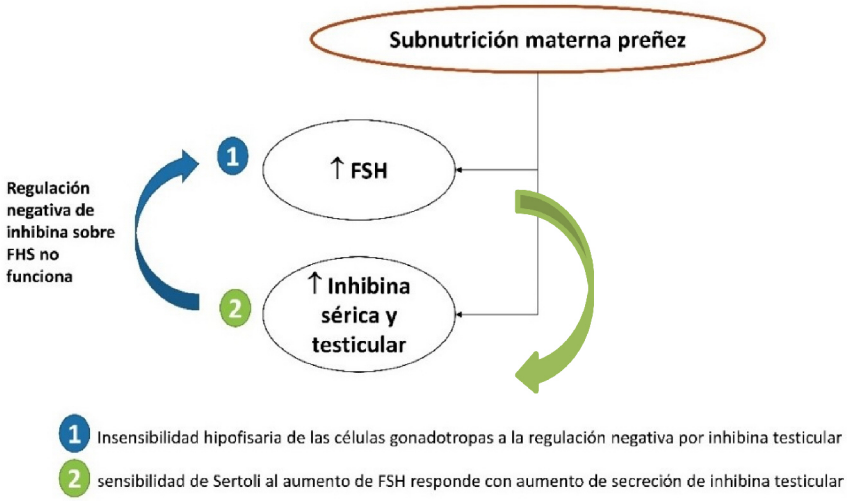


Figura 31. Esquema representativo del efecto propuesto de la subnutrición materna sobre la alteración de la regulación del eje hipofisario-gonadal FSH-inhibina. Se plantea la alteración de la sensibilidad de la hipófisis a la regulación negativa de la inhibina sobre las células gonadotropas, lo que produce que las células continúen sintetizando FSH, que a su vez estimula a Sertoli a continuar la síntesis de inhibina.

En animales adultos cuyas madres fueron subnutridas en gestación el aumento sérico de inhibina podría estar causado por un aumento en la producción por las células de Sertoli causado a su vez por el estímulo de la FSH hipofisaria, que como mencionamos también aumentó en animales cuyas madres fueron subnutridas en gestación.

Por otra parte, el aumento en la inhibina en suero y el aumento en la inmunoexpresión de inhibina en el testículo están ambos directamente relacionados con el aumento detectado en el número de células de Sertoli en animales subnutridos durante la preñez, tal como mencionan estudios previos que vinculan la concentración de inhibina en el suero con el número de células de Sertoli en los testículos (Buzzard et al. 2004, De Kretser et al. 2004, Atanassova et al. 2005). Por lo tanto, la subnutrición materna al aumentar la concentración de inhibina en suero podría sugerir un aumento en el número de células de Sertoli.

Tanto la FSH como la testosterona regulan las últimas etapas de la proliferación de células de Sertoli, siendo la FSH una hormona con un efecto trófico general sobre la actividad de las células de Sertoli en ratones púberes y adultos (Means et al. 1980, Johnston et al. 2004, Walker & Cheng 2005).

Asimismo, estudios previos demostraron que el aumento de FSH estimula a las células de Sertoli a producir más GDNF. Estudios previos indican que la subnutrición durante la lactancia produce en las crías un aumento en la concentración sérica de leptina, siendo ésta un potente estimulador de la producción de LH y FSH (Teixeira et al. 2007). Por otra parte, estudios in vitro demostraron que la FSH estimula la producción de GDNF (Tadokoro et al. 2002). Esto coincide con nuestros resultados de aumento de FSH en animales hijos de madres subnutridas en preñez.

Se ha descrito que la producción de GDNF y ETV5 en cultivo celulares in vitro de células primarias de Sertoli depende de FGF2, factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) e interleuquina-1beta (IL-1β), así como de la hormona hipofisaria FSH (Simon et al., 2007). Estudios previos indican que el aumento de GDNF se plantea como forma de enfrentar una deficiencia en la progenie en situaciones de daño (Tadokoro et al. 2002). Otros estudios en ratones demuestran que animales que sobreexpresan GDNF en sus testículos son infértiles y desarrollan tumores testiculares asemejándose a seminomas a partir de células de Sertoli (Meng et al. 2000).

Sugerimos que el aumento observado de GDNF en testículos de animales cuyas madres fueron subnutridas durante la gestación puede estar mediado por el aumento de FSH, por el mecanismo antes descrito de aumento de leptina sérica que deberemos constatar en estudios a futuro.

6.2.2. IGF-I y los transcriptos de sus receptores IGF1R en testículos de ratas adultas subnutridas

La subnutrición pre y posnatal tuvo consecuencias adultas en la expresión testicular de los transcriptos de receptores a IGF-I en la vida adulta, lo que sugiere un cambio en la sensibilidad da la IGF-I, así como cambios en la inmunoexpresión de IGF-I en el parénquima testicular. Dado que la hormona IGF-I actúa como una señal autocrina y paracrina en el testículo que regula la espermatogénesis en el testículo, es uno de los mecanismos que están involucrados en la programación por subnutrición materna que alteran la espermatogénesis en el testículo de animales adultos (Figura 32).

En estudios previos en ratones knock out del gen que codifica para los receptores de IGF1R se determinó que la espermatogénesis fue alterada y que el número de células de Leydig se ve disminuido (Baker 1993).

Estudios similares pero donde se eliminó el gen *Igf1r* en las células germinales o en las células de Sertoli se evidenció in vivo de que la familia de receptores de insulina se puede no ser indispensable en el linaje de células germinales, pero desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación, maduración y determina el pool de células de Sertoli maduras (Pitetti et al. 2013a) .

En testículos de ratas se determinó al día 19 postparto la presencia de receptores de IGF1R en espermatogonias y espermatocitos primarios de leptoteno y en zigoteno, al día 35 postnatal en los espermatocitos primarios de paquiteno y células de Leydig y a los 50 y 70 días postparto en Leydig y en espermátidas alargadas surgiendo un rol importante de IGF-I y de sus receptores a IGF-IR pue en la función testicular y el desarrollo de células germinales (Yagci & Zik 2006).

Por lo tanto, los factores de crecimiento de la familia de la insulina IGF-I y el sistema IGF-I y sus receptores en testículo determinan el número final de células de Sertoli y la producción diaria de espermatozoides (Neirijnck et al. 2018b)

Además, estudios previos mencionan que la expresión de IGF1 en espermatogonias sugiere que las células germinales también podrían regular el número de SC y por lo tanto, el tamaño de los testículos y producción de esperma, a través de la secreción de factores de crecimiento (Pitetti et al. 2013a).

Tal como mencionamos anteriormente, los factores de crecimiento locales como GDNF, ETV5 e IGF-I y factores hormonales como la FSH, así como la hormona tiroidea son importantes tanto para el desarrollo de la espermatogénesis como para mantener una población adecuada de células de Sertoli y germinales (Griffeth et al. 2014, Neirijnck 2018).

Por lo tanto, nuestros resultados indican que la subnutrición materna produce un desbalance en los mecanismos reguladores del número de células de Sertoli y germinales, aumentando la IGF-1 y disminuyendo los receptores cuando la subnutrición es durante la preñez y lactancia, y disminuyendo cuando la subnutrición se da solo en preñez.

Estos cambios involucran a los factores de crecimiento locales y la hormona FSH hipofisaria (Figuras 29, 30, 31, 32, 33).

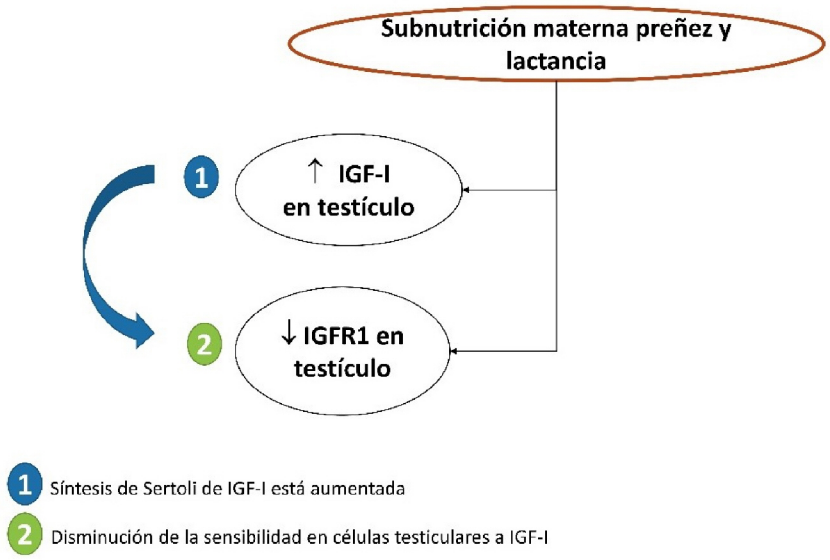


Figura 32. Esquema representativo de los mecanismos del eje IGF-I, IGFR1 que actúan en la programación por subnutrición materna en el testículo de ratas adultas. Aumento en la producción de IGF-I por las células de Sertoli y disminución de la capacidad de responder a dicha hormona testicular.

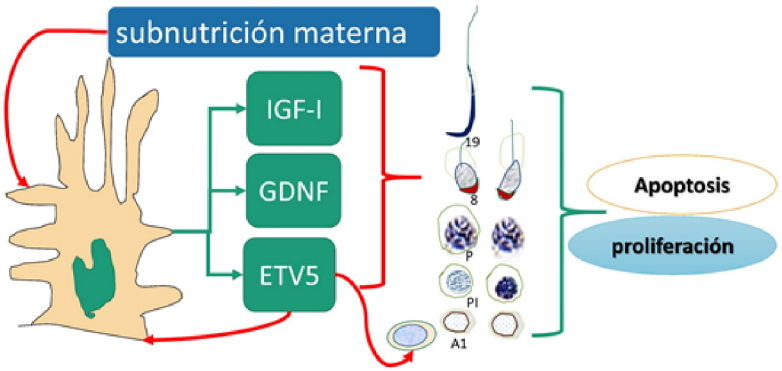


Figura 33. Esquema representativo de los mecanismos que actúan en la programación por subnutrición materna en el testículo de ratas adultas sobre los factores locales. Acción sobre la célula de Sertoli, generando cambios en la producción de factores de crecimiento y de transcripción IGF-I, ETV5 y GDNF producidos por las células de Sertoli con consecuencias sobre el balance entre proliferación y apoptosis de las células germinales.

6.2.3. Número de células de Sertoli: efectos de la subnutrición materna en el testículo sobre el número de las células de Sertoli

El aumento registrado en el número de células de Sertoli sugiere un retorno a un estado inmaduro indiferenciado y reinicio de actividad proliferativa por efecto de la subnutrición materna

La subnutrición materna durante los períodos de preñez, lactancia y preñez-lactancia aumentó el número de células de Sertoli en animales adultos.

Estudios recientes plantean que la capacidad proliferativa de Sertoli en la población de células adultas de Sertoli podría mantenerse en determinadas condiciones, por lo cual podría no diferenciarse terminalmente, sino que podría revertir a una etapa previa de indiferenciación (Tarulli et al. 2013). con aumento de su capacidad proliferativa en determinadas circunstancias (Figueiredo et al. 2016).

Además, en condiciones de hipotiroidismo durante el día 1 al 20 postparto el número de células de Sertoli aumenta en ratas hasta los 100 días de edad, demostrando que el número de células y la actividad proliferativa puede reiniciarse en la vida adulta con alteraciones durante la vida temprana (Alves Auharek & de França 2010).

Asimismo, en estudios previos de subnutrición materna en ovinos cuyas desde la concepción hasta el día 110 de gestación no se vio afectado el número de células de Sertoli a los 110 días de gestación (parto día aprox.150) (Andrade et al. 2013).

Sin embargo, nuestros resultados en animales adultos a los 160 días de edad contrastan con estudios donde disminuyó el número de células de Sertoli en corderos recién nacidos cuyas madres fueron subnutridas (Bielli et al. 2002).

Por otra parte, en animales adultos, carneros alimentados con dietas altas en proteínas (10 % más de proteína) en comparación con dietas control y dietas bajas (10% menos de proteína), no se observó disminución de células de Sertoli, sino cambios en la expresión de proteínas de unión así como en la expresión de marcadores de proliferación celular y en la expresión de un marcador de proliferación celular como PCNA (Guan et al. 2016). En dicho estudio se detectaron células de Sertoli positivas para PCNA en animales adultos, lo que indica la retención de la capacidad proliferativa después de la pubertad tal como mencionan otros trabajos (Tarulli et al. 2012). Asimismo, el tratamiento térmico induce la re-expresión de la citoqueratina 18 en las

células de Sertoli que demuestra que tienen la capacidad de presentar características de un estado inmaduro de Sertoli en respuesta a estímulos nocivos (Tarulli et al. 2012, Guan et al. 2016).

También se ha sugerido que una inmadurez de las células de Sertoli puede ser responsable del fenotipo infértil en los testículos de hombres infértiles (Tarulli et al. 2013).

Por lo tanto, el aumento observado en el número de células de Sertoli podría estar dado por una de-diferenciación de células y retorno a capacidad proliferativa, tal como fue mencionado previamente (Nicholls et al. 2012, Haverfield et al. 2015). El efecto de la subnutrición durante periodos clave del desarrollo genera una respuesta de aumento del número de células por un posible mecanismo de compensación del daño por subnutrición (Figura 34).

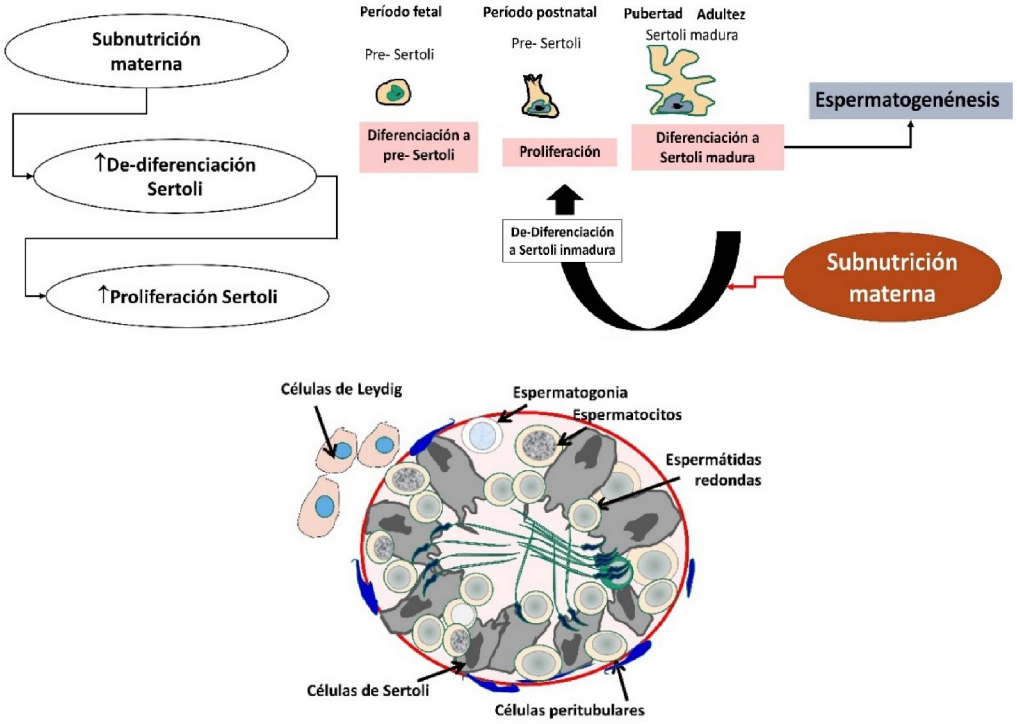


Figura 34. Esquema propuesto de de-diferenciación de células de Sertoli por subnutrición materna durante la preñez y/o lactancia, con el consiguiente aumento de número de células de Sertoli por efecto compensatorio.

Crecimiento compensatorio y número de células de Sertoli en animales subnutridos durante preñez y/o lactancia y con dietas ad libitum post destete.

El número aumentado en células de Sertoli determinado en las crías adultas cuyas madres fueron subnutridas en los períodos de gestación y/o lactancia sugiere un efecto compensatorio. Este mecanismo compensatorio podría ser en lactación producto de la mejora en la nutrición durante la lactancia para los animales del grupo tratado en preñez, o un crecimiento compensatorio post-destete para aquellos animales subnutridos durante la lactancia o preñez/lactancia, y alimentados *ad libitum* en la vida posterior al destete.

Nuestros resultados indican un aumento del número de células de Sertoli en adultos de los grupos subnutridos en distintos períodos del desarrollo pre y postnatal, lo que indica que hubo una alteración del proceso de multiplicación celular de Sertoli durante la vida, pre o postnatal en condiciones de subnutrición, con un crecimiento compensatorio luego de la subnutrición materna y ligado a la subnutrición y a la posterior nutrición *ad libitum* post destete descrito en otros modelos de subnutrición prenatal (Hazra et al. 2013, Pampanini et al. 2017) y en adultos (Guan et al. 2016).

Por un lado, el aumento registrado en nuestros resultados en la FSH en animales cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez, así como al aumento observado en el factor de transcripción HSF1, vinculado a la captación de colesterol necesario en la biosíntesis de hormonas esteroideas, explica un mecanismo compensatorio hipofisario e intratesticular.

Por otra parte, el aumento observado de los factores de transcripción GDNF y ETV5 también explica el aumento en el número de células de Sertoli en los testículos animales adultos cuyas madres fueron subnutridas en gestación y lactancia. Estos eventos permiten el crecimiento de recuperación del peso de animales, así como el peso de los testículos de las crías en la vida adulta.

Este mecanismo compensatorio se ha visto en otros modelos de restricción intrauterina, donde en el número de células de Sertoli fue el mismo en subnutridos que en animales control (Pampanini et al. 2017).

Nuestros resultados contrastan con los resultados de disminución del número de células de Sertoli en ratas a los 90 días de edad cuyas madres fueron alimentadas con dieta hipo proteica con 6% de proteína en gestación versus controles con dieta estándar conteniendo 17% de proteína. En dicho estudio se contabilizó en número de células de Sertoli por corte transversal de túbulo seminífero 10,53 ± 0,13 *versus* 11, 45 ± 0,13 (Toledo et al. 2011).

Por otra parte, estudios en ratas macho adultas a los 100 días de edad cuyas madres fueron subnutridas en preñez con dieta conteniendo un 11, 5% de proteína en comparación con el grupo control conteniendo 23% de proteína el número de células de Sertoli al corte transversal de túbulos seminíferos fue de 18, 2 ± 1,2 *versus* 20,2 ± 1,3 (Genovese et al. 2010, 2019).

Nuestros resultados indican un número de células de Sertoli al corte transversal de túbulos seminíferos de 11,8 ±0,24 en animales control *versus* 14,4 ±0,28 en animales subnutridos en ambos periodos de preñez y lactancia. Estas diferencias en el número de células de Sertoli obtenido podrían explicarse por el modelo experimental utilizado de subnutrición (18% *versus* 9% de proteínas), la intensidad de la subnutrición por diferencias en la composición de la dieta total o calidad de las proteínas utilizadas y en la edad de los animales al sacrificio (90 y 100 días) en comparación con los 160 días donde se realizó el muestreo en nuestro experimento.

Sin embargo, nuestros datos de aumento de células de Sertoli en animales subnutridos concuerdan con el aumento registrado en condiciones de daño testicular por productos químicos o radiación, en que las células madre espermatogonias aumentan en número rápidamente para compensar el daño, mientras que se dividen lentamente en condiciones fisiológicas (de Rooij & Russell 2000).

Asimismo, nuestros resultados en ratas adultas cuyas madres fueron subnutridas en gestación o en lactancia se registró un aumento de la expresión de GDNF en testículos de ratas, que es sabido estimula la proliferación de células de Sertoli durante el desarrollo testicular fetal y postnatal prepuberal (Yang & Han 2010). El factor de transcripción GDNF promueve un aumento en el número de células de Sertoli para el normal desarrollo de la espermatogénesis, lo que ha sido mencionado en varias especies de animales (Johnston et al. 2011).

En los estadios VII y VIII del ciclo espermatogénico normalmente el factor GDNF disminuye en animales normales, pero en los animales subnutridos durante gestación y/o lactancia observamos un aumento en la inmunoexpresión de GDNF en los túbulos seminíferos en estadio VIII. Esto denota los efectos de la subnutrición sobre la espermatogénesis y sobre la inmunoexpresión de proteínas en los estadios del ciclo del epitelio seminífero.

6.2.4. Número de células germinales espermatogonias por efecto de la subnutrición y su vinculación con aumento de GDNF y ETV5

Se determino un aumento de células espermatogonias en los testículos de animales cuyas madres fueron subnutridas durante preñez y/o lactación.

El aumento detectado en el número de células positivas al marcador de proliferación celular Ki-67 en espermatogonias fue clave para determinar las células espermatogonias en proliferación.

La expresión de la proteína Ki-67 humana está estrictamente asociada con la proliferación celular. Durante la interfase, el antígeno puede detectarse exclusivamente dentro del núcleo, mientras que en la mitosis la mayor parte de la proteína se reubica en la superficie de los cromosomas. El hecho de que la proteína Ki-67 esté presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G 1, S, G 2 y mitosis), pero no esté presente en las células en reposo (G 0), hace que un excelente marcador para determinar la denominada fracción de crecimiento de una población celular determinada (Scholzen & Gerdes 2000).

De hecho, el marcador Ki-67 se utiliza para detección en tumores de mama en humanos y animales como indicadores de proliferación de celular para diagnósticos y correlacionan con el nivel de agresividad de un tumor, posibilidad de recidivar y pronósticos (Carvalho et al. 2016).

Por lo tanto, el aumento observado del número de espermatogonias positivas a Ki-67 es indicativo de la población de células germinales en testículos de animales adultos cuyas madres fueron subnutridas.

Las causas de ese aumento de espermatogonias están explicadas en las secciones donde se menciona la vinculación con el aumento de los factores de transcripción GDNF y

ETV5 como factores producidos por las células de Sertoli que estimulan su proliferación como modo compensatorio producto de la programación fetal por subnutrición.

6.2.5. Factores de transcripción afectados: Efecto de la subnutrición materna sobre los factores de transcripción en el testículo

¿Cómo afectó la subnutrición durante períodos de desarrollo pre y posnatal los factores de transcripción que inciden en la proliferación y apoptosis de células testiculares?

La subnutrición materna durante distintos períodos, en gestación, lactancia y ambos períodos determinó aumento de los niveles de inmunoexpresión de los factores de transcripción GDNF y ETV5 en los testículos de las crías cuando adultos.

6.2.5.1. ETV5: Efecto de la subnutrición materna sobre el factor de transcripción ETV5

El gen *Etv5* es esencial para la renovación de SSC (Simon et al. 2010). Se ha determinado que es esencial también en las células de Sertoli, ya que la pérdida de ETV5 parece dañar la capacidad de dichas células para sustentar a las espermatogonias, posiblemente por una disminución de los niveles de claudina-5 (CLDN5) en ratones knockout a *Etv5,* lo que afecta la función de la barrera hemato-testicular (Tyagi et al. 2009b).

En los ratones knockout del gen Etv5 (*Etv5-/)* ocurre la primera onda de espermatogénesis, pero todas las SSC se pierden durante este tiempo, causando un fenotipo de solo células de Sertoli y azoospermia en adultos (Schlesser et al. 2008a). El desarrollo inicial de los testículos es normal en ratones Etv5- /- a pesar de una disminución del peso corporal, pero la pérdida de SSC comienza entre 4 y 8 días de la edad, lo que indica que ETV5 tiene efectos a partir del período neonatal temprano (Tyagi et al. 2009). Los ratones *Etv5-/-* son infértiles, incluso cuando se produce el esperma, lo que indica que la pérdida de ETV5 tiene otros efectos, además de la falta de autorrenovación SSC y perjudica la fertilidad.

6.2.5.2. GDNF: Efecto de la subnutrición materna sobre el factor de transcripción GDNF

Por otra parte, estudios previos demostraron que en condiciones fisiológicas la única fuente de GDNF son las células de Sertoli y que en condiciones de estrés se altera su expresión génica (Johnston et al. 2011). Nuestros resultados indican que la subnutrición materna durante la gestación y/o lactancia produce un cambio en la expresión de GDNF durante la etapa VII. Se produce un cambio en la inmunoexpresión de GDNF observándose disminución en estadios donde normalmente está aumentado En animales normales la expresión de GDNF fue máxima en la etapa I, se reduce 14 veces en la etapa VII y aumenta 12 veces en las etapas XIII-XIV (Johnston et al. 2011).

Asimismo, determinamos que se produjeron cambios en la frecuencia de estadios del ciclo del epitelio seminífero siendo éste un claro patrón de alteración en el proceso de espermatogénesis. La sobreexpresión de GDNF se ha visto en estudios asociado a alteraciones de la espermatogénesis por tumor de células germinales no metastásico con hiperproliferación de espermatogonias (Meng et al. 2000).

El GDNF es uno de los factores producidos por las células de Sertoli que regula el mantenimiento de espermatogonias indiferenciadas, incluidas las células madre espermatogonia y se ha observado no sólo en condiciones normales sino aumentado en patologías tumorales testiculares (Ferranti et al. 2012, Rossi & Dolci 2013, Singh et al. 2017) por lo que el aumento encontrado en estadios de ciclo espermatogénico donde debería ser menor su expresión denota una alteración importante en la regulación del ciclo espermatogénico.

El factor de crecimiento como el GDNF emerge como un factor clave porque regula las decisiones del destino celular de las células madre espermatogonia y de espermátidas a través de la regulación paracrina (Fouchécourt et al. 2006).

Por lo tanto, podemos afirmar que la subnutrición materna durante los períodos clave en gestación y lactación aumenta la expresión de dos factores de transcripción claves para el mantenimiento de la espermatogénesis como lo son el ETV5 y el GDNF en el testículo de sus crías en etapa adulta.

6.2.6. Consecuencias de la subnutrición materna sobre ciclo del epitelio seminífero y sus estadios

Uno de los factores que determinan consecuencias directas observables en la espermatogénesis fue la sobreexpresión de GDNF durante el estadio VII y VIII, donde normalmente este factor es mínimo, mientras que se maximiza entre el estadio XIII-I (Johnston et al. 2011). Un proceso complejo como la espermiación ocurre durante varios días comenzando al inicio de la etapa VII en la rata, con la alineación de espermátidas alargadas a lo largo del borde luminal del epitelio seminífero, y se completa hacia el final de la etapa VIII (Kopera et al. 2010).

En consecuencia, la subnutrición materna durante la gestación y lactancia aumentó la expresión de GDNF, lo que condiciona la espermatogénesis, en particular la espermiación, observándose diminución de la frecuencia de estadios VII y de aumento de GDNF durante dichos estadios.

Se han registrado estudios previos donde se observó que una sobreexpresión de GDNF altera la espermatogénesis y causa tumor de células germinales no metastásico por hiper proliferación de espermatogonias (Meng et al. 2000). Nuestros resultados obtenidos coinciden con esta aseveración, dado que en el presente estudio observamos cambios no sólo en la expresión de GDNF en crías de madres subnutridas durante diversos períodos del desarrollo, sino que observamos cambios en su morfología y en la frecuencia de asociaciones celulares en el epitelio seminífero, señal que evidencia cambios en la espermatogénesis.

Por lo tanto, un aumento de GDNF en condiciones de subnutrición podría generar un desbalance, al estimular la exagerada proliferación de células germinales generando mayor número de células y por lo tanto desbordando la capacidad de Sertoli de albergar y sostenerlas metabólicamente. En cuanto al momento del desarrollo que más se sobre expresa GDNF, depende del momento de la subnutrición, con posibles repercusiones posteriores en la espermatogénesis.

¿Cómo se relaciona la inmunoexpresión de GDNF y los cambios en los estadios del ciclo espermatogénico?

La subnutrición alteró la frecuencia en todos los estadios del ciclo espermatogénico, aumentando unos y disminuyendo otros, según el momento del desarrollo cuando

ocurre la subnutrición en ratas, lo que sugiere una alteración en el ciclo espermatogénico.

Nuestros resultados de los animales control coinciden con estudios previos donde se observó que la distribución de GDNF en las células de Sertoli está fuertemente relacionada a la expresión de ARNm de GDNF y la distribución de proteína GDNF dentro del citoplasma de las células de Sertoli, variando asimismo con el estadio donde es máxima su expresión entre XIII- I, y va decreciendo hacia el estadio VII (Johnston et al. 2011).

Nuestros resultados de imnunoexpresión de GDNF en animales control, coinciden con estudios previos de expresión de ARNm de GDNF y GDNF secretada por las células de Sertoli que es dependiente de la etapa del ciclo espermatogénico, siendo mínima en los estadios VII y VIII (Grasso et al. 2012). Estos datos apoyan la hipótesis que los cambios cíclicos en la expresión de GDNF por las células de Sertoli son responsables de la etapa específica y de la diferenciación de espermatogonias madre fundamentales en la espermatogénesis.

En base a nuestros resultados podemos sugerir que la subnutrición materna modifica la inmunoexpresión de GDNF en los túbulos seminíferos en testículos de animales adultos y que esto está vinculado al estadio en que se encuentre el túbulo seminífero, sobre expresándose durante los estadios VII y VIII donde normalmente se produce un descenso en la expresión de GDNF.

6.2.7. Efecto de la subnutrición materna sobre la estructura testicular

¿Cómo afectó la subnutrición durante períodos de desarrollo pre y posnatal a la estructura testicular y el ciclo del epitelio seminífero?

Nuestros resultados indican que la subnutrición materna a largo plazo alteró la morfología testicular. Se observó una disminución tanto en el diámetro de los túbulos seminíferos como en la altura del epitelio seminífero en los testículos de animales adultos, hijos de madres subnutridas durante la gestación. Nuestros resultados coinciden con datos de animales prepuberales con restricción de proteína materna, donde se observó disminución del diámetro de los túbulos seminíferos (Leonhardt 2002, Ramos et al. 2006, Rodríguez-González et al. 2012).

Nuestros resultados coinciden con datos de animales prepuberales con restricción de proteína materna, donde se observó disminución del diámetro de los túbulos seminíferos (Leonhardt 2002, Ramos et al. 2006, Rodríguez-González et al. 2012).

La subnutrición materna en preñez o preñez y lactancia disminuyó el diámetro de los túbulos y la altura del epitelio seminífero de los testículos de las crías adultas. Coincide con estudios previos de alteraciones en el diámetro de diámetro de túbulos seminíferos seminíferos en condiciones de subnutrición proteica (Leonhardt 2002, Ramos et al. 2006, Rodríguez-González et al. 2012).

La subnutrición materna aumentó el nº de células espermatogonias en proliferación y el nº de células de Sertoli. Concuerda con los orígenes de tumores de Sertoli o de células germinales en el síndrome de disgenesia testicular en humanos

Por otra parte, la altura del epitelio germinal está correlacionada con los estadios del ciclo del epitelio seminífero (Wing & Christensen 1982) y la mayor frecuencia observada normalmente en ratas corresponde al estadio VII previo a la espermiación con la liberando los espermatozoides a la luz de los túbulos seminíferos (Hess et al. 1990).

Uno de los resultados más interesantes de nuestro estudio destaca una consecuencia directa sobre la espermatogénesis, con la disminución de las frecuencias de los túbulos en estadio VII del ciclo del epitelio seminífero previo a la espermiación en testículos de ratas cuyas madres fueron subnutridas durante la preñez y/o lactancia.

Por otra parte, estudios previos demostraron que, en condiciones de tratamiento farmacológico, se altera esta frecuencia del estadio VII (Hess et al. 1990, Johnston et al. 2011) tal como ocurre en nuestro estudio en los testículos de animales subnutridos.

6.2.8. Efecto de la subnutrición materna sobre las proteínas anti y pro-apoptóticas en los testículos

6.2.8.1 Caspasa-3 en testículos de ratas adultas subnutridas

La expresión de la caspasa-3 fue localizada en espermátidas redondas en el compartimiento adluminal, mientras que el compartimiento basal fue negativo para la caspasa-3 en los animales control. Los transcriptos para caspasa 3 aumentaron en animales cuyas madres fueron subnutridas durante la gestación.

6.2.8.2 Bax en testículos de ratas adultas subnutridas durante gestación y/o lactancia

La subnutrición durante la lactancia aumentó una importante enzima pro-apoptótica que podría desencadenar la apoptosis en las espermátidas. Bax se localizó con frecuencia también en células de Sertoli citoplasma y espermatocitos de animales subnutridos en preñez y preñez/lactancia.

6.2.8.3 Bcl-2 en testículos de ratas adultas subnutridas durante gestación y/o lactancia

El mantenimiento de un adecuado balance entre la proliferación y la apoptosis celular es fundamental para la espermatogénesis. Por lo tanto, el aumento de la proteína Bcl-2 que inhibe la apoptosis incide a favor de evitar la apoptosis y promueve la supervivencia celular. De hecho, el Bcl-2 es una molécula clave en los tratamientos ya que evita la liberación de citocromo y no permite la apoptosis por lo que las células con cáncer la pueden morir haciendo que sean resistentes a quimioterapia. Por lo tanto, Bcl-2 es un factor clave que evita la apoptosis al bloquear la permeabilización de la membrana mitocondrial por Bax (Beumer et al. 2000, Brahmbhatt et al. 2015).

La subnutrición materna aumenta la inmunoexpresión de Bcl-2 en los testículos adultos. Por lo tanto, el crecimiento en exceso de una población normal de células puede llevar además a la consiguiente formación de tumores o desregulación con exceso de células germinales, lo que contribuye a que Sertoli no puede sostenerlas metabólicamente. De hecho, es necesario que ocurra una onda masiva de apoptosis de células germinales al inicio de la pubertad, lo que asegura una correcta espermatogénesis (Rodriguez et al. 1997).

6.2.9. Efecto de la subnutrición sobreel factor de trasncripción HSF1 y las proteínas de shock térmico

6.2.9.1. HSF-1 Regulación del factor de shock HSF1

Tal como mencionamos anteriormente, en el testículo de mamíferos el factor de shock térmico HSF1 ejerce numerosas acciones dependiendo del tipo celular. Por un lado, el HSF1 tiene funciones claves en células germinales durante el estrés por calor. A nivel de espermatogonias, tiene un rol anti-apoptótico en espermatogonias mitóticas, para mantener el pool de células madre. En los espermatocitos el HSF1 tiene un rol pro-apoptótico durante la etapa de meiosis. Esto quedó demostrado en estudios en ratones knock out de HSF1 donde la carencia de HSF1 hace que las espermatogonias sean menos resistentes al estrés por calor, mientras que los espermatocitos meióticos deficientes sobreviven mejor. Esta función dual de HSF1 puede contribuir a los mecanismos de control de calidad que operan durante la gametogénesis masculina (Salmand et al. 2008).

Por lo tanto, en los animales subnutridos durante la preñez o durante la lactancia el factor HSF1 aumentó a nivel de las células de Leydig y en las células de la línea germinal. Dado los múltiples roles del HSF1 en el testículo, en la esteroidogénesis, en la función de protección de espermatogonias y como regulador de proteínas durante la meiosis en espermatocito, podemos sugerir que su aumento puede sugerir 3 eventos: 1) un aumento en la esteroidogénesis, 2) un aumento en la protección de las espermatogonias para mantenerlas y 3) un aumento del rol apoptótico en espermatocitos en meiosis. Estos datos coinciden con el aumento registrado en el número de células espermatogonias en proliferación que expresan Ki-67 en los

animales subnutridos en todos los períodos. En los animales hijos de madres subnutridas durante la lactación el aumento de HSF1 coincide con un aumento de la inmunoexpresión de la enzima esteroidogénica 3β-HSD.

El rol de HSF1 en la esteroidogénesis de células de Leydig es clave, ya que mantiene el transporte de colesterol mediante la recuperación de StAR Steroidogenic Acute Regulatory Protein bajo estrés por calor crónico (Furukawa et al. 2019).

El factor de shock térmico HSF1 es el principal regulador de la respuesta inducible por estrés, que se caracteriza por un aumento rápido y transitorio de la expresión de genes que codifican proteínas de shock térmico. La función de HSF1 depende de la activación del estrés y la unión a elementos de shock térmico (HSE) ubicados en las regiones promotoras de los genes diana de HSF1. En los mamíferos, la actividad de unión de HSF1 está regulada diferencialmente en los órganos intraabdominales mantenidos a 37 ° C y en los testículos, que se encuentran fuera de la cavidad abdominal en especies donde se localizan dentro de bolsas escrotales y permanecen a una temperatura más baja. la expresión de HSF1 activado en los testículos es perjudicial para la espermatogénesis. Sin embargo, la falta de HSF1 en ratones hace que las espermatogonias sean menos resistentes al estrés por calor, mientras que los espermatocitos meióticos deficientes sobreviven mejor.

De esta manera las dos acciones que HSF1 ejerce a nivel testicular durante el estrés por calor contribuyen a los mecanismos de control de calidad que operan durante la espermatogénesis. Por un lado, es anti-apoptótico en las espermatogonias mitóticas, asegurando una continuidad de las espermatogonias. Por otra parte, es pro-apoptótico en los espermatocitos en meiosis (Salmand et al. 2008).

HSF1 tiene registrado varias acciones. Por un lado, promueve la muerte celular apoptótica de células germinales masculinas en ratones que expresan HSF1 activo en los testículos y son infértiles debido a un bloqueo en la espermatogénesis (Nakai et al, 2000). La falta de HSF1 inhibe la apoptosis de espermatocitos inducida por calor en ratones que carecen de HSF1 (Izu et al, 2004).

HSF1 promueve la muerte celular apoptótica en espermatocitos de paquiteno expuestos a estrés térmico. Por el contrario, HSF1 actúa como un factor de supervivencia celular de espermatogonias, en testículos expuestos a altas temperaturas.

Estos resultados demuestran que HSF1 tiene dos roles opuestos en las células germinales masculinas independientes de la activación de genes de shock térmico.

6.2.9.2. HSP70: Efecto de de subnutrición materna sobre la proteína de shock térmico HSP70

En primer lugar, la subnutrición durante la vida prenatal y posnatal provocó a largo plazo un aumento de la expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis y que promueven la protección tal como la HSP70 en el testículo de ratas adultas.

La expresión de HSP70 aumentada se ha indicado como un mecanismo de protección contra la apoptosis en los espermatozoides en hombres infértiles (Erata et al. 2008). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que está activado el mecanismo de protección contra la apoptosis en los animales subnutridos. El aumento de HSP70 se ha reportado como factor que inhibe la apoptosis y evita la activación de caspasas al unirse a Apaf1 (apoptotic protease-activating factor-1) y bloquear la activación enzimática (Purandhar et al. 2014).

6.2.9.3. HSP90: Efecto de la subnutrición materna y efecto sobre la proteína de shock térmico HSP90

La HSP90 se expresa en las espermátidas, donde estabilizan y activan a las serina-treonina quinasas específicas del testículo, proteínas expresadas exclusivamente en células post meióticas, siendo esenciales para la fertilidad (Jha et al. 2013). Por lo tanto, la disminución de HSP90 observada en el presente estudio nos permite sugerir que la subnutrición tiene consecuencias negativas sobre el proceso de espermiogénesis.

Estudios recientes en espermatozoides de humanos muestran bajos niveles de HSP90 en semen con oligoastenozoospermia y que la motilidad de los espermatozoides mediada por progesterona y reacción acrosómica están también afectadas. Asimismo, ratones knockout para HSP90 pasan por la meiosis sin embargo, estos animales desarrollan globozoospermia y un acrosoma defectuoso (Sagare-Patil et al. 2017).

Además, los ratones que carecen de la isoforma HSP90 son infértiles por lo que la HSP90 es reconocida como proteína anti-apoptótica, bloqueando la muerte celular en

diferentes niveles (Wang et al. 2014). Por lo tanto, la disminución registrada de HSP90 a nivel testicular de ratas adultas en el presente estudio, podría generar un desbalance entre la proliferación y muerte celular de espermátidas. Por otra parte, la disminución de HSP90 podría afectar la regulación hormonal, dado que como chaperona molecular la HSP90 está unida a los receptores de andrógenos a nivel citoplasmático. Dichos receptores requieren de esta proteína y luego pasan a disociarse de ella, se translocan al núcleo, donde se dimerizan, fosforilan y se unen al elemento de respuesta en el ADN (Squires 2006). La importancia del receptor de andrógeno radica en que regula la expresión génica, siendo responsable de la diferenciación sexual y los posteriores cambios durante el período de pubertad en machos (Gao et al. 2005), por lo cual un cambio en la molécula chaperona que lo acompaña tendrá efectos sobre el mismo.

Por lo tanto, la subnutrición materna durante la lactancia aumentó la proteína protectora Bcl-2 y las proteínas de shock térmico HSP70, con un equilibrio hacia y la proliferación en las células germinales observado por el aumento en la expresión de Ki-67.

La subnutrición materna afecta a largo plazo los mecanismos testiculares de control de la espermatogénesis en las crías en su vida adulta (Figura 33, 34, 35).

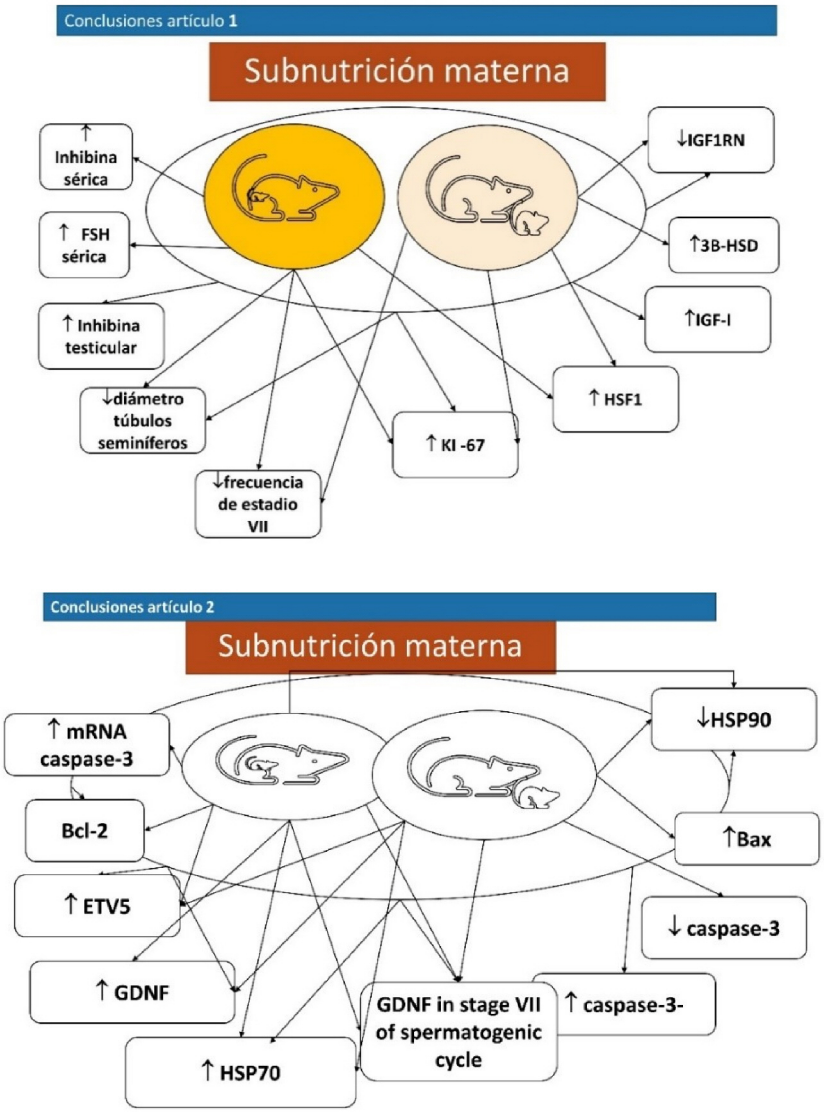
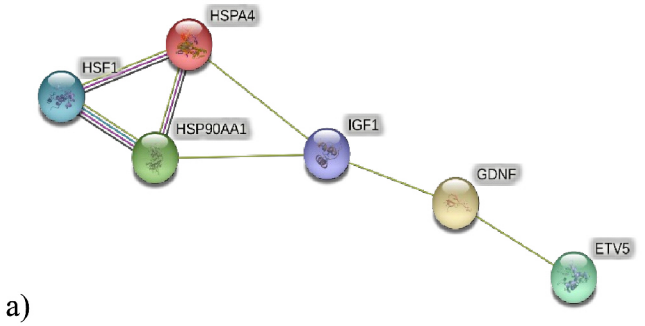


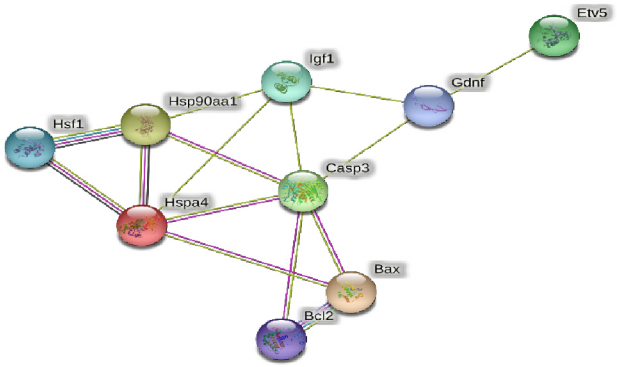
Figura 35. Resumen esquemático de los resultados obtenidos de los efectos de la programación por subnutrición materna, y los mecanismos involucrados de programación en el testículo de las crías adultas.

Consideraciones finales

La subnutrición materna tiene un impacto en los mecanismos intra-testiculares que modulan la espermatogénesis. A su vez, estos mecanismos intrínsecos forman una red intrincada de mecanismo dentro del testículo que generan cambios que afectan la espermatogénesis. Esta tesis aportó datos para el análisis de los distintos factores de median la programación fetal por subnutrición materna. En el esquema que se presenta a continuación se plantea la red compleja proteínica a través de información en las bases de datos en humanos y ratas donde se pueden apreciar los vínculos entre los factores de transcripción estudiados en la presente tesis (Figura 36).



a)



b)

Figura 36. Esquema representativo de redes de proteínas actuantes en la programación fetal por subnutrición y sus vinculaciones. a) Se observan las interacciones entre los factores de transcripción estudiados en la presente tesis GDNF, ETV5 e IGF-I y su vinculación con el complejo de proteínas de shock térmico HSP70 y HSP90, y el factor de transcripción HSF1 en humanos. Colaboración en la realización Rody Artigas. b) Interacciones en proteínas de *Rattus norvegicus* con agregado de proteínas apoptóticas. Realizado por Graciela Pedrana. Mapa generado por programa String. https://string-db.org/cgi/network?taskId=bpwmJmvP1cWz&sessionId=bPrSmqhA0yWS

7. CONCLUSIONES GENERALES

La subnutrición materna afecta a largo plazo el complejo balance entre factores promotores de proliferación, diferenciación y meiosis en el testículo de las crías. La subnutrición produce programación fetal y postnatal por medio de la alteración del equilibrio entre las proteínas promotoras de la proliferación celular, las proteínas que evitan y las que inducen la apoptosis en los testículos. Una alteración entre el balance en el microambiente testicular es suficiente para perturbar el desarrollo normal de una espermatogénesis funcional. La etapa del desarrollo que se ve más comprometida afectada por la subnutrición materna es la preñez, a pesar de observarse cambios similares y preñez y lactancia.

Como conclusiones generales se describen las obtenidas partir de cada artículo publicado en la presente tesis doctoral.

1) Nuestros estudios confirman la hipótesis planteada que la programación por subnutrición materna está mediada por factores de transcripción producidos por las células de Sertoli.
2) La subnutrición materna genera modificaciones en la expresión de GDNF y ETV5, importantes factores de transcripción producidos por las células de Sertoli sustentaculares del epitelio seminífero.
3) La subnutrición materna altera la morfología de los testículos de las crías adultas y la frecuencia de estadios del ciclo espermatogénico, especialmente disminuye la frecuencia del estadio VII y VIII. Estos resultados son la evidencia morfológica de una espermatogénesis comprometida, obteniendo menor frecuencia de túbulos seminíferos en los estadios del ciclo espermatogénico previos a la espermiación.
4) La subnutrición materna durante la preñez produce un aumento a nivel de la hormona FSH sérica, coincidente con el aumento de niveles séricos de inhibina de la descendencia masculina en la vida adulta, sugiriendo un posible efecto de desregulación del eje hipofisario – gonadal.
5) La subnutrición materna prenatal y posnatal tiene efectos a largo plazo sobre los transcriptos de sus receptores a IGF-I a nivel testicular en la descendencia, y sobre la inmunoexpresión de IGF-I hormona involucrada en los mecanismos de proliferación celular y la regulación de la esteroidogénesis testicular.

6) La proteína pro-apoptótica caspasa-3 aumenta en testículos de animales adultos cuyas madres fueron subnutridas en preñez y lactancia, afectando espermátidas en las últimas etapas de la espermatogénesis.
7) La proteína pro-apoptótica Bax se expresa en espermatogonias y células de Sertoli aumentando en los testículos de animales cuyas madres fueron subnutridas en lactación comprometiendo el ingreso a la meiosis.
8) La subnutrición materna durante la gestación, lactación o ambos períodos altera la expresión de los factores de transcripción GNDF y ETV5, producidos por las células de Sertoli, que regulan los procesos de proliferación y apoptosis, esencial durante la espermatogénesis.
9) La subnutrición materna durante la lactancia aumentó la proteína protectora Bcl-2 y las proteínas de shock térmico HSP70, con un equilibrio hacia y la proliferación en las células germinales observado por el aumento en la expresión de Ki-67.
10) La subnutrición durante la gestación y la lactancia tiene un impacto a largo plazo en la regulación de la esteroidogénesis testicular. Estos mecanismos impactan a su vez en otros vinculados al mantenimiento diferenciación y muerte celular de las células germinales.

Aportes al conocimiento de la programación fetal por subnutrición

1. Este estudio permitió dilucidar algunos de los mecanismos que están involucrados en la programación por subnutrición que desencadenan alteraciones reproductivas en animales machos durante la vida adulta.
2. Estos resultados brindan nuevos datos que son el sustento para comprender algunos de los mecanismos que se desencadenan alteraciones durante la vida, con orígenes en los períodos de desarrollo pre y postnatal.
3. Se aportó información original sobre los mecanismos subyacentes en la programación fetal por subnutrición y sus efectos sobre factores locales intratesticulares que regulan el proceso de espermatogénesis.
4. Se logró contribuir a la comprensión los efectos a largo plazo de la subnutrición materna sobre la expresión de factores de transcripción y de crecimiento, proteínas de shock térmico, y proteínas apoptóticas y los procesos de espermatogénesis en testículos de animales adultos.
5. Mediante los resultados obtenidos en la presente tesis se aportó información relevante para comprender los mecanismos intrínsecos testiculares que median la programación fetal por subnutrición. Específicamente se determinó los mecanismos de programación por subnutrición están mediados por las células de Sertoli y sus factores de transcripción, factores de crecimiento, las proteínas de shock térmico y apoptóticas en los testículos de animales adultos cuyas madres fueron subnutridas durante la gestación y lactación.
6. Los datos obtenidos permitirán tanto a nivel humano como animal, pensar en estrategias de prevención de patologías reproductivas, al conocer más acerca de los mecanismos reguladores de la programación fetal por subnutrición.

8. PERSPECTIVAS

Se plantea continuar los estudios de la nutrición materna, abordando otros aspectos vinculados a nutrición, como ser los efectos de la sobrenutrición es decir el exceso de grasas en la dieta de las madres:

1) Dietas altas en grasas durante la gestación
2) Dietas altas en grasas durante la lactación
3) Dietas altas en grasas durante ambos períodos

Las dietas de baja calidad de proteínas y alto contenido en grasa tanto en animales de compañía como animales de producción son comercializables por ser más económicas y más palatables, pero afectan la salud general de animal.

Se realizarán los estudios de dietas altas en grasas en el modelo experimental de ratas y se evaluarán los efectos a largo plazo a nivel metabólico y hormonal, así como en los testículos de las crías macho en la vida adulta.

Se espera obtener información original que aporte para conocer los mecanismos de programación fetal vinculados a la obesidad materna, fetal, y en la vida adulta, con consecuencias generales en el metabolismo general del animal y a nivel reproductivo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA 2005. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum. Reprod. Update* 11: 357–374.

Aiken CE, Ozanne SE 2013. Sex differences in developmental programming models. *Reproduction* 145: R1-13.

Alves Auharek S, França LR de 2010. Postnatal testis development, Sertoli cell proliferation and number of different spermatogonial types in C57BL/6J mice made transiently hypo- and hyperthyroidic during the neonatal period. *J. Anat.* 216: 577–588.

Amann RP 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. *Am. J. Anat.* 110: 69–78.

Andrade LP, Rhind SM, Rae MT, Kyle CE, Jowett J, Lea RG 2013. Maternal undernutrition does not alter Sertoli cell numbers or the expression of key developmental markers in the mid-gestation ovine fetal testis. *J. Negat. Results Biomed.* 12: 2.

Angelopoulou R, Balla M, Lavranos G, Chalikias M, Kitsos C, Baka S, Kittas C 2008. Sertoli cell proliferation in the fetal and neonatal rat testis: A continuous phenomenon? *Acta Histochem.* 110: 341–347.

Atanassova NN, Walker M, Mckinnell C, Fisher JS, Sharpe RM 2005. Evidence that androgens and oestrogens, as well as follicle-stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. *J. Endocrinol.* 184: 107–117.

Au CE, Hermo L, Byrne E, Smirle J, Fazel A, Simon PHG, Kearney RE, Cameron PH, Smith CE, Vali H, Fernandez-Rodriguez J, Ma K, Nilsson T, Bergeron JJM 2015. Expression, sorting, and segregation of Golgi proteins during germ cell differentiation in the testis. *Mol. Biol. Cell* 26: 4015–4032.

Baker J 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75: 73–82.

Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellvé AR, Efstratiadis A 1996. Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol. Endocrinol.*

10: 903–918.

Barker DJP 2007. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261: 412–417.

Barker DJ, Clark PM 1997. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev. Reprod.* 2: 105–112.

Barone R 2001. *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4 Splanchnologie II Appareil uro-génital Foetus et ses annexes Péritoine et topographie abdominale* (Vigot, Ed.). Lyon.

Bautista CJ, Bautista RJ, Montaño S, Reyes-Castro LA, Rodriguez-Peña ON, Ibáñez CA, Nathanielsz PW, Zambrano E 2019. Effects of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on milk composition and offspring development. *Br. J. Nutr.* 122: 141–151.

Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ 1990. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248: 850–854.

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* 2: 469–475.

Benbrahim-Tallaa L, Siddeek B, Bozec A, Tronchon V, Florin A, Friry C, Tabone E, Mauduit C, Benahmed M 2008. Alterations of Sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption. *J. Endocrinol.* 196: 21–31.

Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Lock TM, Kal HB, Rooij DG De 2000. Apoptosis regulation in the testis: involvement of Bcl-2 family members. *Mol. Reprod. Dev.* 56: 353–359.

Bielli A, Katz H, Pedrana G, Gastel MT, Moraña A, Castrillejo A, Lundeheim N, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H 2001. Nutritional management during fetal and postnatal life, and the influence on testicular stereology and Sertoli cell numbers in Corriedale ram lambs. *Small Rumin. Res.* 40: 63–71.

Bielli A, Pérez R, Pedrana G, Milton JTB, Lopez Á, Blackberry MA, Duncombe G, Rodriguez-Martinez H, Martin GB 2002. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod. Fertil. Dev.* 14: 333–337.

Biggiogera M, Tanguay RM, Marin R, Wu Y, Martin TE, Fakan S 1996. Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopical study. *Exp. Cell Res.* 229: 77–85.

Bilezikjian LM, Vaughan JM, Valet WW 1993. Characterization and the regulation of inhibin/activin subunit proteins of cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 133: 2545–2553.

Billig H, Chun S, Eisenhauer K, Hsueh AJW 1996. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum. Reprod. Update* 2: 103–117.

Boo HA De, Harding JE 2006. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust. New Zeal. J. Obstet. Gynaecol.* 46: 4–14.

Boulogne B, Olaso R, Levacher C, Durand P, Habert R 1999. Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development. *Int. J. Androl.* 22: 356–365.

Brahmbhatt H, Oppermann S, Osterlund EJ, Leber B, Andrews DW 2015. Molecular Pathways Molecular Pathways: Leveraging the BCL-2 Interactome to Kill Cancer Cells-Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Beyond.

Brown LM, Pottern LM, Hoover RN 1986. Prenatal and perinatal risk factors for testicular cancer. *Cancer Res.* 46: 4812–4816.

Buzzard JJ, Loveland KL, O'Bryan MK, O'Connor AE, Bakker M, Hayashi T, Wreford NG, Morrison JR, Kretser DM De 2004. Changes in circulating and testicular levels of inhibin A and B and activin A during postnatal development in the rat. *Endocrinology* 145: 3532–3541.

Cannarella R, Condorelli RA, Vignera S La, Calogero AE 2018. Effects of the insulin-like growth factor system on testicular differentiation and function: a review of the literature. *Andrology* 6: 3–9.

Cannarella R, Mattina T, Condorelli RA, Mongioì LM, Pandini G, Vignera S La,

Calogero AE 2017. Chromosome 15 structural abnormalities: Effect on IGF1R gene expression and function. *Endocr. Connect.* 6: 528–539.

Carvalho MI, Pires I, Prada J, Lobo L, Queiroga FL 2016. Ki-67 and PCNA Expression in Canine Mammary Tumors and Adjacent Nonneoplastic Mammary Glands. *Vet. Pathol.* 53: 1138–1146.

Caton JS, Crouse MS, Reynolds LP, Neville TL, Dahlen CR, Ward AK, Swanson KC 2019. Maternal nutrition and programming of offspring energy requirements. *Transl. Anim. Sci.* 3: 976–990.

Cavariani MM, Santos T de M, Pereira DN, Almeida Chuffa LG de, Pinheiro PFF, Scarano WR, Domeniconi RF 2019. Maternal protein restriction differentially alters the expression of AQP1, AQP9 and VEGFr-2 in the epididymis of rat offspring. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 1–18.

Cavicchia JC, Dym M 1977. Relative volume of Sertoli cells in monkey seminiferous epithelium: a stereological analysis. *Am. J. Anat.* 150: 501–507.

Chadio S, Katsafadou A, Kotsampasi B, Michailidis G, Mountzouris KC, Kalogiannis D, Christodoulou V 2016. Effects of maternal undernutrition during late gestation and/or lactation on colostrum synthesis and immunological parameters in the offspring. *Reprod. Fertil. Dev.* 28: 384–393.

Chaudhary J, Sadler-Riggleman I, Ague JM, Skinner MK 2005. The Helix-Loop-Helix Inhibitor of Differentiation (ID) Proteins Induce Post-Mitotic Terminally Differentiated Sertoli Cells to Re-Enter the Cell Cycle and Proliferate. *Biol. Reprod.* 72: 1205–1217.

Chechi K, McGuire JJ, Cheema SK 2009. Developmental programming of lipid metabolism and aortic vascular function in C57BL/6 mice: A novel study suggesting an involvement of LDL-receptor. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296.

Chen H, Ge R-S, Zirkin BR 2009. Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306: 9–16.

Chen L, Willis WD, Eddy EM 2016. Targeting the Gdnf Gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development. 113: 1829–

1834.

Courot M 1962. Développement du testicule chez l'agneau. Établissement de la spermatogenèse. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 2: 25–41.

Crispi F, Miranda J, Gratacós E 2018. Long-term cardiovascular consequences of fetal growth restriction: biology, clinical implications, and opportunities for prevention of adult disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 218: S869–S879.

Cusan L, Gordeladze J, Clausen PF, Parvinen M, Turner D 1981. Specific Stages of the Spermatogenic Cycle of the Rat. 919: 915–919.

Dadoune J-P 2007. New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem. Cytobiol.* 45: 141–147.

Dai MS, Hall SJ, Vantangoli Policelli MM, Boekelheide K, Spade DJ 2017. Spontaneous testicular atrophy occurs despite normal spermatogonial proliferation in a Tp53 knockout rat. *Andrology* 5: 1141–1152.

Damavandi E, Hishikawa Y, Izumi S, Shin M, Koji T 2002. Involvement of Bax Redistribution in the Induction of Germ Cell Apoptosis in Neonatal Mouse Testes. *Acta Histochem. Cytochem.* 35: 449–459.

Delbès G, Levacher C, Habert R 2006. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* 132: 527–538.

Devesa J, Caicedo D 2019. The role of growth hormone on ovarian functioning and ovarian angiogenesis. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 10: 1–17.

Dix D 1997. HSP 70 expression and function during gametogenesis. *Cell Stress Chaperones* 2: 73–79.

Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Poorman-Allen P, Mori C, Blizard DR, Brown PR, Goulding EH, Strong BD, Eddy EM 1997. HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* 124: 4595–4603.

Drake AJ, Walker BR, Seckl JR 2005. Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: 34–38.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH 1999. Mammalian caspases: structure,

activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 383–424.

Eddy EM 1999. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev. Reprod.* 4: 23–30.

El-Heis S, Godfrey K 2015. Developmental origins of health and disease. *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.* 25: 236–238.

Engelbregt MIAJT, Houdijk MECAM, Popp-snijders C, Chemistry C, Universiteit V, Amsterdam H V 2000. The Effects of Intra-Uterine Growth Retardation and Postnatal Undernutrition on Onset of Puberty in Male and Female Rats. *Pediatr. Res.* 48: 803–807.

Eo J, Song H, Lim HJ 2012. Etv5, a transcription factor with versatile functions in male reproduction. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 39: 41–45.

Erata GÖ, Koçak Toker N, Durlanık Ö, Kadıoğlu A, Aktan G, Aykaç Toker G 2008. The role of heat shock protein 70 (Hsp 70) in male infertility: is it a line of defense against sperm DNA fragmentation? *Fertil. Steril.* 90: 322–327.

Escott GM, Castro AL de, Jacobus AP, Loss ES 2014. Insulin and IGF-I actions on IGF-I receptor in seminiferous tubules from immature rats. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838: 1332–1337.

Eurell JA, Frappier B 2006. *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology* (JA Eurell and B Frappier, Eds.). Blackwell Publishing Professional, Iowa.

Fabbri E, Valbonesi P, Franzellitti S 2008. HSP expression in bivalves. *Invertebr. Surviv. J.*: 135–161.

Fazeli PK, Klibanski A 2014. Determinants of GH resistance in malnutrition. *J. Endocrinol.* 220: R57–R65.

Ferlin A, Speltra E, Patassini C, Pati MA, Garolla A, Caretta N, Foresta C 2010. Heat Shock Protein and Heat Shock Factor Expression in Sperm: Relation to Oligozoospermia and Varicocele. *J. Urol.* 183: 1248–1252.

Ferranti F, Muciaccia B, Ricci G, Dovere L, Canipari R, Magliocca F, Stefanini M, Catizone A, Vicini E 2012. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes invasive behaviour in testicular seminoma cells. *Int. J. Androl.* 35: 758–768.

Figueiredo AF, França LR, Hess RA, Costa G 2016. Sertoli cells are capable of proliferation into adulthood in the transition region between the seminiferous tubules and the rete testis in Wistar rats. *Cell Cycle* 15: 2486–2496.

Fouchécourt S, Godet M, Sabido O, Durand P 2006. Glial cell-line-derived neurotropic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis. *J. Endocrinol.* 190: 59–71.

Fowden AL, Giussani D a, Forhead AJ 2006. Intrauterine Programming of Physiological Systems: Causes and Consequences. *Physiology* 21: 29–37.

França LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC, Griswold MD 2016. The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* 4: 189–212.

Funston RN, Larson DM, Vonnahme KA 2010. Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: Implications for beef cattle production1. *J. Anim. Sci.* 88: E205–E215.

Furuchi T, Masuko K, Nishimune Y, Obinata M, Matsui Y 1996. Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development* 122: 1703–1709.

Furukawa F, Hamasaki S, Hara S, Uchimura T, Shiraishi E, Osafune N, Takagi H, Yazawa T, Kamei Y, Kitano T 2019. Heat shock factor 1 protects germ cell proliferation during early ovarian differentiation in medaka. *Sci. Rep.* 9: 1–10.

Gallo LA, Tran M, Moritz KM, Jefferies AJ, Wlodek ME 2012. Pregnancy in aged rats that were born small: Cardiorenal and metabolic adaptations and second-generation fetal growth. *FASEB J.* 26: 4337–4347.

Gartner L 2021. *Textbook of Histology - 5th Edition* (L Gartner, Ed.). Elsevier, Philadelphia.

Gaytan F, Lucena MC, Munoz E, Paniagua R 1986. Morphometric aspects of rat testis development. *J. Anat.* 145: 155–159.

Genovese P, Herrera E, Riaño V, Bielli A 2019. Subnutrition effects during pregnancy and lactation on mitosis, apoptosis and androgen receptor expression in the rat testis. *Reprod. Domest. Anim.* 54: 506–513.

Genovese P, Núñez M, Pombo C, Bielli A 2010. Undernutrition during foetal and

post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the adult rat. *Reprod Domest Anim.* 45: 233–236.

George LA, Zhang L, Tuersunjiang N, Ma Y, Long NM, Uthlaut AB, Smith DT, Nathanielsz PW, Ford SP 2012. Early maternal undernutrition programs increased feed intake, altered glucose metabolism and insulin secretion, and liver function in aged female offspring. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 302: R795–R804.

Georgopoulos C, Welch WJ 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 601–634.

Geslin M, Auperin B 2004. Relationship between changes in mRNAs of the genes encoding steroidogenic acute regulatory protein and P450 cholesterol side chain cleavage in head kidney and plasma levels of cortisol in response to different kinds of acute stress in the rainbow trout (O. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135: 70–80.

Gluckman PD, Hanson M a 2006. Evolution, development and timing of puberty. *Trends Endocrinol. Metab.* 17: 7–12.

Godfrey KM, Barker DJ 2001. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr.* 4: 611–624.

Griffeth RJ, Bianda V, Nef S 2014. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic Clin. Androl.* 24: 1–12.

Griswold MD, Oatley JM 2013. Concise review: Defining characteristics of mammalian spermatogenic stem cells. *Stem Cells* 31: 8–11.

Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander H, Agarwal A 2007. Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. : 325–330.

Guan Y, Liang G, Hawken PAR, Meachem SJ, Malecki IA, Ham S, Stewart T, Guan LL, Martin GB 2016. Nutrition affects Sertoli cell function but not Sertoli cell numbers in sexually mature male sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 28: 1152.

Guan Y, Malecki IA, Hawken PAR, Linden MD, Martin GB 2014. Under-nutrition reduces spermatogenic efficiency and sperm velocity, and increases sperm DNA damage in sexually mature male sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 149: 163–172.

Guan Y, Martin GB 2017. Cellular and molecular responses of adult testis to changes in nutrition: novel insights from the sheep model. *Reproduction* 154: R133–R141.

Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC 2009. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. *J. Physiol. Pharmacol.* 60: 17–35.

Gutiérrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA 2017. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update. *Gac. Med. Mex.* 153: 214–228.

Guzmán JR, Serrano A 2006. Alineamiento de frases y traducción: AlfraCOVALT y el procesamiento de corpus. *Sendebar. Boletín la Fac. Traductores e Interpret. Granada*: 169–186.

Gyrd-Hansen M, Nylandsted J, Jäättelä M 2004. Extra Views Heat Shock Protein 70 Promotes Cancer Cell Viability by Safeguarding Lysosomal Integrity. *Cell Cycle* 3: 1484–1485.

Hafez ESE and BH 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. *Séptima Edición.McGraw-Hill*: 40–44.

Haverfield JT, Stanton PG, Meachem SJ 2015. Adult Sertoli cell differentiation status in humans. In: *Sertoli Cell Biol.*,

Hazra R, Corcoran L, Robson M, McTavish KJ, Upton D, Handelsman DJ, Allan CM 2013. Temporal role of sertoli cell androgen receptor expression in spermatogenic development. *Mol. Endocrinol.* 27: 12–24.

Heindel JJ, Vandenberg LN 2015. Developmental origins of health and disease: A paradigm for understanding disease cause and prevention. *Curr. Opin. Pediatr.* 27: 248–253.

Hermo L, Pelletier R-M, Cyr DG, Smith CE 2010. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. (R-M Pelletier, Ed.). *Microsc. Res. Tech.* 73: 279–319.

Hess RA, Franca LR de 2009. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous

Epithelium. In: *Adv. Exp. Med. Biol.*,, pp. 1–15.

Hess RA, Schaeffer DJ, Eroschenko VP, Keen JE 1990. Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biol. Reprod.* 43: 517–524.

Hildorf S, Dong L, Thorup J, Clasen-Linde E, Yding Andersen C, Cortes D 2019. Sertoli Cell Number Correlates with Serum Inhibin B in Infant Cryptorchid Boys. *Sex. Dev.*

Ho SM, Cheong A, Adgent MA, Veevers J, Suen AA, Tam NNC, Leung YK, Jefferson WN, Williams CJ 2017. Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. *Reprod. Toxicol.* 68: 85–104.

Hochereau-de Reviers M, Courot M 1971. Sertoli cells and development of seminiferous epithelium. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 18: 573–583.

Hochereau-de Reviers MT, Monet-Kuntz C, Courot M 1987. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 34: 101–114.

Hochereau-de Reviers MT, Perreau C, Pisselet C, Locatelli A, Bosc M 1995. Ontogenesis of somatic and germ cells in sheep fetal testis. *Reproduction* 103: 41–46.

Hoffman F, Boretto E, Vitale S, Gonzalez V, Vidal G, Pardo MF, Flores MF, Garcia F, Bagnis G, Queiroz OCM, Rabaglino MB 2018. Maternal nutritional restriction during late gestation impairs development of the reproductive organs in both male and female lambs. *Theriogenology* 108: 331–338.

Horn MM, Ramos AR, Winkelmann L, Matte US, Goldani HA, Silveira TR 2006. Seminiferous epithelium of rats with food restriction and carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Int. Braz J Urol* 32: 94–99.

Howie GJ, Sloboda DM, Vickers MH 2012. Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. *Br. J. Nutr.* 108: 298–307.

Hyttel P, Sinowatz F, Vejlsted M 2010. *Essential of Domestic Animal Embryology.* (Saunders Elsevier, Ed.). Elsevier.

Ibáñez L, Lopez-Bermejo A, Diaz M, Zegher F De 2011. Catch-up growth in girls born small for gestational age precedes childhood progression to high adiposity. *Fertil. Steril.* 96: 220–223.

Iczkowski KA, Bostwick DG, Roche PC, Cheville JC 1998. Inhibin A is a sensitive and specific marker for testicular sex cord-stromal tumors. *Mod. Pathol.* 11: 774–779.

Izu H, Inouye S, Fujimoto M, Shiraishi K, Naito K, Nakai A 2004. Heat Shock Transcription Factor 1 Is Involved in Quality-Control Mechanisms in Male Germ Cells1. *Biol. Reprod.* 70: 18–24.

Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S, Söder O 2004. Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biol. Reprod.* 70: 290–296.

Jain S, Golde DW, Bailey R, Geffner ME, College M, York N 1998. Insulin-Like Growth Factor-I Resistance. *Endocr. Rev.* 19: 625–646.

Jan SZ, Hamer G, Repping S, Rooij DG de, Pelt AMM van, Vormer TL 2012. Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822: 1838–1850.

Jazwiec PA, Sloboda DM 2019. Nutritional adversity, sex and reproduction: 30 years of DOHaD and what have we learned? *J. Endocrinol.* 242: T51–T68.

Jha KN, Coleman AR, Wong L, Salicioni AM, Howcroft E, Johnson GR 2013. Heat Shock Protein 90 Functions to Stabilize and Activate the Testis-specific Serine/Threonine Kinases, a Family of Kinases Essential for Male Fertility. *J. Biol. Chem.* 288: 16308–16320.

Ji Z-L, Duan Y-G, Mou L-S, Allam J-P, Haidl G, Cai Z-M 2012. Association of heat shock proteins, heat shock factors and male infertility. *Asian Pacific J. Reprod.* 1: 76–84.

Ji YL, Wang H, Liu P, Zhao XF, Zhang Y, Wang Q, Zhang H, Zhang C, Duan ZH, Meng C, Xu DX 2011. Effects of maternal cadmium exposure during late pregnant period on testicular steroidogenesis in male offspring. *Toxicol. Lett.*

205: 69–78.

Jiang Y, Cai N-N, Zhao X-X, Zhu W-Q, Zhang J, Yang R, Tang B, Li Z-Y, Zhang X-M 2020. Decreased abundance of GDNF mRNA transcript in the immature Sertoli cells of cattle in response to protein kinase inhibitor staurosporine. *Anim. Reprod. Sci.* 214: 106303.

Johnston H, Baker PJ, Abel M, Charlton HM, Jackson G, Fleming L, Kumar TR, O'Shaughnessy PJ 2004. Regulation of Sertoli Cell Number and Activity by Follicle-Stimulating Hormone and Androgen during Postnatal Development in the Mouse. *Endocrinology* 145: 318–329.

Johnston DS, Olivas E, DiCandeloro P, Wright WW 2011. Stage-Specific Changes in GDNF Expression by Rat Sertoli Cells: A Possible Regulator of the Replication and Differentiation of Stem Spermatogonia. *Biol. Reprod.* 85: 763–769.

Johnston DS, Wright WW, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS, Jelinsky SA 2008. Stage-specific gene expression is a fundamental characteristic of rat spermatogenic cells and Sertoli cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 8315–8320.

Junqueira LC, Carneiro J 2015. *Histología básica texto y atlas* (E Panamericana, Ed.). Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.

Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE 2009. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14: 105–111.

Kaur G, Thompson LA, Dufour JM 2014. Sertoli cells - Immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 30: 36–44.

Kerr JB 1988a. A light microscopic and morphometric analysis of the Sertoli cell during the spermatogenic cycle of the rat. *Anat. Embryol. (Berl).* 177: 341–348.

Kerr JB 1988b. An ultrastructural and morphometric analysis of the Sertoli cell during the spermatogenic cycle of the rat. *Anat. Embryol. (Berl).* 179: 191–203.

Kerr JB, Loveland KL, O´Bryan M., Krester DM De 2006. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: Elsevier (Ed.), *Knobil Neill's Physiol.*

Reprod. vol.1., J.D. Neil, Knobil, T. M. Plant, St Louis: Elsev, pp. 827–947.

Kluin PM, Kramer MF, Rooij DG 1984. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat. Embryol. (Berl).* 169: 73–78.

Kojima S, Hatano M, Okada S, Fukuda T, Toyama Y, Yuasa S, Ito H, Tokuhisa T 2001. Testicular germ cell apoptosis in Bcl6-deficient mice. *Development* 128: 57–65.

Kopera IA, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD 2010. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365: 1593–1605.

Kotsampasi B, Chadio S, Papadomichelakis G, Deligeorgis S, Kalogiannis D, Menegatos I, Zervas G 2009. Effects of Maternal Undernutrition on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis Function in Female Sheep Offspring. *Reprod. Domest. Anim.* 44: 677–684.

Kretser DM De, Buzzard JJ, Okuma Y, O'Connor AE, Hayashi T, Lin SY, Morrison JR, Loveland KL, Hedger MP 2004. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. In: *Mol. Cell. Endocrinol.*,, pp. 57–64.

Kretser DM de, Robertson DM 1989. The Isolation and Physiology of Inhibin and Related Proteins. *Biol. Reprod.* 40: 33–47.

Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL 2004. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 16489–16494.

Kulibin AY, Malolina EA 2016. Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture. *Reproduction* 152: 271–281.

Lagarrigue M, Becker M, Lavigne R, Deininger S-O, Walch A, Aubry F, Suckau D, Pineau C 2011. Revisiting Rat Spermatogenesis with MALDI Imaging at 20-μm Resolution. *Mol. Cell. proteomics* 10: M110.005991.

Lagos-Cabré R, Moreno RD 2008. Mitotic, but not meiotic, oriented cell divisions in rat spermatogenesis. *Reproduction* 135: 471–478.

Lakshmy R 2013. Metabolic syndrome: Role of maternal undernutrition and fetal programming. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 14: 229–240.

Langley-Evans SC, Muhlhausler BS 2018. Early Nutrition, Epigenetics, and Human Health. In: *Epigenetics Aging Longev.*, Elsevier, pp. 229–250.

Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C 2008. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J. Cell. Mol. Med.* 12: 743–761.

Lawson K a, Meneses JJ, Pedersen R a 1991. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 113: 891–911.

Leblond CP, Clermont Y 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55: 548–573.

Lesage J, Hahn D, Léonhardt M, Blondeau B, Bréant B, Dupouy JP 2002. Maternal undernutrition during late gestation-induced intrauterine growth restriction in the rat is associated with impaired placental GLUT3 expression, but does not correlate with endogenous corticosterone levels. *J. Endocrinol.* 174: 37–43.

Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404: 411–414.

Mackay S 2000. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *Int. Rev. Cytol.* 200: 47–99.

Magre S, Jost A 1991. Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *J. Electron Microsc. Tech.* 19: 172–188.

Maio A De, Gabriella Santoro M, Tanguay RM, Hightower LE 2012. Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: A new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress Chaperones* 17: 139–143.

Majdic G, Saunders PT, Teerds KJ 1998. Immunoexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17 alpha-hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biol. Reprod.* 58: 520–525.

Makanji Y, Zhu J, Mishra R, Holmquist C, Wong WPS, Schwartz NB, Mayo KE,

Woodruff TK 2014. Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review. *Endocr. Rev.* 35: 747–794.

Maki CB, Pacchiarotti J, Ramos T, Pascual M, Pham J, Kinjo J, Anorve S, Izadyar F 2009. Phenotypic and molecular characterization of spermatogonial stem cells in adult primate testes. *Hum. Reprod.* 24: 1480–1491.

Malolina EA, Kulibin AY 2017. Rete testis and the adjacent seminiferous tubules during postembryonic development in mice. *Russ. J. Dev. Biol.* 48: 385–392.

Maule M, Malavassi JL, Richiardi L 2012. Age at puberty and risk of testicular cancer: A meta-analysis. *Int. J. Androl.* 35: 828–834.

Mazaud-Guittot S, Meugnier E, Pesenti S, Wu X, Vidal H, Gow A, Magueresse-Battistoni B Le 2010. Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the sertoli cell epithelial phenotype in the testis. *Biol. Reprod.* 82: 202–213.

McLachlan RI, Wreford NG, O'Donnell L, Kretser DM De, Robertson DM 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis: Independent roles for testosterone and FSH. *J. Endocrinol.* 148: 1–9.

Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M 2001. Inhibin B in male reproduction: Pathophysiology and clinical relevance. *Eur. J. Endocrinol.*

Means AR, Dedman JR, Tash JS 1980. Regulation of the testis Sertoli cell by follicle stimulating hormone. *Annu. Rev. Physiol.*

Meehan T, Loveland KL, Kretser D De, Cory S, Print CG 2001. Developmental regulation of the bcl-2 family during spermatogenesis: Insights into the sterility of bcl-w-l-male mice. *Cell Death Differ.*

Meistrich ML, Hess RA Assessment of Spermatogenesis Through Staging of Seminiferous Chapter 27 Assessment of Spermatogenesis Through Staging of Seminiferous Tubules.

Meistrich ML, Hess RA 2013. Assessment of Spermatogenesis Through Staging of Seminiferous TubulesSpermatogenesis. In: Carrell DT, Aston KI (Eds.), *Spermatogenes. Methods Protoc. Methods Mol. Biol.*, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, p. .

Mendis-Handagama SMLC, Ariyaratne HBS 2001. Differentiation of the adult

Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol. Reprod.* 65: 660–671.

Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HBB, Teunissen van Manen KR, Haupt RL 1998. Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biol. Reprod.* 59: 351–357.

Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, Rooij DG De, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M, Sariola H 2000. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science (80-.).* 287: 1489–1493.

Mital P, Kaur G, Bowlin B, Paniagua NJ, Korbutt GS, Dufour JM 2014. Nondividing, postpubertal rat sertoli cells resumed proliferation after transplantation. *Biol. Reprod.* 90: 13.

Moffit JS, Her LS, Mineo AM, Knight BL, Phillips JA, Thibodeau MS 2013. Assessment of Inhibin B as a Biomarker of Testicular Injury Following Administration of Carbendazim, Cetrorelix, or 1,2-Dibromo-3-Chloropropane in Wistar Han Rats. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* 98: 17–28.

Moreno SG, Attali M, Allemand I, Messiaen S, Fouchet P, Coffigny H, Romeo P-H, Habert R 2010. TGFbeta signaling in male germ cells regulates gonocyte quiescence and fertility in mice. *Dev. Biol.* 342: 74–84.

Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S, Shiota K, Eddy EM 1997. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice. *Dev. Dyn.* 208: 125–136.

Neirijnck Y 2018. Insulin and IGF1 receptors are essential for the development and steroidogenic function of adult Leydig cells. *FASEB J.* 32: 3321–3335.

Neirijnck Y, Calvel P, Kilcoyne KR, Kühne F, Stévant I, Griffeth RJ, Pitetti J-L, Andric SA, Hu M-C, Pralong F, Smith LB, Nef S 2018a. Insulin and IGF1 receptors are essential for the development and steroidogenic function of adult Leydig cells. *FASEB J.* 32: 3321–3335.

Neirijnck Y, Calvel P, Kilcoyne KR, Kühne F, Stévant I, Griffeth RJ, Pitetti JL, Andric SA, Hu MC, Pralong F, Smith LB, Nef S 2018b. Insulin and IGF1 receptors are essential for the development and steroidogenic function of adult

Leydig cells. *FASEB J.* 32: 3321–3335.

Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS 2000. The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum. Reprod. Update* 6: 149–159.

Nicholls PK, Stanton PG, Chen JL, Olcorn JS, Haverfield JT, Qian H, Walton KL, Gregorevic P, Harrison CA 2012. Activin signaling regulates sertoli cell differentiation and function. *Endocrinology* 153: 6065–6077.

Niino K, Yamakawa M, Yamaguchi K 2000. Heat Shock Protein 72/73was Expressed Ubiquitouslyon Follicular DendriticCells in Lymphoid Follicles. *J. Clin. Exp. Hematop.* 41: 51–60.

Noguchi J, H Hikono H, Sato S, Watanabe G, Taya K, Sasamoto S, Hasegawa Y, Sato S, Watanabe G, Taya K, Sasamoto S, Hasegawa Y 1997a. Ontogeny of inhibin secretion in the rat testis: secretion of inhibin-related proteins from fetal Leydig cells and of bioactive inhibin from Sertoli cells. *J. Endocrinol.* 155: 27–34.

Noguchi J, Hikono H, Sato S, Watanabe G, Taya K, Sasamoto S, Hasegawa Y 1997b. Ontogeny of inhibin secretion in the rat testis: secretion of inhibin-related proteins from fetal Leydig cells and of bioactive inhibin from Sertoli cells. *J. Endocrinol.* 155: 27–34.

O'Bryan MK, Grealy A, Stahl PJ, Schlegel PN, McLachlan RI, Jamsai D 2012. Genetic variants in the ETV5 gene in fertile and infertile men with nonobstructive azoospermia associated with Sertoli cell-only syndrome. *Fertil. Steril.* 98: 827–835.

O'Shaughnessy P 2015. Testicular Development. In: *Knobil Neill's Physiol. Reprod.*, Elsevier, pp. 567–594.

O'Shaughnessy PJ, Fowler P a 2011. Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction* 141: 37–46.

Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL 2007. Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 282: 25842–25851.

Oatley J, Tibary A, Avila D de, Wheaton J, McLean D, Reeves J 2005. Changes in spermatogenesis and endocrine function in the ram testis due to irradiation and active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. *J. Anim. Sci.* ... 83: 604–612.

Oestreich AK, Moley KH 2017. Developmental and Transmittable Origins of Obesity-Associated Health Disorders. *Trends Genet.* 33: 399–407.

Ogi S, Tanji N, Iseda T, Yokoyama M Expression of heat shock proteins in developing and degenerating rat testes. *Arch. Androl.* 43: 163–171.

Ohsako S, Bunick D, Hayashi Y 1995. Immunocytochemical observation of the 90 KD heat shock protein (HSP90): high expression in primordial and pre-meiotic germ cells of male and female rat gonads. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 67–76.

Oka S, Shiraishi K, Fujimoto M, Katiyar A, Takii R, Nakai A, Matsuyama H 2017. Role of heat shock factor 1 in conserving cholesterol transportation in leydig cell steroidogenesis via steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 158: 2648–2658.

Orth JM 1982. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.* 203: 485–492.

Orth J, Weisz J 1980. Development of Δ5-3β hydroxysteroid dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Leydig cells of the fetal rat testis: A quantitative cytochemical study. *Biol. Reprod.* 22: 1201–1209.

Pampanini V, Germani D, Puglianiello A, Stukenborg JB, Reda A, Savchuk I, Kjartansdóttir KR, Cianfarani S, Söder O 2017. Impact of uteroplacental insufficiency on postnatal rat male gonad. *J. Endocrinol.* 232: 247–257.

Pawlina W 2016. *Ross – Histología Texto y Atlas (7° Edición)* (Woltes Kluwer, Ed.). Wolters Kluwer, Barcelona.

Payne H, Hardy MP 2007. *The Leydig Cell in Health and Disease* (AH Payne and MP Hardy, Eds.). Humana Press, Totowa, NJ.

Pedrana G, Viotti MH, Souza E, Sloboda D, Martin GB, Cavestany D, Ortega HH 2013. Apoptosis-related protein expression during pre- and post-natal testicular development after administration of glucocorticoid in utero in the sheep.

Reprod. Domest. Anim. 48: 795–802.

Perey B, Clermont Y, Leblond CP 1961. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.* 108: 47–77.

Petersen C, Soder O 2006. The sertoli cell--a hormonal target and "super" nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm. Res.* 66: 153–161.

Phillips BT, Gassei K, Orwig KE 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365: 1663–1678.

Pineau C, Sharpe RM, Saunders PTK, Gérard N, Jégou B 1990. Regulation of Sertoli cell inhibin production and of inhibin α-subunit mRNA levels by specific germ cell types. *Mol. Cell. Endocrinol.* 72: 13–22.

Pitetti J-L, Calvel P, Zimmermann C, Conne B, Papaioannou MD, Aubry F, Cederroth CR, Urner F, Fumel B, Crausaz M, Docquier M, Herrera PL, Pralong F, Germond M, Guillou F, Jégou B, Nef S 2013a. An Essential Role for Insulin and IGF1 Receptors in Regulating Sertoli Cell Proliferation, Testis Size, and FSH Action in Mice. *Mol. Endocrinol.* 27: 814–827.

Pitetti J-L, Calvel P, Zimmermann C, Conne B, Papaioannou MD, Aubry F, Cederroth CR, Urner F, Fumel B, Crausaz M, Docquier M, Herrera PL, Pralong F, Germond M, Guillou F, Jégou B, Nef S 2013b. An Essential Role for Insulin and IGF1 Receptors in Regulating Sertoli Cell Proliferation, Testis Size, and FSH Action in Mice. *Mol. Endocrinol.* 27: 814–827.

Purandhar K, Jena PK, Prajapati B, Rajput P, Seshadri S 2014. Understanding the role of heat shock protein isoforms in male fertility, aging and apoptosis. *World J. Mens. Health* 32: 123–132.

Radlowska M, Pempkowiak J 2002. Stress-70 as indicator of heavy metals accumulation in blue mussel Mytilus edulis. *Environ. Int.* 27: 605–608.

Rae MT, Rhind SM, Fowler P a, Miller DW, Kyle CE, Brooks a N 2002. Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses. *Reproduction* 124: 33–39.

Ramaswamy S, Weinbauer GF 2014. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis* 4: e996025 1-15.

Regato JA Del 1976. Claudius Regaud. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1: 993–1001.

Rhind SM, Rae MT, Nigel Brooks a. 2001. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122: 205–214.

Richardson LL, Kleinman HK, Dym M 1995. Basement membrane gene expression by Sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. *Biol. Reprod.* 52: 320–330.

Risbridger GP 1996. Regulation of Leydig cell function by inhibins and activins. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 343–349.

Risbridger GP, Clements J, Robertson DM, Drummond AE, Muir J, Burger HG, Kretser DM de 1989. Immuno- and bioactive inhibin and inhibin α-subunit expression in rat Leydig cell cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 66: 119–122.

Rodríguez-González GL, Reyes-Castro LA, Vega CC, Boeck L, Ibáñez C, Nathanielsz PW, Larrea F, Zambrano E 2014. Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. *Age (Omaha).* 36: 9721 1-12.

Rodriguez-Gonzalez GL, Reyes L, Vega C, Saldana-Ahuactzi O, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E 2012. Maternal protein restriction during pregnancy leads to alteration in oxidative stress in the testis of male offspring. *Reprod. Sci.* 19: 321–326.

Rodríguez-González GL, Vigueras-Villaseñor RM, Millán S, Moran N, Trejo R, Nathanielsz PW, Larrea F, Zambrano E 2012. Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 3: 321–326.

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.

Röhl A, Rohrberg J, Buchner J 2013. The chaperone Hsp90: changing partners for demanding clients. *Trends Biochem. Sci.* 38: 253–262.

Rooij DG de 2015. The spermatogonial stem cell niche in mammals. In: Michael D. Griswold (Ed.), *Sertoli Cell Biol.*, Elsevier, Oxford, UK, pp. 99–121.

Rooij DG de, Russell LD 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* 21: 776–798.

Rossi P, Dolci S 2013. Paracrine Mechanisms Involved in the Control of Early Stages of Mammalian Spermatogenesis. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 4: 1–8.

Rouiller-Fabre V, Levacher C, Pairault C, Racine C, Moreau E, Olaso R, Livera G, Migrenne S, Delbes G, Habert R 2003. Development of the foetal and neonatal testis. *Andrologia* 35: 79–83.

Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ, Knudson CM 2002. Bax-Dependent spermatogonia spoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 66: 950–958.

Russell LD, Peterson RN 1984. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fertil.* 70: 635–641.

Ryu B-Y, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL 2005. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 14302–14307.

Sadler T 2019. *Langman Embriología Médica.* Wolters Kluver, Barcelona.

Sagare-Patil V, Bhilawadikar R, Galvankar M, Zaveri K, Hinduja I, Modi D 2017. Progesterone requires heat shock protein 90 (HSP90) in human sperm to regulate motility and acrosome reaction. *J. Assist. Reprod. Genet.* 34: 495–503.

Said TM, Gaglani A, Agarwal A 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod. Biomed. Online* 21: 456–462.

Salmand PA, Jungas T, Fernandez M, Conter A, Christians ES 2008. Mouse Heat-Shock Factor 1 (HSF1) Is Involved in Testicular Response to Genotoxic Stress Induced by Doxorubicin1. *Biol. Reprod.* 79: 1092–1101.

Salo DC, Donovan CM, Davies KJA 1991. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic. Biol. Med.*

Sarge KD, Cullen KE 1997. Regulation of hsp expression during rodent

spermatogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 53: 191–197.

Saribek B, Jin Y, Saigo M, Eto K, Abe S 2006. HSP90β is involved in signaling prolactin-induced apoptosis in newt testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349: 1190–1197.

Schlesser HN, Simon L, Hofmann M-C, Murphy KM, Murphy T, Hess R a, Cooke PS 2008a. Effects of ETV5 (ets variant gene 5) on testis and body growth, time course of spermatogonial stem cell loss, and fertility in mice. *Biol. Reprod.* 78: 483–489.

Schlesser HN, Simon L, Hofmann MC, Murphy KM, Murphy T, Hess RA, Cooke PS 2008b. Effects of ETV5 (Ets variant gene 5) on testis and body growth, time course of spermatogonial stem cell loss, and fertility in mice. *Biol. Reprod.* 78: 483–489.

Scholzen T, Gerdes J 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182: 311–322.

Scott H, Mason J, Sharpe R 2009. Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr. Rev.* 30: 883–925.

Seckl JR, Holmes MC 2007. Mechanisms of Disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3: 479–488.

Selim ME, Rashed EHA, Aleisa NA, Daghestani MH 2012. The protection role of heat shock protein 70 (HSP-70) in the testes of cadmium-exposed rats. *Bioinformation* 8: 58–64.

Setchell B, Breed W 2006. Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. In: Academic press (Ed.), *Knobil Neill's Physiol. Reprod.*, Elsevier, pp. 771–825.

Shaha C, Tripathi R, Prasad Mishra D 2010. Male germ cell apoptosis: Regulation and biology. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365: 1501–1515.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in

adulthood. *Reproduction* 125: 769–784.

Sharpe RM, Turner KJ, McKinnell C, Groome NP, Atanassova N, Millar MR, Buchanan DL, Cooke PS 1999. Inhibin B levels in plasma of the male rat from birth to adulthood: Effect of experimental manipulation of sertoli cell number. *J. Androl.* 20: 94–101.

Simon L, Ekman G, Garcia T, Carnes K, Zhang Z, Murphy T, Murphy KM, Hess RA, Cooke PS, Hofmann M-C 2010. ETV5 regulates sertoli cell chemokines involved in mouse stem/progenitor spermatogonia maintenance. *Stem Cells* 28: 1882–1892.

Singh D, Paduch DA, Schlegel PN, Orwig KE, Mielnik A, Bolyakov A, Wright WW 2017. The production of glial cell line-derived neurotrophic factor by human sertoli cells is substantially reduced in sertoli cell-only testes. *Hum. Reprod.* 32: 1108–1117.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod.* 16: 972–978.

Sloboda DM, Moss TJM, Li S, Doherty DA, Nitsos I, Challis JRG, Newnham JP 2005. Hepatic glucose regulation and metabolism in adult sheep: effects of prenatal betamethasone. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289: E721–E728.

Smith T, Sloboda DM, Saffery R, Joo E, Vickers MH 2014. Maternal nutritional history modulates the hepatic IGF-IGFBP axis in adult male rat offspring. *Endocrine* 46: 70–82.

Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109: 323–330.

Sofikitis N, Pappas E, Kawatani a, Baltogiannis D, Loutradis D, Kanakas N, Giannakis D, Dimitriadis F, Tsoukanelis K, Georgiou I, Makrydimas G, Mio Y, Tarlatzis V, Melekos M, Miyagawa I 2005. Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Hum. Reprod. Update* 11: 229–259.

Soliman A, Sanctis V De, Elalaily R 2014. Nutrition and pubertal development. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 18: S39–S47.

Spinnler K, Kohn FM, Schwarzer U, Mayerhofer A 2010. Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum. Reprod.* 25: 2181–2187.

Squires EJ 2006. *Endocrinología animal aplicada* (Editorial Acribia, Ed.). Acribia, Zaragoza.

Sreedhar AS, Kalmár É, Csermely P, Shen YF 2004. Hsp90 isoforms: Functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 562: 11–15.

Steinberger A, Steinberger E 1971. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biol. Reprod.* 4: 84–87.

Storgaard L, Bonde JP, Olsen J 2006. Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure. A review of published epidemiological studies. *Reprod. Toxicol.* 21: 4–15.

Strohsnitter WC, Kenneth L, Hoover RN, Stanley J, Palmer JR, Raymond H, Adam E, Arthur L, Hatch EE 2001. Cancer Risk in Men Exposed In Utero to Diethylstilbestrol Background: An association between prenatal diethylstilbestrol (DES) expo- been inconsistent . This study was con- ducted to investigate the association between prenatal DES exposure and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 545–551.

Suescun M, Suescun M, Lustig L, Calandra R, Calandra R, Groome N, Campo S 2004. Correlation between inhibin secretion and damage of seminiferous tubules in a model of experimental autoimmune orchitis. *J. Endocrinol.* 170: 113–120.

Sugimoto R, Nabeshima Y-I, Yoshida S 2011. Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of Sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. *Mech. Dev.* 128: 610–624.

Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y 2002. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway.

Mech. Dev. 113: 29–39.

Tancini F, Wu YL, Schweizer WB, Gisselbrecht JP, Boudon C, Jarowski PD, Beels MT, Biaggio I, Diederich F 2012. 1,1-Dicyano-4-[4-(diethylamino)phenyl]buta-1,3-dienes: Structure-property relationships. *European J. Org. Chem.* 73: 2756–2765.

Tapanainen J, Kuopio T, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I 1984. Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity. *Biol. Reprod.* 31: 1027–1035.

Tarulli GA, Stanton PG, Loveland KL, Meyts ER-D, McLachlan RI, Meachem SJ 2013. A survey of Sertoli cell differentiation in men after gonadotropin suppression and in testicular cancer. *Spermatogenesis* 3: e24014 1-7.

Tarulli G a, Stanton PG, Meachem SJ 2012. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? *Biol. Reprod.* 87: 13, 1–11.

Teixeira CV, Silandre D, Souza Santos AM de, Delalande C, Sampaio FJB, Carreau S, Fonte Ramos C da 2007. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J. Endocrinol.* 192: 301–311.

Toledo FC, Perobelli JE, Pedrosa FPC, Anselmo-Franci JA, Kempinas WDG 2011. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9: 94.

Tung PS, Rosenior J, Fritz IB 1987. Isolation and culture of ram rete testis epithelial cells: structural and biochemical characteristics. *Biol. Reprod.* 36: 1297–1312.

Tyagi G, Carnes K, Morrow C, Kostereva N V., Ekman GC, Meling DD, Hostetler C, Griswold M, Murphy KM, Hess RA, Hofmann MC, Cooke PS 2009. Loss of Etv5 decreases proliferation and RET levels in neonatal mouse testicular germ cells and causes an abnormal first wave of spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 81: 258–266.

Varvarigou A a 2010. Intrauterine growth restriction as a potential risk factor for disease onset in adulthood. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 23: 215–224.

Vergouwen RP, Jacobs SG, Huiskamp R, Davids JA, Rooij DG De 1991.

Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J. Reprod. Fertil.* 93: 233–243.

Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, Swanson JM 2009. Developmental origins of health and disease: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin. Reprod. Med.* 27: 358–368.

Walker WH, Cheng J 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130: 15–28.

Wallace JM 2000. Nutrient partitioning during pregnancy: adverse gestational outcome in overnourished adolescent dams. *Proc. Nutr. Soc.* 59: 107–117.

Wang ZX, Wreford NGM, Kretser DM De 1989. Determination of Sertoli cell numbers in the developing rat testis by stereological methods. *Int. J. Androl.* 12: 58–64.

Ward SS, Stickland NC 1991. Why are slow and fast muscles differentially affected during prenatal undernutrition? *Muscle Nerve* 14: 259–267.

Wiater E, Lewis KA, Donaldson C, Vaughan J, Bilezikjian L, Vale W 2009. Endogenous Betaglycan Is Essential for High-Potency Inhibin Antagonism in Gonadotropes. *Mol. Endocrinol.* 23: 1033–1042.

Wing T -Y, Christensen AK 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am. J. Anat.* 165: 13–25.

Winter JP de, Timmerman MA, Vanderstichele HM, Klaij IA, Grootenhuis AJ, Rommerts FF, Jong FH de 1992. Testicular Leydig cells in vitro secrete only inhibin alpha-subunits, whereas Leydig cell tumors can secrete bioactive inhibin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 83: 105–115.

Workman P, Powers M V 2007. Chaperoning cell death: a critical dual role for Hsp90 in small-cell lung cancer. *Nat. Chem. Biol.* 3: 455–457.

Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE 2004. Maternal nutrition and fetal development. *J. Nutr.* 134: 2169–2172.

Yagci A, Zik B 2006. Immunohistochemical Localization of Insulin-Like Growth Factor-I Receptor (IGF-IR) in the Developing and Mature Rat Testes. *Anat. Histol. Embryol. J. Vet. Med. Ser. C* 35: 305–309.

10. ANEXOS

Journal of Developmental Origins of Health and Disease

www.cambridge.org/doh

Maternal undernutrition during pregnancy and lactation affects testicular morphology, the stages of spermatogenic cycle, and the testicular IGF-I system in adult offspring

Graciela Pedrana[1], Helen Viotti[1], Paula Lombide[1], Daniel Cavestany[1], Graeme B. Martin[2], Mark H. Vickers[3] and Deborah M. Sloboda[4,5,6,7]

[1]Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; [2]School of Agriculture and Environment, Faculty of Science, and UWA Institute of Agriculture, University of Western Australia, Perth, Australia; [3]Liggins Institute, University of Auckland, Auckland, New Zealand; [4]Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, McMaster University, Hamilton, Canada; [5]Department of Obstetrics and Gynecology, McMaster University, Hamilton, Canada; [6]Department of Pediatrics, McMaster University, Hamilton, Canada and [7]Farncombe Family Digestive Health Research Institute, McMaster University, Hamilton, Canada

Original Article

Cite this article: Pedrana G, Viotti H, Lombide P, Cavestany D, Martin GB, Vickers MH, and Sloboda DM. (2020) Maternal undernutrition during pregnancy and lactation affects testicular morphology, the stages of spermatogenic cycle, and the testicular IGF-I system in adult offspring. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* **11**: 473–483. doi: 10.1017/S2040174420000306

Received: 15 November 2019
Revised: 1 March 2020
Accepted: 25 March 2020
First published online: 28 April 2020

Keywords:
Undernutrition; developmental-programming; reproduction; testis

Address for correspondence:
Graciela Pedrana, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Email: gpedrana@gmail.com

Abstract

Maternal undernutrition decreases sperm production in male offspring, possibly through insulin-like growth factor (IGF-I). To test this hypothesis, we fed pregnant Wistar rats *ad libitum* with a standard diet (CONTROL) or fed 50% of CONTROL intake, either throughout pregnancy (UNP), lactation (UNL, or both (UNPL). After weaning, male offspring ($n = 10$ per treatment) were fed a standard diet until postnatal day 160, when testes process for histological and molecular analyses. IGF-I immunostaining area and intensity in the testis were greater ($P = 0.003$) in the UNPL group compared to CONTROL, but lower in the UNP group ($P < 0.0001$). Levels of IGF-I receptor transcript were lower in the UNPL and UNL groups, compared to CONTROL. There were more Ki-67-positive germ and Sertoli cells, in all underfed groups than in CONTROL. Compared to CONTROL, frequency of spermatogenic cycle stage VII was lower in all underfed groups, and seminiferous tubule diameter was smaller in UNP and UNPL. Plasma FSH concentrations were greater in UNP male offspring compared to all groups ($P = 0.05$), whereas inhibin B concentrations were greater in UNP ($P = 0.01$) and UNL ($P = 0.003$) than in CONTROL or UNPL. Thus, prenatal undernutrition leads to a decrease in testicular IGF-I levels, whereas of pre- and postnatal undernutrition increased testicular IGF-I levels and decreased amounts of IGF-I receptor mRNA in adult offspring. We conclude that maternal undernutrition during pregnancy and lactation leads to long-lasting effects on adult male offspring testicular morphology, spermatogenesis, and IGF-I testicular system.

Introduction

Early-life undernutrition has been associated with a number of postnatal risk factors with an increased propensity for the development of cardiometabolic disorders including type 2 diabetes, hypertension, and obesity.[1] This developmental programming via an adverse intrauterine environment also negatively impacts on reproductive outcomes via changes in the key cellular signaling pathways related to female reproductive development and function[2] and associated impairments in ovarian follicular growth and development.[3-5]

In males, restriction of maternal protein or caloric intake results in early onset of puberty, reductions in the secretion of key reproductive hormones (follicle-stimulating hormone, FSH; testosterone), and, in adulthood, altered activities of key steroidogenic enzymes.[6] This manifests as fewer spermatogonia, spermatocytes, spermatids, a decrease in Leydig cell numbers, and poor sperm quality.[7,8] This impairment of spermatogenesis is associated with a reduction in Sertoli cell (SC) number,[9] an important observation in the context of developmental programming as SC number is maximized at puberty and is the major determinant of adult sperm production. In other animal models, such as the adult sheep, short periods of undernutrition disrupt the tight junction protein, claudin, in the testis, and lead to retention of characteristics associated with immature SCs, consistent with de-differentiation.[10] Together these data suggest that the proliferation and differentiation of SCs are vulnerable to early-life undernutrition, leading to long-lasting impacts on adult male testicular morphology, spermatogenic capacity, and ultimately fertility.

In the search for mechanistic links between nutrition and testis development, the growth hormone (GH) – insulin-like growth factor (IGF-I) axis – has been shown to play a role in normal testicular development and function. *In vitro* approaches utilizing Leydig and SC cultures

© Cambridge University Press and the International Society for Developmental Origins of Health and Disease 2020.

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. IP address: 167.58.109.33, on 16 Sep 2020 at 13:12:02, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S2040174420000306

have revealed complex interactions between GH/IGF-I and the gonadotropins affecting differentiated cell functions, for example, steroidogenesis and cell division.[11] *In vivo* studies using rodents with altered GH/IGF status, for example, GH deficiency, have shown that IGF-I can play an important role in the regulation of steroidogenesis and spermatogenesis. The GH–IGF axis is altered by changes in nutrition with undernutrition elevating circulating concentrations of GH but reducing the concentrations of IGF-I.[12,13] In addition, IGF-I concentrations are reduced following early-life treatment with betamethasone, typically used in management of premature birth.[14] IGF-I is a 70-amino acid peptide that is coded by the *Igf1*gene. It has sequence homology with IGF-II and insulin, and all three peptides have *A* and *B* chains linked by disulphide bonds.[15] Sometimes called somatomedins, IGF-I and IGF-II, are pleiotropic growth factors that were first described in cartilage tissue[16] but are known to play key roles in growth and differentiation.[17,18] Indeed, IGF-I deficiency leads to idiopathic short stature in childhood,[19,20] as well as deregulation of lipid metabolism and glucose metabolism, leading to cardiovascular disease and diabetes, and cell proliferation, differentiation, and apoptosis, leading to increased risk of cancer.[21-23]

Although IGF-I is generally seen as an endocrine factor produced primarily by the liver, it is also a paracrine factor produced by other tissues, including the testis[24] where it plays a role in testicular differentiation during embryogenesis, including the proliferation and development of SCs and germ cells.[25] The proliferation of immature SCs is controlled primarily by FSH but involves other processes that depend on the insulin/IGF signaling pathway.[25] The IGFs produced by SCs stimulate spermatogenesis, and thus sperm output, and act on Leydig cells in synergism with luteinizing hormone to increase androgen production before puberty.[26] Leydig cell androgen production is determined by several steroidogenic enzymes, such as 3 beta hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD), and other factors that maintain cholesterol transport, such as heat shock factor 1 (HSF1) that aids the recovery of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) under chronic heat stress.[27] Most of the actions of IGF-I and IGF-II in reproductive tissues are mediated by the type 1 IGF receptor (IGF1R).[25,28] Moreover, treatment with GH and IGF-I in the GH-deficient rat has been shown to impact on key markers of sperm function including increasing sperm motility and improving morphology of immature spermatozoa.[29,30]

The effects of maternal undernutrition on offspring testicular function including spermatogenesis remain poorly defined. Therefore, in the present study, we utilized a rat model of moderate maternal undernutrition throughout pregnancy and/or lactation to investigate cellular proliferation, spermatogenesis, IGF-I and its receptor (IGF1R), and circulating FSH and inhibin concentrations in adult male offspring.

We hypothesized that maternal undernutrition would alter testicular functions by affecting IGF-I testicular system.

Materials and methods

Animal model

All animal work and experiments were performed and approved under the guidelines of the Animal Ethics Committee of the University of Auckland (R402). In the present study, we used an established model of developmental programming via maternal nutrient manipulation developed previously (Vickers *et al.* 2000).[31-33] Female Wistar rats (120 days old; $n = 24$) were sourced from the Vernon Jansen Unit at the University of Auckland, where the animal model was developed. Female rats were time-mated using a rat estrous cycle monitor (Fine Science Tools, Foster City, CA, USA) and thereafter were housed individually in standard rat cages with free access to water and kept in the same room with a constant temperature of 25°C and a 12:12 light: dark cycle. Pregnant dams (six dams per group) were randomly allocated among four treatments: (1) CONTROL in which dams were fed *ad libitum* throughout pregnancy and lactation with a standard diet (protein 18%, fat 5%; digestible energy 3.4 kcal/g; Teklad Global 18% Protein Diet, Diet 2018); (2) Undernourished dams fed 50% of CONTROL intake throughout Pregnancy and Lactation (UNPL); (3) Undernourished dams fed 50% of CONTROL intake throughout Pregnancy only (UNP); and (4) Undernourished dams fed 50% of CONTROL intake throughout Lactation only (UNL).

Body mass and age at puberty

After birth, pups were weighed and litter size was adjusted to eight pups (four males and four females) per litter to ensure standardized nutrition until weaning at day 22. After weaning, male pups were housed in pairs and fed a standard chow diet *ad libitum* until the end of the trial (160 days). From postnatal day 27, offspring were weighed and checked daily for markers of reproductive maturity balano-preputial separation in males, for onset of puberty.

Tissue processing

At 160 days of age, male offspring ($n = 40$) were fasted overnight, weighed, and killed by decapitation following pentobarbitone anesthesia (60 mg/kg, intraperitoneally). Blood was collected into heparinized vacutainers tubes and centrifuged (2400×*g*, 20 min), and plasma was stored at −20°C for future analysis. The values for body mass and total testis mass were used to calculate relative testis mass and gonadosomatic index (the ratio of testis mass to body mass). Right testes were immersed in fixative (4% formaldehyde phosphate buffer, pH 7.4) for 24 h, then dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70°, 95°, and 100°), then immersed in chloroform, and paraffin embedded. Subsequently, 5-µm thickness sections were obtained using a microtome (Leica Reichert Jung Biocut 2030, Wetzlar, Germany), followed by staining and immunohistochemistry. The left testes were frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C in preparation for molecular analyses.

Image capture

Digital images from hematoxylin–eosin and immunohistochemistry slides were obtained using a light microscope (Model MRP-5000; Premiere Professional Binocular, Manassas, VA, USA) with a digital camera (Dino-Eyepiece, AM-7023X; AnMo Electronics Corporation, New Taipei City, Taiwan) and analyzed with DinoCapture 2.0 software (AnMo Electronics Corporation).

Morphological assessment

In 5-µm thickness sections stained with hematoxylin–eosin, testis morphometry was analyzed by assessing 50 randomly selected fields per animal. The morphometric variables, such as seminiferous tubule diameter (STD), height of seminiferous tubule epithelium (HSTE), and number of SCs per cross section, were measured in 50 transversal cross sections of seminiferous tubules at low magnification for STD (100), or high magnification for HSTE or SC (400), respectively, according to the morphometric

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. IP address: 167.58.109.33, on 16 Sep 2020 at 13:12:02, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S2040174420000306

Table 1. Primary antibodies used and basic information about these antibodies for immunohistochemistry

Target protein	Antibody	Species rise in	Clonality	Catalogue number and supplier	Concentration
IGF-I	Anti-IGF1	Rabbit	Polyclonal IgG anti-IGF-I	ab9572, Abcam, USA	4 µg/ml
Ki-67	Anti-Ki-67 antibody	Rabbit	Monoclonal SP6 IgG	ab16667, Abcam, USA	1:200
3β-HSD	HSD3B1	Rabbit	Polyclonal IgG	ab65156, Abcam, USA	1:200
Inhibin	Anti-inhibin alpha antibody	Mouse	Monoclonal 4E2 IgG1	ab105927, Abcam, USA	1:200
HSF1	Anti-HSF1 antibody	Mouse	Polyclonal IgG	ab52813, Abcam, USA	1:200

variables. In adult rats, it is relatively straightforward to distinguish SCs histologically because they have a very defined cell nucleus, in contrast to germ cells. Spermatogonia have rounded cytoplasm with a round nucleus and are also easy to differentiate.

Stages in the seminiferous epithelial cycle

To assess the effects of undernutrition on spermatogenesis, we analyzed the frequency of stages in the spermatogenic cycle in 200 digital images for each testis. Digital images of all seminiferous tubules within a cross section of the testis were captured and analyzed at 400× and 600× magnification and classified according to stage of cycle (I–XIV), as described previously for the rat.[34-37] To reduce systematic random variation, a consensus decision was made by two observers simultaneously examining each section. To improve the power of detecting a treatment difference, we pooled the data across three stages (I–IV, V–VIII, and IX–XIV) but also analyzed specifically stage VII in order to focus on the period when spermiation takes place.

Immunohistochemistry

Fixed testes were progressively dehydrated by immersion in increasing concentrations of ethanol (70%, 95%, and 100%), embedded in paraffin resin (Historesin; Leica, Heidelberg, Germany), and sectioned at 5 µm. Slides were processed for the detection of immunoreactive IGF-I, inhibin, 3β-HSD, HSF1, and Ki-67 (Table 1) using the streptavidin–biotin–peroxidase protocol, as described previously.[38] In brief, tissue sections were deparaffinized and rehydrated and then underwent heat-induced epitope retrieval; slides were immersed in 0.01-M citrate buffer (pH 6.0) and Tween 20 (5 ml), heated for 5 min (microwave oven), and then washed with distilled water and phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4); endogenous peroxidases were inactivated with 3% hydrogen peroxide (20 min), followed by washing in PBS and incubation with normal rat serum to block non-specific binding proteins; sections were then incubated for 30 min with each primary antibody on different slides (Table 1), for 30 min with biotinylated secondary antibody, and for 30 min with streptavidin–peroxidase enzyme complex (Kit Rabbit Specific HRP/DAB-ABC-Detection IHC, ab 64261; Abcam, Eugene, OR, USA); 3,3′ diaminobenzidine (DAB) chromogen (30 µl) was added to 1.5-ml DAB substrate, mixed, and incubated for 5 min; testis sections were counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, and mounted with Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany) and placed under a glass coverslip.

Image analyses

A total of 50 seminiferous tubules in transverse cross section were captured with 4 images (final magnification 400×), providing 200 images. The localization of IGF-I, 3β-HSD, HSF1, inhibin, and Ki-67 immunostaining area were described and quantified by ImageJ (Version 1.52b 6 May 2018; Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; http://rsb.info.nih.gov/ij.). Areas of immunopositivity were measured using a locally written macro that included color threshold from RGB images and conversion to binary images and area measurement. The threshold values were verified and normalized with controls carried across several runs for calibration. This process provided quantitative values for the percentage and intensity of immunostained area. A batch mode was performed to apply the macro to all images.

Endocrine assays

Plasma samples were assayed using rat-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kits for FSH (Biocode Hycel AER004; Immunodiagnostic Systems, Boldon Colliery, UK) and inhibin B (10-84100; Beckman Coulter, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA), following the manufacturer's instructions. All samples were assayed in duplicate.

RNA analyses

Total RNA was extracted using commercially available kits (AllPrep DNA/RNA mini kit; cat 80204; Qiagen, Germantown, MD, USA). Genomic DNA contamination was removed from each sample by treatment with RNase-free DNase (Invitrogen Life Technologies, Auckland, New Zealand) according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were analyzed using a NanoDrop spectrophotometer (ND-1000; BioLab Ltd, San Diego, CA, USA) and NanoDrop software (version 3.1.2). All RNA samples were stored at −80°C until required.

Five micrograms of total RNA was used for first-strand cDNA synthesis using the Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV-RT; Promega Corp., Madison, WI, USA) and a standard thermocycler (GeneAmp® PCR System 9700; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). A master mix was prepared containing: 5-µl M-MLV 5× buffer (cat M531A; Promega Corp.), 0.5-µl M-MLV-RT (cat M170B; Promega Corp.), and 1.25-µl 10 µM deoxynucleosides triphosphates (cat R0181; Thermofisher, Frederick, MD, USA). We used the following cycling conditions: an initial denaturation stage of 5 min at 96°C, followed by 30 cycles (30 s each) of 96°C (denaturation), 60°C (annealing stage), and 72°C (extension stage). The cDNA was stored at −20°C for later use in quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assays.

Testicular gene expression for IGF1R and the endogenous reference (ß-actin) was measured by qPCR using the ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Auckland, New Zealand). All primers were designed using Primer 3 software (version 0.4.0, Whitehead Institute for Biomedical Research) manufactured by Invitrogen (Invitrogen Life

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. IP address: 167.58.109.33, on 16 Sep 2020 at 13:12:02, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S2040174420000306

Technologies). Primer sets were ß-actin forward primer CACCAACTGGGACGATATGGA and ß-actin reverse primer CAGCCTGGATGGCTACGTACAT, 188bp, accession number NM_031144 and IGF1R (commercial purchased Qiagen assay Rn_Igf1r_1_SG; catalogue # QT00178416).[13]

Optimal primer conditions were adjusted to cycling conditions: length 20 bp (range 17–23 bp); Tm 63°C (range 60–65°C); and amplicon length 100–300 bp. Dissociation analyses were performed to ensure specificity, and samples producing a single peak in the dissociation curves were used. Amplified products were visualized on an agarose gel using the E-Gel® CloneWell 0.8% SYBR Safe gel (cat G6618-08; Invitrogen), run on the E-Gel® iBase™ Power System (cat G6400; Invitrogen) and sequenced by spectrophotometry (Allan Wilson Centre, Massey University). The resulting sequences were evaluated using NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to ensure specificity. Transcript levels were quantified under the following conditions: an initial 2-min hold period at 50°C for normalization (stage 1), followed by enzyme activation at 95°C for 2 min (stage 2); amplification of the gene product through 40 successive cycles of 95°C for 15 s and then 60°C for 1 min (stage 3); followed by a dissociation stage of 15 s at 95°C, 15 s at 60°C, and 2 min at 99°C (stage 4). A standard curve was generated from the mean cycle threshold (Ct) of eight standards (1 : 5 serial dilution) of a known concentration in triplicate, while amplification and dissociation curves were generated for all standards and samples (Applied Biosystems). Each sample was run in triplicate.

Statistical analyses

Effects of treatment on area and intensity of immunostaining were assessed by a one-way analysis of variance with nutrition as the main factor. All data are presented as mean ± SEM. All statistical analyses used general linear model, SAS for Windows (San Diego, CA, USA). For *post hoc* analyses, we used least significant difference (LSD)/Fisher's LSD. In all cases, the level of significance was $P < 0.05$.

Results

Maternal undernutrition affected the amounts of testis IGF-I protein and IGF-I receptor transcripts in testis cells in the adult offspring. These effects were associated with changes in testis morphological/morphometric parameters in these animals in adulthood.

Early onset of puberty, body mass at puberty, morphometric parameters, body mass, and testes mass at 160 days old

Puberty onset in CONTROL was at 37.4 ± 1.7 days. UNPL had the earliest onset of puberty at 34.1 days. Undernourished groups UNP and UNL also showed an early reach of the puberty earlier than CONTROL (Fig. 1a).

UNPL and UNL groups showed the lowest body mass at puberty. The body weight at the time of pubertal onset was lower in all undernourished groups compared to CONTROL offspring (Fig. 1b).

Body mass at 160-day-old male offspring was lower in UNPL than CONTROL (Fig. 1c). However, testes mass was not significantly different between any of the groups (Fig. 1d). The gonadosomatic index (relative testis weights) was reduced in UNP offspring compared with CONTROL, UNL, and UNPL (Fig. 1e)

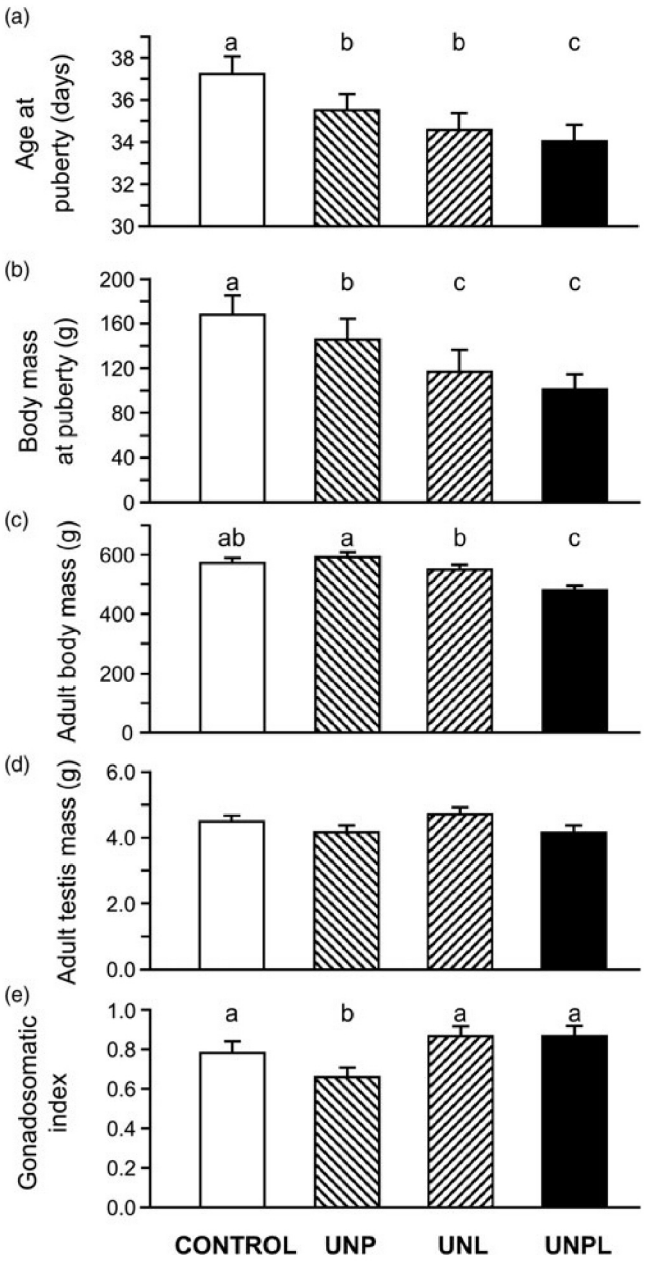


Fig. 1. Morphometric data in male rats that were born to mothers fed *ad libitum* or undernourished: (a) age at puberty; (b) body mass at puberty; (c) adult body mass at age 160 days, (d) adult testis mass at age 160 days, and (e) gonadosomatic index (testis mass/body mass) at 160 days. CONTROL: standard diet. UNP: mothers undernourished during pregnancy. UNL: mothers undernourished during lactation. UNPL: mothers undernourished during both pregnancy and lactation. Values represent mean ± SEM. Different letters among columns indicate significant differences ($P < 0.05$).

Histological and morphometric analyses of testes

All offspring showed the presence of spermatogenic cycle. UNP and UNPL offspring had smaller STDs ($P < 0.0001$) (Fig. 2a). Seminiferous tubules from UNPL offspring had the smallest diameter and height of seminiferous epithelium (Fig. 2a). Further, the height of the seminiferous epithelium was decreased in UNP and UNPL compared to the CONTROL and UNL groups ($P < 0.0001$) (Fig. 2b). Testes from UNP offspring had smaller STDs and increased interstitial area (Fig. 2II, II′).

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. IP address: 167.58.109.33, on 16 Sep 2020 at 13:12:02, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S2040174420000306

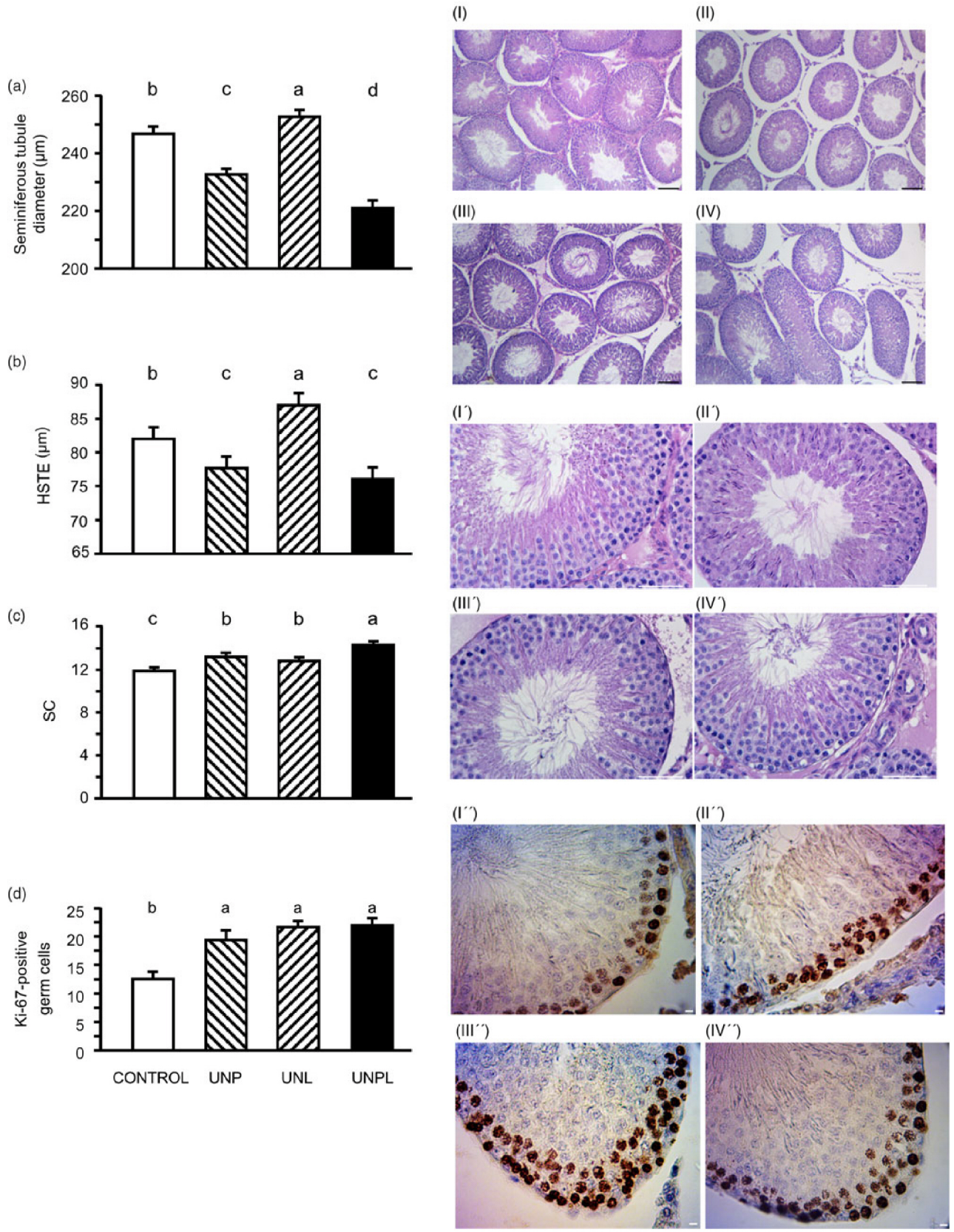


Fig. 2. Effects of maternal undernutrition in adult testis of 160-day-old male rats on morphometric parameters in testis: (a) seminiferous tubule diameter: STD (μm), (b) height of seminiferous tubule epithelium: HSTE (μm), (c) number of Sertoli cells (SC) per seminiferous tubules cross section, and (d) number of Ki-67-positive germ cells in adult. CONTROL: standard diet. UNP: mothers underfed during pregnancy. UNL: mothers underfed during lactation. UNPL: mothers underfed during both pregnancy and lactation. Values are mean ± SEM. Different letters among columns indicate significant differences ($P < 0.05$). I–IV: low magnification images of microscopic images of adult rat testis parenchyma showing seminiferous tubules transverse cross sections from rats that were born to mothers that were fed *ad libitum* or underfed, scale bar = 100 μm, (I) CONTROL, (II) UNP, (III) UNL, (IV) UNPL. I′–IV′: high magnification images, scale bar = 10 μm, I′′–IV′′: Spermatogonial proliferation detected by Ki-67 immunostaining, showing intense (dark brown) in the basement of seminiferous tubules, in testis from adult rats that were born to mothers well fed or underfed. Final magnification at light microscope was 400. Scale bar = 10 μm.

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. IP address: 167.58.109.33, on 16 Sep 2020 at 13:12:02, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S2040174420000306

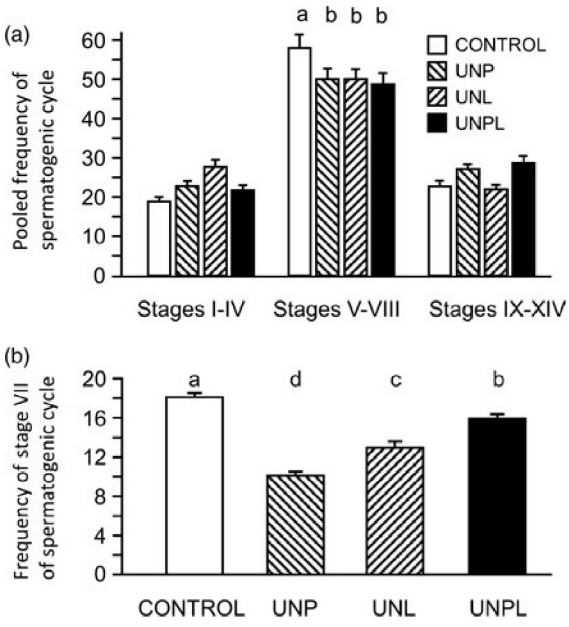


Fig. 3. Effect of maternal undernutrition of spermatogenic cycle: (a) frequency of stages of spermatogenic cycle in seminiferous tubules (pooled stages I–IV, V–VIII, and IX–XIV) and (b) frequencies of stage VII of the spermatogenic cycle (the stage before the onset of spermiogenesis) in testis of 160-day-old adult male rats that were born to mothers that were well fed or underfed. CONTROL: standard diet. UNP: mothers underfed during pregnancy. UNL: mothers underfed during lactation. UNPL: mothers underfed during both pregnancy and lactation. Values are mean ± SEM. Different letters among columns indicate significant differences ($P < 0.05$).

SC number

SC number was higher in UNP ($P < 0.0001$), UNL ($P < 0.0019$), and UNPL ($P < 0.0001$) offspring compared to CONTROL, with the highest number of SCs observed in UNPL offspring (Fig. 2c).

Spermatogenesis

Strong immunopositivity of Ki-67 was detected in spermatogonial cells, and moderate immunopositivity was observed in spermatocytes (Fig. 2I′′). Computerized image analyses of strong immunopositive Ki-67 germ cells (taking in account that proliferating cells are spermatogonial germ cells) showed that the number of germ cells was higher in all undernourished groups compared to CONTROL offspring (UNP and UNPL, $P < 0.0001$; UNL, $P = 0.0003$) (Fig. 2II′′, III′, IV′′).

Frequency of stages of spermatogenic cycle

Undernutrition during pregnancy and lactation (UNP, UNL, and UNPL) decreased frequency of spermatogenic cycle V to VIII ($P < 0.0001$) (Fig. 3a). Specifically, stage VII (stage before beginning of spermiation) of the spermatogenic cycle was lower in frequency in male undernourished offspring compared to CONTROL offspring ($P < 0.0001$) (Fig. 3b).

Localization of IGF-I immunoexpression

Immunoreactive IGF-I was detected in the seminiferous tubules, primarily in SCs, in spermatogonia and in elongated spermatids (but at lower intensity) in all offspring. In CONTROL offspring, IGF-I was localized in the perinuclear cytoplasm of SCs (Fig. 4a).

In UNP, UNL, and UNPL offspring, IGF-I was also observed in the cytoplasm but extended in SC cytoplasm that extends from the basal region of the seminiferous tubules to the adluminal compartment (Fig. 4II, II, IV)

Within the interstitial tissue, IGF-I immunostaining was observed in the periphery of seminiferous tubules and in surrounding peritubular cells that showed weaker staining than SCs. IGF-I was also localized in interstitial cells, and weak staining was observed within Leydig cell cytoplasm compared to SCs in all undernourished groups (Fig. 4IV).

IGF-I immunostaining area and intensity

Overall, testicular IGF-I immunostaining area and intensity of immunostaining were greater in UNPL offspring ($P = 0.0003$) but lower in the UNP offspring compared to CONTROL ($P < 0.0001$) (Fig. 4a,b). Sertoli IGF-I immunostaining and intensity of immunostaining in UNL offspring were greater than UNP but less than UNPL and like CONTROL offspring ($P < 0.0001$) (Fig. 4III).

Immunoexpression of HSF1

Quantification of steroidogenic enzyme 3β-HSD immunostaining area showed an increase in UNL offspring ($P < 0.0001$) (Fig. 5a). As well, an increase in the HSF1 was detected in UNL ($P = 0.01$), as well as in UNP offspring ($P = 0.01$) (Fig. 5b). Inhibin immunostaining was higher in UNP ($P < 0.0001$) and UNPL ($P = 0.01$) offspring compared to CONTROL (Fig. 5c).

Immunoexpression of 3β-HSD

Positive immunostaining of steroidogenic enzyme 3β-HSD was observed in SCs as well as Leydig and spermatid cells (Fig. 5I, II, II, IV) in all offspring. HSF1 was found in Leydig cells as well as moderate immunostaining in SCs (Fig. 5I′, II′, III′, IV′).

Immunoexpression of inhibin

Inhibin immunostaining showed intense immunoexpression in SCs and Leydig cell cytoplasm in UNP and UNPL groups. A weaker inhibin immunostaining was detected in UNL and CONTROL groups (Fig. 5I′′, II′′, III′′, IV′′).

Transcript levels of IGF-I receptor (IGF1R) in the testis

insulin-like growth factor I receptor (IGFIR) transcript levels were lower in UNPL and UNL offspring ($P = 0.01$) compared to CONTROL, but not UNP offspring (Fig. 6a).

Plasma concentrations of FSH and inhibin beta

Plasma FSH concentrations were highest in UNP offspring, which were higher than CONTROL, UNPL, and UNL offspring ($P = 0.05$) (Fig. 6b). Plasma inhibin beta levels were highest in UNP ($P = 0.01$) and UNL ($P = 0.003$) offspring compared to CONTROL group and UNPL offspring. (Fig. 6c). UNPL and CONTROL offspring inhibin beta levels were similar.

Discussion

In the present study, we report that in male offspring of adult age, the effects of undernutrition of their mothers on the testicular IGF-I system depended on the timing of the exposure to the nutritional challenge.

Neonatal testicular development in the rat is vulnerable to changes in IGF-I concentration because IGF-I directly affects the proliferation and differentiation of germ cells, SCs, and

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. IP address: 167.58.109.33, on 16 Sep 2020 at 13:12:02, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S2040174420000306

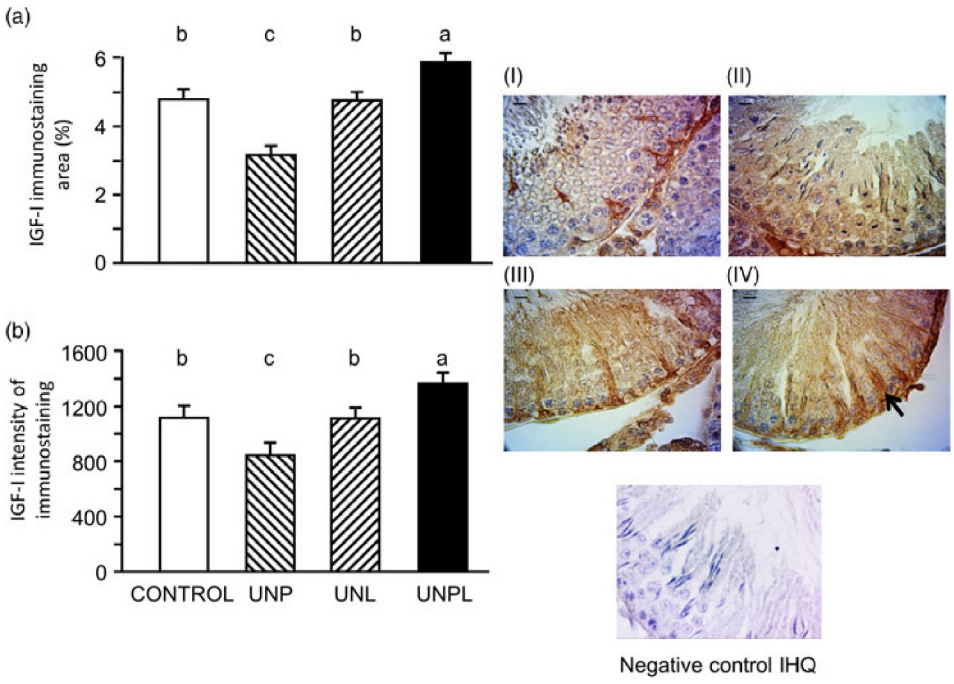


Fig. 4. Effect of maternal undernutrition in IGF-I in testicular cells of adult male rats: (a) IGF-I immunostained area I (%) and (b) IGF-I immunostaining intensity (gray value pixels × 1000). Values are mean ± SEM. Different letters among columns indicate significant differences ($P < 0.05$). I–IV: Localization of IGF-I immunostaining in testis parenchyma in adult rats that were born to mothers that were well fed or undernourished. (I) CONTROL: standard diet, (II) UNP: mothers underfed during pregnancy, (III) UNL: mothers underfed during lactation, (IV) UNPL: mothers underfed during both pregnancy and lactation. SC immunostaining in males born to underfed mothers during pregnancy and lactation was intense from the basal region to the adluminal compartment (black arrow). Scale bar = 10 μm. Negative control of immunohistochemestry (IHQ).

Leydig cells. The source of testicular IGF-I is known to be SCs,[39] so the intratesticular milieu is significantly affected by IGF-I. The mitotic activity of SCs in the rat is most intense shortly before birth, around day 20 of gestation, and decreases steadily until 21 days after birth,[40] after which proliferation ceases. It therefore seems likely that maternal undernutrition during pregnancy disrupts the most important period of SC development. Undernutrition during lactation, on the other hand, might have less marked effects because the SC proliferation is already in decline.

Maternal undernutrition during pregnancy (UNP) and both during pregnancy and lactation (UNPL) led to the greatest compromise of adult testis in the offspring. Undernutrition during prenatal development had greater effects on testicular IGF-I than undernutrition during either pregnancy + lactation or lactation alone. These observations are consistent with reports showing that maternal undernutrition decreases IGF-I serum concentrations.[41,42] It seems that the neonatal testis is vulnerable to a decrease in maternal undernutrition during pregnancy and that the effects persist into adulthood. By contrast, when undernutrition was limited to lactation alone, with a return to adequate nutrition after weaning, there was no effect on testis IGF-I levels, although there was potential for a reduction in testicular responsiveness to IGF-I, as evidenced by a decrease in the amount of receptor IGF1R transcript.

Interestingly, the reduction in STD was more pronounced in the UNPL group, concomitant with high levels of IGF-I and low IGF receptor expression. Our view is that this reflects altered IGF-I sensitivity in this group, leading to so smaller testis size and related structural effects.

SC IGF-I is thought to regulate spermatogenesis[43,44] through autocrine actions on its own receptors and through paracrine actions on germ cells,[45] so a reduction in IGF1 levels caused by maternal undernutrition would likely have negative consequences for sperm production in the offspring. Indeed, we observed reductions in all stages of the spermatogenic cycle in all undernourished groups, with the greatest effect at stage VII in males born to mothers underfed during pregnancy. Moreover, the height of spermatic epithelium and STD were also reduced by undernutrition during in pregnancy and pregnancy–lactation. Stage VII of the spermatogenic cycle, before the onset of spermiation, is the most frequently observed stage in the rat,[34] although a 44% food restriction has been shown to affect stage VIII.[46] Consistent with this observation is the improvement by exogenous IGF-I of spermatozoa morphology and motility in GH-deficient rats.[29]

Our observations of IGF-I immunostaining in germ cells are also consistent with its role in the regulation of germ cell proliferation and survival.[47] Moreover, the increase in germ cell proliferation (evidenced by Ki-67) in offspring from underfed mothers suggests that, in the developing testis, germ cell mitotic activity increases to overcome the possible loss of spermatogenic capacity.

The implication of increased IGF-I observed in the UNPL group on testicular parameters may suggest an increase in testicular growth, but the testis actually showed a decrease in morphometric parameters. In the progeny from the UNPL group, the increased IGF-I intensity in the testis would be expected to promote testicular growth, yet there was a decrease in STD. The most logical explanation is that the responsiveness of the testicular cells to IGF-I was reduced by the low levels of IGF-I receptor expression.

Maternal undernutrition during pregnancy or lactation led to an increase in the number of SCs per cross section of seminiferous tubule. A feasible explanation is that, because the seminiferous tubules were shorter in both the UNP and UNPL groups, allowing more SCs to be detected per cross section, as previously reported for mice.[48]

Finally, there is evidence of endocrine consequence of maternal undernutrition, especially during lactation, after which we observed increases in testicular immunostaining for 3β-HSD and HSF1, suggesting an elevation of steroidogenic capability. These observations are consistent with the role of IGF-I in the production of testosterone by Leydig cells.[15,45,49]

In the offspring born to undernourished mothers, the onset of puberty was advanced, as seen previously with low birth weight

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. IP address: 167.58.109.33, on 16 Sep 2020 at 13:12:02, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S2040174420000306

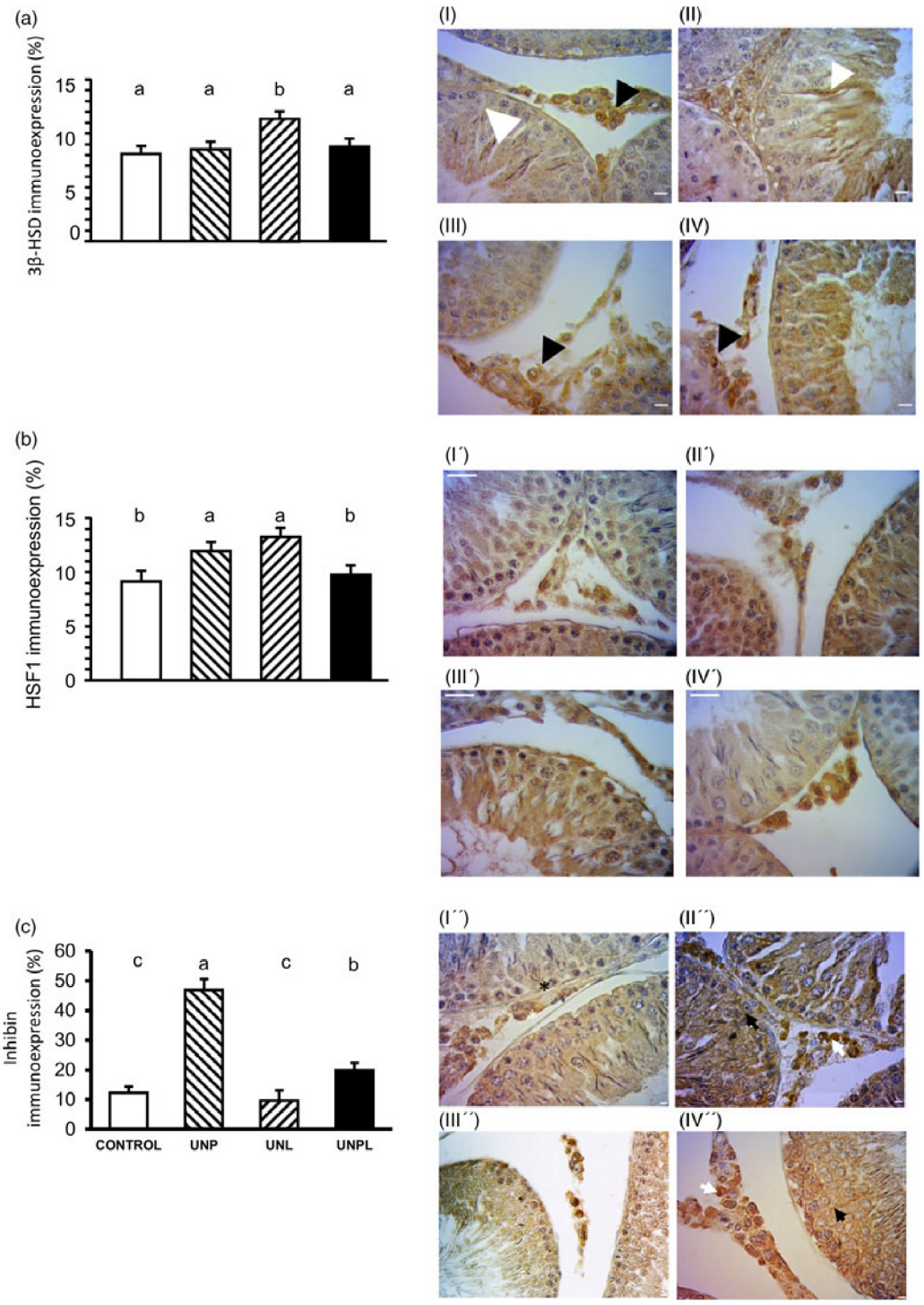


Fig. 5. Effects of maternal undernutrition in steroidogenic enzyme, heat shock protein, and inhibin in adult testis. Results of image analyses of immunostaining area for (a) 3β-HSD immunoexpression; (b) HSF1 immunoexpression; and (c) inhibin. Values are mean ± SEM. Different letters among columns indicate significant differences ($P < 0.05$). I–IV: immunohistochemistry images showing immunostaining for 3β-HSD. White arrow head shows intense immunostaining in SCs, and black arrow head shows intense Leydig cells immunostaining. I′–IV′: heat shock transcription factor protein HSF1. I′′–IV′′: Inhibin immunoexpression in Leydig cell (white arrow) and intense immunostaining in SCs in UNP group (black arrow). CONTROL: standard diet I, I′, I′′. UNP: mothers underfed during pregnancy II, II′, and II′. UNL: mothers underfed during lactation III, III′, and III′′. UNPL: mothers underfed during both pregnancy and lactation IV, IV′, and IV′′. Scale bar = 10 μm.

humans and rats.[50] In adult offspring born to mothers that had been underfed during both pregnancy and lactation, body mass was reduced at age 160 days as well as at puberty, demonstrating the long-term programming effect of maternal undernutrition. In rats, puberty was defined as balano-preputial separation, it was detected earlier puberty in all groups from underfed mothers (UNP, UNL, and UNPL), but was most precocious in the offspring from the UNPL females. Indeed, in humans, both low birth weight and rapid weight gain between birth and 24 months were independently associated with an early onset of puberty, in both boys and girls. Moreover, rapid weight gain increased adiposity, thus increasing IGF-I concentration and eliciting insulin resistance, perhaps triggering early pubertal development by promoting the activity of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse generator.[51,52] The link between early puberty and IGF-I is very strong in undernourished animals – in addition to determining testis morphology in later life, IGF-I regulates the onset of puberty through actions at brain level. In boys, these links might have major health consequences because the risk of testicular cancer is lower with late puberty.[53]

IGF-I signaling is intimately involved in the proliferation and differentiation of SCs and is therefore a major determinant of

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. IP address: 167.58.109.33, on 16 Sep 2020 at 13:12:02, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S2040174420000306

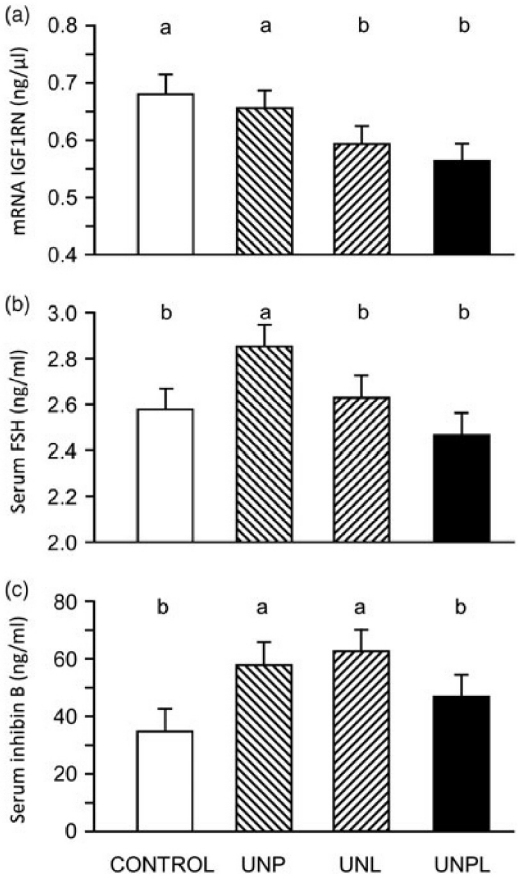


Fig. 6. Effects of maternal undernutrition in molecular parameters: (a) RNA IGF-I receptor transcript in testis (IGF1RN), (b) serum concentrations of FSH, and (c) serum concentrations of inhibin in adult (age 160 days) male rats that were born to mothers that were well fed or underfed. CONTROL: standard diet. UNP: mothers underfed during pregnancy. UNL: mothers underfed during lactation. UNPL: mothers underfed during both pregnancy and lactation. Values are mean ± SEM. Different letters among columns indicate significant differences ($P < 0.05$).

the number of SCs at puberty,[25] itself a crucial determinant of adult fertility.[54] We found that early-life undernutrition increased the number of SCs, suggesting that, under non-optimal conditions, SC proliferation can be stimulated and possibly contribute to a late-stage surge in testis mass and sperm output. However, we need to keep in mind that an increase in SC number does not necessarily translate to a healthy testis and may be associated with pathologies such as Sertolioma.[55,56]

When undernutrition was restricted to the prenatal period, there was a decrease in testicular IGF-I immunoexpression in the adult offspring. It is interesting that when maternal undernutrition continued throughout pregnancy and lactation, we found the opposite consequences and show an increase in IGF-I immunoexpression in testis.

As discussed above, IGF-I signaling is intimately involved in proliferation and differentiation of SCs and is a major factor regulating the number of SCs at puberty[25] and their response to FSH,[57] two crucial determinants of adult fertility.[54] It is therefore interesting that the consequences of maternal undernutrition during pregnancy or lactation were opposite to those of undernutrition during both pregnancy plus lactation where we observed an increase in IGF-I immunoexpression accompanied by an increase in the number of SCs in the testis. These findings suggest a compensatory effect of persistent undernutrition, with the activity of the IGF-1 system reduced, as evidenced by a decrease in transcript levels for IGF1 receptor. It is possible that the testis can show IGF-I resistance, as suggested by studies with GH and insulin resistance in models of undernutrition.[41,58,59]

The next step in this area should be a complete evaluation of offspring fertility, accompanied by a comprehensive analysis of IGFs and androgens in the circulation of males born to underfed mothers, and the molecular signaling pathways that might explain the effects on testicular IGF-I.

Conclusions

In the rat, pre- and postnatal undernutrition have window-dependent effects on testicular IGF-I in the offspring that cause long-term consequences in testis morphology including alteration in stages of spermatogenic cycle. Prenatal undernutrition has long-lasting effects decreasing testicular IGF-I, whereas the combination of pre- and postnatal undernutrition increases testicular IGF-I and decreases IGF-I receptors transcripts. Maternal undernutrition decreases the frequency of stage VII seminiferous tubules, showing clear morphological evidence of compromised spermatogenesis.

Author Contributions. DMS and MHV conceived and designed the experiments. GP and HV performed laboratory analyses and analyzed the data. GBM, GP, DMS, HV, MHV, and PL contributed reagents/materials/analysis tools. GP, GBM, MHV, DMS, and DC wrote the manuscript.

Acknowledgment. To Mónica Viqueira to her support and her laboratory help in our Department.

Financial Support. This research was supported by the Health Research of New Zealand, Gravida: Research Centre for Growth and Development and the CSIC Foundation, CSIC financial support grant 2016, University of the Republic, Uruguay. DMS hold a Canada Research Chair in Perinatal Programming.

Conflicts of Interest. The authors have no conflict to declare.

Ethical statement. The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guides on the care and use of laboratory animals of the Animal Ethics Committee of the University of Auckland and has been approved by the institutional committee.

References

1. Martín-Estal I, De La Garza RG, Castilla-Cortázar I. Intrauterine growth retardation (IUGR) as a novel condition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) deficiency. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2016; 170. doi: 10.1007/112_2015_5001.
2. Jazwiec PA, Sloboda DM. Nutritional adversity, sex and reproduction: 30 years of DOHaD and what have we learned? *J Endocrinol.* 2019; 242(1), T51–T68. doi: 10.1530/JOE-19-0048.
3. Chan KA, Jazwiec PA, Gohir W, Petrik JJ, Sloboda DM. Maternal nutrient restriction impairs young adult offspring ovarian signaling resulting in reproductive dysfunction and follicle loss†. *Biol Reprod.* 2018; 98(5), 664–682. doi: 10.1093/biolre/ioy008.
4. Sloboda DM, Howie GJ, Pleasants A, Gluckman PD, Vickers MH. Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. *PLoS One.* 2009; 4(8). doi: 10.1371/journal.pone.0006744.
5. Bernal AB, Vickers MH, Hampton MB, Poynton RA, Sloboda DM. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. Vitzthum VJ, ed. *PLoS One.* 2010; 5(12), e15558. doi: 10.1371/journal.pone.0015558.
6. Zambrano E, Rodríguez-González GL, Guzmán C, *et al.* A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. IP address: 167.58.109.33, on 16 Sep 2020 at 13:12:02, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S2040174420000306

reproductive development. *J Physiol.* 2005; 563(1), 275–284. doi: 10.1113/jphysiol.2004.078543.
7. Toledo FC, Perobelli JE, Pedrosa FPC, Anselmo-Franci JA, Kempinas WDG. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 9, 94. doi: 10.1186/1477-7827-9-94.
8. Melo MC, Almeida FRCL, Caldeira-Brant AL, Parreira GG, Chiarini-Garcia H. Spermatogenesis recovery in protein-restricted rats subjected to a normal protein diet after weaning. *Reprod Fertil Dev.* 2014; 26(6), 787. doi: 10.1071/RD13032.
9. Genovese P, Núñez M, Pombo C, Bielli A. Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the adult rat. *Reprod Domest Anim.* 2010; 45(2), 233–236. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01244.x.
10. Guan Y, Martin GB. Cellular and molecular responses of adult testis to changes in nutrition: novel insights from the sheep model. *Reproduction.* 2017; 154(5), R133–R141. doi: 10.1530/REP-17-0061.
11. Spiteri-Grech J, Nieschlag E. The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function. *Horm Res Paediatr.* 1992; 38, 22–27. doi: 10.1159/000182566.
12. Fazeli PK, Klibanski A. Determinants of GH resistance in malnutrition. *J Endocrinol.* 2014; 220(3), R57–R65. doi: 10.1530/JOE-13-0477.
13. Smith T, Sloboda DM, Saffery R, Joo E, Vickers MH. Maternal nutritional history modulates the hepatic IGF-IGFBP axis in adult male rat offspring. *Endocrine.* 2014; 46(1), 70–82. doi: 10.1007/s12020-013-0034-8.
14. Gatford KL, Owens JA, Li S, *et al.* Repeated betamethasone treatment of pregnant sheep programs persistent reductions in circulating IGF-I and IGF-binding proteins in progeny. *Am J Physiol Metab.* 2008; 295(1), E170–E178. doi: 10.1152/ajpendo.00047.2008.
15. Baker J, Hardy MP, Zhou J, *et al.* Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol.* 1996; 10(7), 903–918. doi: 10.1210/mend.10.7.8813730.
16. Salmon WD, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. 1956. *J Lab Clin Med.* 1990; 116(3), 408–419. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2205697 (Accessed June 13, 2018).
17. Bentov I, Werner H. Insulin-like Growth Factor-1. In *Handbook of Biologically Active Peptides*, 2013; pp. 1627–1632. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-385095-9.00222-0.
18. Livingstone C. The insulin-like growth factor system and nutritional assessment. *Scientifica (Cairo).* 2012; 2012, 768731. doi: 10.6064/2012/768731.
19. Dai G, Wang D, Dong HUA. Effects of recombinant human growth hormone on protein malnutrition and IGF-1 and IL-2 gene expression levels in chronic nephrotic syndrome. *Exp Ther Med.* 2018; 4167–4172. doi: 10.3892/etm.2018.5953.
20. Wang P, Ji B, Shao Q, Zhang M, Ban B. Association between insulin-like growth factor-1 and uric acid in Chinese children and adolescents with idiopathic short stature : a cross-sectional study. *Biomed Res Int.* 2018; 4259098. doi: 10.1155/2018/4259098.
21. Aguirre GA, Ita JR De, Garza RG De, Cortazar IC. Insulin – like growth factor – 1 deficiency and metabolic syndrome. *J Transl Med.* 2016; 1–23. doi: 10.1186/s12967-015-0762-z.
22. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev.* 1995; 16(2), 143–163. doi: 10.1210/edrv-16-2-143.
23. Leroith D, Scheinman EJ, Bitton-Worms K. The role of insulin and insulin-like growth factors in the increased risk of cancer in diabetes. *Rambam Maimonides Med J.* 2011; 2(2), e0043. doi: 10.5041/RMMJ.10043.
24. Puche JE, Castilla-Cortázar I. Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J Transl Med.* 2012; 10, 224. doi: 10.1186/1479-5876-10-224.
25. Pitetti J-L, Calvel P, Zimmermann C, *et al.* An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Mol Endocrinol.* 2013; 27(5), 814–827. doi: 10.1210/me.2012-1258.
26. Gelber SJ, Hardy MP, Chamindrani Mendis-Handagama SML, Casella SJ. Effects of insulin-like growth factor-i on androgen production by highly purified pubertal and adult Rat Leydig cells. *J Anthol.* 1992; 13(2). doi: 10.1111/j.1939-4640.1992.tb01642.x.
27. Oka S, Shiraishi K, Fujimoto M, *et al.* Role of heat shock factor 1 in conserving cholesterol transportation in leydig cell steroidogenesis via steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology.* 2017; 158(8), 2648–2658. doi: 10.1210/en.2017-00132.
28. Yoon M, Jiang J, Chung KH, Roser JF. Immunolocalization of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptors (IGF-IR) in the equine epididymis. *J Reprod Dev.* 2015; 61(1), 30–34. doi: 10.1262/jrd.2014-097.
29. Vickers MH, Casey PJ, Champion ZJ, Gravance CG, Breier BH. IGF-I treatment increases motility and improves morphology of immature spermatozoa in the GH-deficient dwarf (dw/dw) rat. *Growth Horm IGF Res.* 1999; 9(4), 236–240. doi: 10.1054/ghir.1999.0114.
30. Breier BH, Vickers MH, Gravance CG, Casey PJ. Growth hormone (GH) therapy markedly increases the motility of spermatozoa and the concentration of insulin-like growth factor-I in seminal vesicle fluid in the male GH-deficient dwarf rat. *Endocrinology.* 1996; 137(9), 4061–4064. doi: 10.1210/endo.137.9.8756586.
31. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2000; 279(1 42-1). doi: 10.1152/ajpendo.2000.279.1.e83.
32. Chan KA, Bernal AB, Vickers MH, Gohir W, Petrik JJ, Sloboda DM. Early life exposure to undernutrition induces ER stress, apoptosis, and reduced vascularization in ovaries of adult rat offspring. *Biol Reprod.* 2015; 92(4), 110. doi: 10.1095/biolreprod.114.124149.
33. Howie GJ, Sloboda DM, Vickers MH. Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. *Br J Nutr.* 2012; 108(2), 298–307. doi: 10.1017/S000711451100554X.
34. Hess RA, Schaeffer DJ, Eroschenko VP, Keen JE. Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biol Reprod.* 1990; 43(3), 517–524. doi: 10.1095/biolreprod43.3.517.
35. Clermont Y, Huckins C. Microscopy anatomy of the sex cords and seminiferous tubules in growing and adult male albino rats. *Am J Anat.* 1961; 107, 79–97.
36. Cusan L, Gordeladze J, Clausen PF, Parvinen M, Turner D. Specific stages of the spermatogenic cycle of the rat. *Biol Reprod.* 1981; 919, 915–919.
37. Johnston DS, Olivas E, DiCandeloro P, Wright WW. Stage-specific changes in GDNF expression by rat Sertoli cells: a possible regulator of the replication and differentiation of stem spermatogonia. *Biol Reprod.* 2011; 85(4), 763–769.
38. Pedrana G, Viotti H, Lombide P, *et al.* In utero betamethasone affects 3β-hydroxysteroid dehydrogenase and inhibin-α immunoexpression during testis development. *J Dev Orig Health Dis.* 2016:1–8. doi: 10.1017/S2040174416000118.
39. Hansson H-A, Billig H, Isgaard J. Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects. *Biol Reprod.* 1989; 40(6), 1321–1328. doi: 10.1095/biolreprod40.6.1321.
40. Orth JM. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec.* 1982; 203(4), 485–492. doi: 10.1002/ar.1092030408.
41. Fazeli PK, Klibanski A. Determinants of GH resistance in malnutrition. *J Endocrinol.* 2014; 220(3), R57–R65. doi: 10.1530/JOE-13-0477.
42. Hawkes CP, Grimberg A. Insulin-like growth factor-I is a marker for the nutritional state. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2015; 13(2), 499–511.
43. Griffeth RJ, Bianda V, Nef S. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic Clin Androl.* 2014; 24(1), 12. doi: 10.1186/2051-4190-24-12.
44. Neirijnck Y, Calvel P, Kilcoyne KR, *et al.* Insulin and IGF1 receptors are essential for the development and steroidogenic function of adult Leydig cells. *FASEB J.* 2018; 32(6), 3321–3335. doi: 10.1096/fj.201700769RR.
45. Froment P, Vigier M, Negre D, *et al.* Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I. *J Endocrinol.* 2007; 194(3), 557–568. doi: 10.1677/JOE-07-0258.
46. Horn MM, Ramos AR, Winkelmann L, Matte US, Goldani HA, Silveira TR. Seminiferous epithelium of rats with food restriction and carbon

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. IP address: 167.58.109.33, on 16 Sep 2020 at 13:12:02, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S2040174420000306

tetrachloride-induced cirrhosis. *Int Braz J Urol.* 2006; 32(1), 94–99. doi: 10.1590/S1677-55382006000100016.
47. Borland K, Mita M, Oppenheimer CL, *et al.* The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Leydig cells. *Endocrinology.* 1984; 114(1), 240–246. doi: 10.1210/endo-114-1-240.
48. Jiang X, Yin S, Fan S, *et al.* Npat-dependent programmed Sertoli cell proliferation is indispensable for testis cord development and germ cell mitotic arrest. *FASEB J.* 2019; 33(8), 9075–9086. doi: 10.1096/fj.201802289RR.
49. Moore A, Morris ID. The involvement of insulin-like growth factor-I in local control of steroidogenesis and DNA synthesis of Leydig and non-Leydig cells in the rat testicular interstitium. *J Endocrinol.* 1993; 138(1), 107–114. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531750.
50. Sloboda DM, Howie GJ, Pleasants A, Gluckman PD, Vickers MH. Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. Belizan JM, ed. *PLoS One.* 2009; 4(8), e6744. doi: 10.1371/journal.pone.0006744.
51. Chadio S, Kotsampasi B. The role of early life nutrition in programming of reproductive function. *J Dev Orig Health Dis.* 2014; 5(1), 2–15. doi: 10.1017/S204017441300038X.
52. Chadio S, Katsafadou A, Kotsampasi B, *et al.* Effects of maternal undernutrition during late gestation and/or lactation on colostrum synthesis and immunological parameters in the offspring. *Reprod Fertil Dev.* 2016; 28(3). doi: 10.1071/RD14147.
53. Maule M, Malavassi JL, Richiardi L. Age at puberty and risk of testicular cancer: a meta-analysis. *Int J Androl.* 2012; 35(6), 828–834. doi: 10.1111/j.1365-2605.2012.01286.x.
54. Monteiro G, Luz A, Castro D, Paula A, Loss ES. Biochimica et Biophysica Acta Insulin and IGF-I actions on IGF-I receptor in seminiferous tubules from immature rats. *BBA - Biomembr.* 2014; 1838(5), 1332–1337. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.02.002.
55. Sharpe R, McKinnell C, Kivlin C, Fisher J. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction.* 2003; 125, 769–784. http://www.reproduction-online.org/content/125/6/769.short (Accessed April 15, 2013).
56. Ciaputa R, Nowak M, Kiełbowicz M, Antończyk A, Błasiak K, Madej JA. Seminoma, sertolioma, and leydigoma in dogs: clinical and morphological correlations. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2012; 56(3), 361–367. doi: 10.2478/v10213-012-0063-8.
57. Griffeth RJ, Bianda V, Nef S. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic Clin Androl.* 2014; 24(1), 12. doi: 10.1186/2051-4190-24-12.
58. Friedrich N, Thuesen B, Jrøgensen T, *et al.* The association between IGF-I and insulin resistance: a general population study in Danish adults. *Diabetes Care.* 2012; 35(4), 768–773. doi: 10.2337/dc11-1833.
59. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev.* 2009. doi: 10.1210/er.2008-0047.

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. IP address: 167.58.109.33, on 16 Sep 2020 at 13:12:02, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S2040174420000306

Reproduction, Fertility and Development

Maternal undernutrition during pregnancy and lactation increases transcription factors, ETV5 and GDNF, and alters regulation of apoptosis and heat shock proteins in the testis of adult offspring in the rat

Journal:	*Reproduction, Fertility and Development*
Manuscript ID	RD20260
Manuscript Type:	Research paper
Date Submitted by the Author:	30-Sep-2020
Complete List of Authors:	Pedrana, Graciela; Universidad de la República Uruguay Facultad de Veterinaria, Biosciences Larrañaga, Camila; Universidad de la Republica Uruguay Facultad de Veterinaria, Pathobiology Díaz, Alejandra; Universidad de la Republica Uruguay Facultad de Veterinaria, Biosciences Viotti, María; Universidad de la Republica Uruguay Facultad de Veterinaria, Bioscience Lombide, Paula ; Universidad de la Republica Uruguay Facultad de Veterinaria, Bioscience Cavestany, Daniel; Universidad de la Republica Uruguay, Centro de Posgrado Vickers, Mark ; The University of Auckland - City Campus, Liggins Institute Martin, Graeme; The University of Western Australia Faculty of Natural and Agricultural Sciences, School of Agriculture and Environment Sloboda, Deborah; McMaster University Faculty of Health Sciences, Department of Biochemistry and Biomedical Sciences
Keyword:	transcription factor, testis, Sertoli cell, nutrition, apoptosis, fetal programming

SCHOLARONE™
Manuscripts

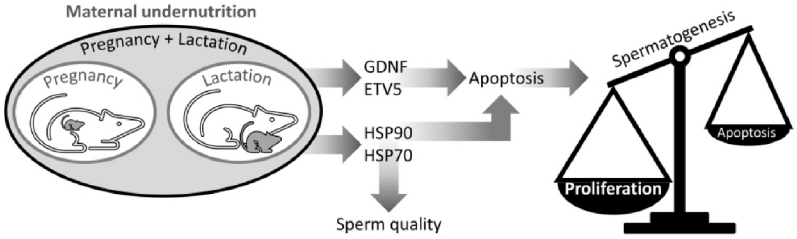
Summary text for Table of Content

When mothers are undernourished during pregnancy and lactation, the development of the testis of their male offspring is compromised, perhaps leading to poor fertility in adult life.

We have shown that, in the developing testis, maternal undernutrition modifies the production of transcription factors, heat shock proteins, and apoptotic proteins.

These factors are responsible for the balance between cell between proliferation and cell death. This balance is essential for successful sperm production.

For Review Only



338x190mm (300 x 300 DPI)

Maternal undernutrition during pregnancy and lactation increases transcription factors, ETV5 and GDNF, and alters regulation of apoptosis and heat shock proteins in the testis of adult offspring in the rat

Graciela Pedrana[1], Camila Larrañaga[1], Alejandra Diaz[1], Helen Viotti[1], Paula Lombide[1], Daniel Cavestany[1], Mark H. Vickers[2], Graeme B. Martin[3] and Deborah M. Sloboda[4,5]

[1]Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay;

[2]Liggins Institute, University of Auckland, Auckland, New Zealand;

[3]School of Agriculture and Environment, Faculty of Science, and UWA Institute of Agriculture, University of Western Australia, Perth, Australia;

[4]Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, McMaster University, Hamilton, Canada;

[5]Department of Pediatrics, McMaster University, Hamilton, Canada and Farncombe Family Digestive Health Research Institute, McMaster University, Hamilton, Canada

Corresponding Author: gpedrana@gmail.com

Av. Lasplaces 1620, Montevideo, Uruguay, CP 11600

For Review Only

Running head

Maternal undernutrition affects offspring testis

Abstract

We tested whether changes in Sertoli cell transcription factors and germ cell heat shock proteins (HSPs) are linked to the effects of maternal undernutrition on fertility in male offspring. Rats were fed *ad libitum* with either a standard diet (CONTROL), or 50% of CONTROL intake throughout pregnancy (UNP), lactation (UNL) or both periods (UNPL). After postnatal Day 21, male pups (10 per group) were fed a standard diet *ad libitum* until postnatal Day 160 when testes were processed for histology and mRNA and immunohistochemical analyses. Compared to CONTROL: caspase-3 was increased in UNP and UNPL ($p = 0.001$); Bax was increased in UNL ($p = 0.002$); Bcl-2 ($p < 0.0001$) was increased in all underfed groups; GDNF ($p = 0.002$) was increased in UNP and UNL; ETV5 and HSP70 were increased in all underfed groups ($p < 0.0001$); HSP90 was diminished in all underfed groups ($p < 0.0001$). We conclude that maternal undernutrition during pregnancy and lactation disrupts the balance between proliferation and apoptosis that ensures the number of germ cells does not exceed the support capacity of the Sertoli cells. Fertility outcomes would be exacerbated by changes in meiosis and spermiogenesis mediated by germ cell HSP90 and HSP70.

Key words: *nutrition, developmental programming, transcription factor, testis, Sertoli cell, apoptosis*

For Review Only

Introduction

The term 'programming' refers to the effects of a stressor during a specific period of development that causes morphological and functional changes in cells and tissues, with consequences that manifest later in life (Langley-Evans 2015). For example, maternal undernutrition during pre- and post-natal life can lead to metabolic syndrome and cardiovascular disease in adult offspring (Wadhwa *et al.* 2009; Bell and Greenwood 2016; Kereliuk *et al.* 2017; Jazwiec and Sloboda 2019b). Conversely, under other conditions, normal development can be disturbed by changes in the pathways that control cell proliferation, apoptosis and differentiation (Langley-Evans and McMullen 2010), but the cells and tissues then adapt through a process known as developmental plasticity (Bateson *et al.* 2004; Langley-Evans 2015).

In humans, pioneering studies of health history by DJP Barker gave rise to the concept that suboptimal developmental conditions in utero can predispose offspring to chronic diseases in later life, including cancer. 'The Barker Hypothesis' is now commonly referred to as the 'Developmental Origins of Health and Disease' or DOHaD (review: Sinclair *et al.* 2016). In animals, several studies have proposed associations between nutrition during prenatal and early post-natal life, birth weight and postnatal reproductive development, as explanations of the variation in reproductive performance observed in adult animals under field conditions (reviews: Martin *et al.* 2010; Sinclair *et al.* 2016). In male rats, for example, nutrient restriction during late gestation is associated with delayed puberty, reductions in circulating concentrations of leptin and FSH, and a decrease in seminiferous tubule diameter (Léonhardt *et al.* 2003). Similarly, protein restriction of pregnant rats leads to several deleterious effects in the male offspring including reductions in Sertoli cell number, sperm count, sperm motility, and daily sperm production, as well as altered oxidative stress in the testis (Toledo *et al.* 2011; Khorram *et al.* 2015). Recently, we found that maternal undernutrition in rats, during the pre- and post-natal life of the offspring, can affect the IGF-I system and germ cell proliferation in male pups (Pedrana *et al.* 2020).

In many of these reports, maternal metabolic challenge appears to affect the development of Sertoli cell function in the offspring, suggesting that other factors produced by Sertoli cells could be involved in the programming of the testis with subsequent impacts on adult fertility. Sertoli cells are highly differentiated somatic cells with well-controlled transcriptional systems for the many roles they play throughout the spermatogenic cycle (Figueiredo *et al.* 2016; França *et al.* 2016). For example, studies in the rodent models (Cooke *et al.* 2006) have shown that Sertoli cells produce two transcription factors that are members of the ETS family: ETV5 (E twenty-six transformation variant gene 5; also called ETS-Related Molecule, ERM) and GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor). Both factors are involved in paracrine regulation of the renewal

For Review Only

of spermatogonial stem cells (SSCs), a multifaceted process that includes cell proliferation, prevention of apoptosis, and maintenance of stem cell phenotype (Meng *et al.* 2000; Ishii *et al.* 2012; Singh *et al.* 2017). Disruption of the Etv5 gene decreases ETV5 protein and allows the first wave of spermatogenesis, but all SSCs are lost during that wave leading to a Sertoli cell-only phenotype (Schlesser *et al.* 2008; Tyagi *et al.* 2009).

The ETS family of proteins regulates cellular invasion and migration, cell survival, and entry into the S phase of the cell cycle in the testis (Simon *et al.* 2007; Hofmann 2008). In thyroid tissue tumours, ETV5 has been associated with metastatic progression (Puli *et al.* 2018). In the testis, self-renewal and differentiation in SSCs initiates meiosis, a highly organized process targeted by factors within the stem cell niche produced by Sertoli cells. If the ability of SSCs to undergo self-renewal is modified, the SSC population could be rapidly depleted, resulting in male infertility.

In normal tissue development as well as pathological situations, cell proliferation is a balance between two processes, cell division and apoptosis, and the heat shock proteins (HSPs) are involved in maintaining that balance (Sarge and Cullen 1997; Selim *et al.* 2012; Domingos *et al.* 2013). This same balance applies to the testis (Kennedy *et al.* 2014), where HSP90 is expressed (Grad *et al.* 2010; Au *et al.* 2015) and seems to be indispensable for disassembly and/or progression through late pachytene or the pachytene checkpoint, when meiotic spermatocytes are undergoing apoptosis. Thus, in the absence of functional HSP90, germ cells fail to complete meiosis, leading to spermatogenic arrest and subsequent infertility (Grad *et al.* 2010). In mammalian cells, there are two HSP90 homologues – HSP90α is known to be critical for the first wave of spermatogenesis prior to puberty, but the role of HSP90β is not yet clear, although it is expressed in Sertoli and germ cells (Jha *et al.* 2013).

Members of the HSP family are involved in cell thermotolerance, a critical aspect of testis function, and in sensitivity to a broad range of cytotoxic stimuli (Selim *et al.* 2012). For example, HSP70 is considered to be cytoprotective, particularly under stress conditions, as it modifies the antioxidant potential of cells. It translocates to the nucleus and nucleolus during S-phase or during a heat shock, and participates in pathways regulating the integrity and accuracy of DNA replication, and in the inhibition of breaks in nucleoplasmic/nucleolic single-stranded sDNA, one of the final stages of apoptosis (Kotoglou *et al.* 2009).

The above considerations led us to test whether ETV5 and GDNF in Sertoli cells, through their roles as regulators of HSPs and apoptosis in germ cells, are involved in the programming of testicular function in the context of maternal undernutrition during pregnancy and/or lactation.

For Review Only

Materials and methods

Animal model

All animal work was approved under the guidelines of the Animal Ethics Committee of the University of Auckland (R402). In the present study, we used an established model of developmental programming based on manipulation of maternal nutrition (Howie *et al.* 2012). Female Wistar rats (120 days old; n = 24) were sourced from the Vernon Jansen Unit at the University of Auckland, where the animal model had been developed. They were time-mated using a rat oestrous cycle monitor (Fine Science Tools, Foster City, CA, USA) and thereafter were housed individually in standard rat cages in the same room, with free access to water, a constant temperature of 25°C, and a 12:12 light:dark cycle. Pregnant dams were randomly allocated to one of four dietary groups (6 per group): 1) CONTROL in which dams were fed *ad libitum* throughout pregnancy and lactation with a standard diet (protein 18%, fat 5%; digestible energy 3.4 kcal/g; Teklad Global 18% Protein Diet, Diet 2018); 2) UNPL in which dams were fed 50% of CONTROL intake throughout both pregnancy and lactation; 3) UNP in which dams were fed 50% of CONTROL intake throughout pregnancy, then fed *ad libitum* throughout lactation; and 4) UNL in which dams were fed *ad libitum* throughout pregnancy but then fed 50% of CONTROL intake throughout lactation.

Body mass and age at puberty

After birth, pups were weighed and litter size was adjusted to four males and four females per litter to ensure standardized nutrition until weaning on Day 22 *postpartum*. After weaning, male offspring were housed in pairs and fed the standard chow diet *ad libitum* until the end of the study (160 days).

Testis sampling and processing

On postnatal Day 160, male offspring (n = 40; 10 per dietary group) were fasted overnight, weighed, anesthetized with pentobarbitone (60 mg/kg intraperitoneally) and then killed by decapitation. Blood was collected into heparinized vacutainers tubes and centrifuged (2400 × g, 20 min) and plasma was separated and stored at −20°C until analysis. The values for body mass and total testis mass were used to calculate relative testis mass and gonadosomatic index (the ratio of testis mass to body mass). The left testes were frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C in preparation for molecular analyses. Right testes were immersed in fixative (4% formaldehyde phosphate buffer, pH 7.4) for 24 h.

Histology and immunohistochemistry

Fixed testes were progressively dehydrated by immersion in increasing concentrations of ethanol (70%, 95%, 100%), embedded in paraffin resin (Historesin; Leica, Heidelberg, Germany), and sectioned at 5 μm by microtome (Leica 149 Reichert Jung Biocut 2030, Wetzlar, Germany), in preparation for staining and immunohistochemistry. Slides were processed for the detection of immunoexpression for active caspase-3, Bax, Bcl-2, ETV5, GDNF, HSP90 and HSP70 using the streptavidin-biotin-peroxidase protocol, described previously (Pedrana *et al*. 2020). In brief, tissue sections were deparaffinized, rehydrated by heat-induced epitope retrieval for 5 min in a microwave oven, by immersion in 0.01-M citrate buffer (pH 6.0) and Tween (5 ml); slides were washed with distilled water and phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4); endogenous peroxidases were inactivated with 3% hydrogen peroxide 200 (20 min), followed by washing in PBS and incubation with normal rat serum to block non-specific binding proteins; sections were then incubated for 30 min with each primary antibody on different slides (Table 1), for 30 min with biotinylated secondary antibody (Mouse Specific HRP/DAB, ab 64259, Abcam, USA; or Rabbit Specific HRP/DAB, ab 64261; Abcam, USA; depending on the origin of the primary antibody); slides were then incubated with streptavidin–peroxidase enzyme complex for 30 min; incubation with diaminobenzidine (DAB) chromogen solution (1.5 mL hydrogen peroxide + 30 μl DAB) for 5 min to visualize the antigen; sections were counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, and mounted with Entellan® (Merck, Germany) mounted on glass coverslips. The specificity of the antibodies was verified by substitution of the primary antibody with normal serum, diluted 1:100 or 1:200 in PBS, according to the dilution of the primary antibody. All assays contained a negative control. Positive controls were ovine testis and mammary gland tumours.

Image analysis

Digital images were obtained using a light microscope (Olympus CX23; Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (Dino-Eyepiece, AM-7023X; AnMo Electronics Corporation, Taiwan), and then analysed with DinoCapture 2.0 software (AnMo Electronics Corporation, Taiwan). Digital images of all seminiferous tubules within a cross section of the testis were captured and analysed at 400× and 600× magnification. For each protein (Table 1), the immunostained area (IA) was quantified by digital image analysis using ImageJ software (Version 1.52b 6 May 2018; Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; http://rsb.info.nih.gov/). All proteins analysed were measured in seminiferous tubules sections, considering only IA occupied by seminiferous tubule were described and quantified by ImageJ. Areas of immunopositivity were measured using a locally written macro that included colour threshold values from RGB images

and conversion to binary images and area measurement. This process provided quantitative values for the percentage of IA. A batch mode was performed to apply the macro to all images.

Immunoexpression of GDNF was analysed in 200 digital images for each testis. The tubules were classified according to stage of cycle (Stages I to XIV as described previously for the rat; GDNF (Johnston *et al.* 2011). All stages were assessed but, for the present study, there was a focus on the period before spermiation (up to Stage VII). To reduce systematic random variation, a consensus decision was made by two observers simultaneously examining each section to define the stage of spermatogenic cycle, as suggested in previous studies (Hess *et al.* 1990).

Gene expression analysis by qPCR

Total RNA was extracted using commercially available kits (AllPrep DNA/RNA mini kit; cat 80204; Qiagen). Genomic DNA contamination was removed from each sample by treatment with RNase-free DNase (Invitrogen Life Technologies, Auckland, New Zealand) according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were analysed using a NanoDrop spectrophotometer (ND-1000; BioLab Ltd) and NanoDrop software (version 3.1.2). All RNA samples were stored at −80°C until required. Five micrograms of total RNA was used for first-strand cDNA synthesis using the Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV-RT; Promega Corp., WI, USA) and a standard thermocycler (GeneAmp® PCR System 9700; Applied Biosystems, CA, USA). A master mix was prepared containing 5-µl M-MLV 5× buffer (cat M531A; In Vitro Technologies), 0.5-µl M-MLV-RT (cat M170B; In Vitro Technologies), and 1.25-µl 10 µM deoxynucleoside-triphosphates (cat R0181; Global Science). We used the following cycling conditions: an initial denaturation stage of 5 min at 96 °C followed by 30 cycles (30 s each) of 96 °C (denaturation), 60 °C (annealing stage), and 72 °C (extension stage). The cDNA was stored at –20 °C until assay by quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

Testicular gene expression for caspase-3, Bax, Bcl-2 and the endogenous reference (ß-actin) was measured by qPCR using the ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Auckland, New Zealand). All primers were designed using Primer 3 software (version 0.4.0, Whitehead Institute for Biomedical Research) manufactured by Invitrogen (Invitrogen Life Technologies). Primer set controls were ß-actin forward primer CACCAACTGGGACGATATGGA and ß-actin reverse primer CAGCCTGGATGGCTACGTACAT, 188bp. Optimal primer conditions were adjusted to cycling conditions: length 20 bp (range 17–23 bp); Tm 63 °C (range 60–65 °C); and amplicon length 100–300 bp. Dissociation analyses were performed to ensure specificity and only samples producing a

single peak in the dissociation curves were used. Amplified products were visualized on an agarose gel using the E-Gel® CloneWell 0.8% SYBR Safe gel (cat G6618-08; Invitrogen), run on the E-Gel® iBase™ Power System (cat G6400; Invitrogen) and sequenced by spectrophotometry (Allan Wilson Centre, Massey University, New Zealand). The resulting sequences were evaluated using NCBI BLAST to ensure specificity.

Transcript levels were quantified by qPCR under the following conditions: an initial 2-min hold period at 50 °C for normalization (Stage 1), followed by enzyme activation at 95 °C for 2 min (Stage 2); amplification of the gene product through 40 successive cycles of 95 °C for 15 sec and then 60 °C for 1 min (Stage 3); followed by a dissociation stage of 15 s at 95 °C, 15 s at 60 °C, and 2 min at 99 °C (Stage 4). A standard curve was generated from the mean cycle threshold (Ct) of eight standards (1:5 serial dilution) of a known concentration in triplicate, while amplification and dissociation curves were generated for all standards and samples (Applied Biosystems). Each sample was run in triplicate.

Statistical analyses

Effects of treatment on the expression of caspase-3, Bax and Bcl-2, and on IA (%) for caspase-3, Bax, Bcl-2, GDNF, ETV5, HSP70 and HSP90, were analysed using a one-way ANOVA in a general linear model GLM (SAS for Windows, CA, USA) and *post-hoc* Tukey's tests. All data are reported as mean ± SEM. In all cases, the level of significance was $P < 0.05$.

Results

Caspase-3 immunolocalization, immunostained area (IA) and mRNA levels

Immunostaining for caspase-3 was clearly evident in the testis, and the distribution and intensity of staining varied with the type of cells present and therefore with the stage of the spermatogenic cycle. In the UNPL group, seminiferous tubules at Stage VII of spermatogenic cycle showed caspase-3 apoptotic protein in round spermatids localized near the basal lamina of the seminiferous tubules, but not in spermatocytes and spermatogonia (Fig. 1a, b). In all four treatments groups, staining was notable in the cytoplasm and nuclei of round spermatids in the ad-luminal region of the seminiferous tubules (Figs. 1 and 3A). In the UNPL group, caspase-3 was also detected in the middle and basal compartments of the seminiferous tubules, in the spermatogonia, spermatocytes and Sertoli cells (Fig. 1 and 3A). The IA for Caspase-3 in the seminiferous tubules was greater in the UNPL ($p = 0.001$) than in the CONTROL group (Fig. 3B). In contrast, caspase-3 mRNA levels in the testis were greater in the UNP group compared to the CONTROL group (Fig. 3C).

Bax immunolocalization, immunostained area and mRNA

In the CONTROL group, Sertoli cells showed Bax immunostaining in the cytoplasm and elongated spermatids nuclei, although was absent in spermatogonia. In contrast, in all three undernutrition groups (UNP, UNL UNPL), intense Bax immunostaining was evident in Sertoli cell cytoplasm and elongated spermatids, and spermatogonia were stained in both the cytoplasm and nuclei (Fig. 3D). Bax IA was greater ($p = 0.002$) in UNL than in any other group (Fig. 3E). On the other hand, levels of Bax mRNA did not differ among treatments (Fig. 3F).

Bcl-2 immunolocalization, immunostained area and mRNA

In the CONTROL group, Bcl-2 was immunolocalized in the Sertoli cell cytoplasm and in the nuclei of elongated spermatids (Fig. 3G). In both the UNPL and UNL groups, intense immunostaining for Bcl-2 was evident in degenerating pachytene spermatocytes and round spermatids at Stage VII of spermatogenic cycle (Fig. 2 and Fig. 3G). In the UNPL group, the lumen of the seminiferous tubules at cycle Stage VII contained detached round spermatids and only a few spermatozoa (Fig. 2). In the round spermatids, Bcl-2 was localized in the acrosome perinuclear region whereas, in elongated spermatids, it was localized in the nuclear region (Figs. 2, 3G). The area immunostained for Bcl-2 was greater in all undernutrition groups ($p < 0.0001$) compared to the CONTROL group (Fig. 3H). As with Bax, Bcl-2 mRNA levels did not differ among groups (Fig. 3I).

GDNF and ETV5 immunolocalization and immunostained area

In the CONTROL group, moderate GDNF immunostaining was detected in the cytoplasm of Sertoli cells, but there was minimal, immunoexpression in the cytoplasm or nuclei of spermatogonia. In contrast, in all three undernutrition groups (UNP, UNL, UNPL), GDNF staining was clearly evident in the cytoplasm of spermatogonia and leptotene spermatocytes, and in the nuclei of elongated spermatids. The strongest GDNF immunostaining was detected in spermatids in the UNP and UNL groups (Fig. 4A), and the area stained was greater in the UNP ($p < 0.01$) and UNL groups ($p < 0.009$) compared to the CONTROL group (Fig. 4B). In Stage VII of the spermatogenic cycle, the area immunostained for GDNF was greater in the UNP ($p < 0.0036$), UNL ($p < 0.0001$) and UNPL ($p < 0.0561$) than in CONTROL (Fig. 4C`).

ETV5, immunostaining was detected in the Sertoli cell cytoplasm, with the most intense expression observed in the undernutrition groups (Fig. 4D). The area immunostained for ETV5 was greater ($p < 0.0001$) in all undernutrition groups (UNP, UNL, UNPL) compared to the CONTROL group (Fig. 4F).

For Review Only

HSP70 and HSP90 immunolocalization and immunostained area

In the CONTROL group, HSP70 immunostaining was localized to the interstitial tissue between the seminiferous tubules; inside the seminiferous tubules, only a few spermatogonia showed slight immunostaining in the cytoplasm or nucleus. In the undernutrition groups (UNP, UNL, UNPL), on the other hand, HSP70 was detected in the cytoplasm of spermatogonia, primary spermatocytes (pachytene stage) and elongated spermatids, where it was also evident in the nucleus (Fig. 5A). The IA for HSP70 was greater ($p < 0.0001$) in the undernutrition groups (UNP, UNL, UNPL) compared to the CONTROL group (Fig. 5A`).

In all groups, HSP90 immunostaining was detected in the nuclei of spermatogonia, in the cytoplasm of pachytene spermatocytes and round spermatids, and in the nuclei of elongated spermatids. Immunostaining was intense in the nuclei of elongated spermatids in the UNP group (Fig. 5B). The IA for HSP90 was greater ($p < 0.0001$) in CONTROL group compared to the undernutrition groups (UNP, UNL, UNPL; Fig. 5B`).

Discussion

Maternal undernutrition, during pregnancy or lactation, affects testis development in the offspring through metabolic signals in the developing tissue such as those provided by the insulin-like growth factor system (Pedrana *et al*., 2020). We now know that important markers of testis function in adult offspring are also affected, including transcription factors (GDNF, ETV5), pro- and anti-apoptotic proteins (Caspase 3, Bax, Bcl-2), and heat-shock proteins (HSP90, HSP70). These observations need to be interpreted in the context of spermatogenesis being a controlled process, in which proliferation is balanced against apoptosis to ensure the number of germ cells does not exceed the maximum that the Sertoli cells can support (Russell *et al.* 2002). The balance of proliferation and apoptosis will be affected by changes in GDNF and ETV5 because these transcription factors control the activity of pro- and anti-apoptotic proteins. Moreover, these outcomes will be exacerbated by changes in the expression of HSP90 and HSP70 because of their important roles in meiosis and spermiogenesis. Undernutrition during pregnancy and lactation (UNPL) has greater effects than undernutrition during only pregnancy (UNP) or only lactation (UNL), as would be expected, although we observed some specific differences between UNP and UNL in the responses of Sertoli cells and germ cells, perhaps reflecting the sequence of developmental processes in the testis. Our current hypothesis about how maternal undernutrition affects the testis of adult offspring in the rat is summarised in Fig. 6.

For Review Only

Transcription factors GDNF, ETV5

The effects of maternal undernutrition on GNDF would be transmitted via receptors in type A spermatogonia, with consequences for production of members of the anti-apoptotic Bcl family of proteins (Jijiwa *et al.* 2008; Johnston *et al.* 2011; Rossi and Dolci 2013; Takashima *et al.* 2015). Importantly, we observed an increase in GDNF in Stage VII of the spermatogenic cycle, at a time when it would be decreasing during normal development (Johnston *et al.* 2011). An excess of GDNF promotes the proliferation of clusters of undifferentiated type A spermatogonia, and these clusters can evolve into testicular tumours that resemble the human seminoma (Tadokoro *et al.* 2002). Similarly, ETS proteins, such as ETV5, are also thought to control production the Bcl family in the testis (Hofmann 2008; Schmidt *et al.* 2009; Ishii *et al.* 2012) and therefore play a role in regulating cell survival and entry into the S phase of the cell cycle (Puli *et al.* 2018). Etv5 appears to be one of the few transcription factors expressed by Sertoli cells that control SSC self-renewal through either CXCL12/CXCR4 or CCL9/CCR1 signalling (Chen and Liu 2015). Therefore, increased production of GNDF and ETV5 by Sertoli cells is consistent with the increase in germ cell number that we previously observed in the same model of maternal undernutrition (Pedrana *et al.* 2020). With an overproduction of germ cells, the capacity of the Sertoli cells to support germ cell development would be exceeded, potentially leading to defects in spermatogenesis.

Pro-apoptotic (caspase-3, Bax) and anti-apoptotic (Bcl-2) proteins

Some apoptosis is integral to the process of spermatogenesis to limit the number of germ cells that a Sertoli cell must support, a process controlled by the Sertoli cells themselves through paracrine signalling that balances pro-apoptotic factors (caspase-3, Bax) and anti-apoptotic factors such as Bcl-2 (Murphy and Richburg 2014). Maternal undernutrition during pregnancy and lactation increased caspase-3 production in the detached spermatids seen in the lumen of the seminiferous tubules, suggesting a disruption of the elaborate network of cell junctions between Sertoli cells and spermatids that confers structural, communication and signalling support for the survival of developing germ cells (Gao *et al.* 2015). However, maternal undernutrition during lactation only led to a decrease in caspase-3, mostly in spermatocytes and spermatids, and also an increase in Bax, mostly in spermatocytes, suggesting differential consequences in testicular cells according timing of undernutrition.

Interestingly, our results showed an increase Blc-2 in testis offspring from all maternal undernutrition groups, consistent with the inhibitory effects of Bcl-2 overexpression on normal spermatogonial apoptosis that leads to accumulation of spermatogonia, forcing them to survive

For Review Only

with consequences for differentiation during spermiogenesis (Furuchi *et al.* 1996; Shaha *et al.*, 2010). As Bcl-2 is a pro-survival protein (Shamas-Din *et al.* 2013) and considered to be a 'rheostat' in Sertoli cells and germ cells (Yamamoto *et al.* 2001), upregulation of Bcl-2 genes causes severe attenuation of germ cell apoptosis (Wright *et al.* 2007). This situation is consistent with our observation of an increase in Bcl-2 proteins in the maternal undernutrition groups.

Taken together, our observations make it clear that, in the testis of the offspring of nutritionally compromised mothers, there is an imbalance between germ cell proliferation and germ cell loss through Sertoli-cell-regulated apoptosis, mediated by transcription factors, with potentially harmful outcomes for spermatogenesis. The overall outcome is excessive proliferation becomes, although there appears to come variation in the response to undernutrition with different key developmental windows. Interestingly, the testicular anti-apoptotic mechanisms activated by maternal undernutrition seem to parallel other pathologies such as cancer (Montero and Letai 2017).

Heat shock protein 70

HSP70 is known to be a molecular chaperon for both meiosis (Scieglinska and Krawczyk 2015) and spermiogenesis (Govin *et al.* 2006), so these processes would be expected to be impaired by the increased expression of HSP70 in the testis of offspring from mothers underfed during pregnancy and lactation. Furthermore, overexpression of HSP70 is associated with resistance to apoptosis in other tissues, blocking apoptosome formation (Beere 2004) and increasing Bcl-2 expression in cerebral ischemia (FitzGerald *et al.* 2009). Moreover, HSP70 expression is activated by hypoxia, a condition frequently associated with tumour progression (Scieglinska and Krawczyk 2015). On the other hand, an increase in HSP70 production has been seen as a protective mechanism in germ cells, preventing cellular damage induced by stress, elevated environmental temperatures, or toxicants such as 2,5-hexanedione (Sertoli cell toxicant), ethylene glycol monomethyl ether (EGME; spermatocyte toxicant), cyclophosphamide (spermatogonia toxicant) and sulfasalazine (Fukushima *et al.* 2005) or lindane organochlorine pesticide (Saradha *et al.* 2008). It seems likely that the increase in HSP70 in the germ cells of adult offspring, caused by maternal undernutrition, reflects the activation of protective mechanism.

Heat shock protein 90

Because HSP90 also plays a role as a chaperone protein (Dixit and Verkhivker 2012; Verba and Agard 2017), it is interesting that its expression was decreased by maternal undernutrition during pregnancy and lactation, in contrast with HSP70. However, HSP90 promotes the stability and

For Review Only

activation of post-meiotic kinases in spermatids (Jha *et al.* 2013) during spermiogenesis, so a decrease or a complete absence of the protein would lead to testis atrophy and azoospermia (Grad *et al.* 2010), an increase sensitivity to apoptotic stimuli, and a decrease in spermatid kinases (Jha *et al.* 2013), and oligoasthenozoospermia, as seen on men (Sagare-Patil *et al.* 2017). Moreover, the effects of maternal undernutrition on HSP90 expression are consistent with the decreases that we observed in the frequency of Stage VII in the spermatogenic cycle, before spermiation begins (Pedrana *et al.* 2020). Overall, the testicular HSP90 response would help explain any problems with spermatogenesis, particularly in the process of spermiogenesis.

Conclusion

We conclude that, maternal undernutrition during pregnancy and lactation evokes modifications in the production of transcription factors, heat shock proteins, and apoptotic proteins in the testis of adult offspring. These responses probably alter the equilibrium between apoptosis and proliferation, an essential component in the control of spermatogenesis, with potential for a major, long-term impact on the regulation of fertility. Reproduction is a conserved evolutionary process (Sharpe 2018) so these programmed changes in testicular development may represent an adaptative, inter-generational mechanism that anticipates compromised nutrition for the offspring in later life, thus maximizing reproductive fitness.

Author Contributions. DMS and MHV conceived and designed the experiments. GP, HV, AD, CL, performed laboratory analyses and analysed the data. GBM, GP, DMS, HV, MHV, CL, AD and DC contributed reagents/materials/analysis tools. GP, GBM, MHV, DMS, and DC wrote the manuscript.

Acknowledgement

We thank Mónica Viqueira, technician in Histology Laboratory, for her help in microtome procedure of samples of rat testis, and Vanesa Pereira and Ronell Bologna for their kind help in the scanning of images.

Financial support

This research was supported by Health Research Council of New Zealand, Gravida: National Centre for Growth and Development, and the Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CSIC) Foundation (CSIC Financial Support Grant 2016), and Universidad de la República, Uruguay. DMS holds a Canada Research Chair in Perinatal Programming.

For Review Only

Conflicts of Interest. The authors have no conflicts to declare.

References

Au C. E., Hermo L., Byrne E., Smirle J., Fazel A., Simon P. H. G., Kearney R. E., Cameron P. H., Smith C. E., Vali H., Fernandez-Rodriguez J., Ma K., Nilsson T., and Bergeron J. J. M. (2015). Expression, sorting, and segregation of Golgi proteins during germ cell differentiation in the testis. *Mol. Biol. Cell* **26**, 4015–4032. doi:10.1091/mbc.E14-12-1632

Bateson P., Barker D., Clutton-Brock T., Deb D., D'Udine B., Foley R. A., Gluckman P., Godfrey K., Kirkwood T., Lahr M. M., McNamara J., Metcalfe N. B., Monaghan P., Spencer H. G., and Sultan S. E. (2004). Developmental plasticity and human health. *Nature* **430**, 419–421. doi:10.1038/nature02725

Beere H. M. (2004). 'The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* **117**, 2641–2651. doi:10.1242/jcs.01284

Bell A. W., and Greenwood P. L. (2016). Prenatal origins of postnatal variation in growth, development and productivity of ruminants. *Anim. Prod. Sci.* **56**, 1217–1232. doi:10.1071/AN15408

Chen S.-R., and Liu Y.-X. (2015). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction* **149**, R159–R167. doi:10.1530/REP-14-0481

Cooke S., Hess A., Simon L., Schlesser N., Carnes K., Tyagi G., Hofmann C., and Murphy M. (2006). The transcription factor Ets-Related Molecule (ERM) is essential for spermatogonial stem cell maintenance and self-renewal. *Regulation* **1**, 98–107.

Dixit A., and Verkhivker G. M. (2012). Probing Molecular Mechanisms of the Hsp90 Chaperone: Biophysical Modeling Identifies Key Regulators of Functional Dynamics (S Rutherford, Ed.). *PLoS One* **7**, e37605. doi:10.1371/journal.pone.0037605

Domingos F. F. T., Thomé R. G., Martinelli P. M., Sato Y., Bazzoli N., and Rizzo E. (2013). Role of HSP70 in the regulation of the testicular apoptosis in a seasonal breeding teleost Prochilodus argenteus from the São Francisco River, Brazil. *Microsc. Res. Tech.* **76**, 350–356. doi:10.1002/jemt.22173

Figueiredo A. F. A., França L. R., Hess R. A., and Costa G. M. J. (2016). Sertoli cells are capable

For Review Only

of proliferation into adulthood in the transition region between the seminiferous tubules and the rete testis in Wistar rats. *Cell Cycle* **15**, 2486–2496. doi:10.1080/15384101.2016.1207835

FitzGerald U., Gorman A. M., and Samali A. (2009). Heat shock proteins and the regulation of apoptosis. In 'Heat Shock Proteins in Neural Cells' pp. 53–66. Neuroscience Intelligence Unit (Springer New York: New York, NY) doi:10.1007/978-0-387-39954-6_5

França L. R., Hess R. A., Dufour J. M., Hofmann M. C., and Griswold M. D. (2016). The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* **4**, 189–212. doi:10.1111/andr.12165

Fukushima T., Yamamoto T., Kikkawa R., Hamada Y., Komiyama M., Mori C., and Horii I. (2005). Effects of male reproductive toxicants on gene expression in rat testes. *J. Toxicol. Sci.* **30**, 195–206. doi:10.2131/jts.30.195

Furuchi T., Masuko K., Nishimune Y., Obinata M., and Matsui Y. (1996). Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development* **122**, 1703–1709. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674410

Gao Y., Mruk D. D., and Cheng C. Y. (2015). Sertoli cells are the target of environmental toxicants in the testis – a mechanistic and therapeutic insight. *Expert Opin. Ther. Targets* **19**, 1073–1090. doi:10.1517/14728222.2015.1039513

Govin J., Caron C., Escoffier E., Ferro M., Kuhn L., Rousseaux S., Eddy E. M., Garin J., and Khochbin S. (2006). Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* **281**, 37888–37892. doi:10.1074/jbc.M608147200

Grad I., Cederroth C. R., Walicki J., Grey C., Barluenga S., Winssinger N., De Massy B., Nef S., and Picard D. (2010). The molecular chaperone Hsp90α is required for meiotic progression of spermatocytes beyond pachytene in the mouse. *PLoS One* **5**, e15770. doi:10.1371/journal.pone.0015770

Hess R. A., Schaeffer D. J., Eroschenko V. P., and Keen J. E. (1990). Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biol. Reprod.* **43**, 517–524. doi:10.1095/biolreprod43.3.517

Hofmann M.-C. (2008). Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol. Cell. Endocrinol.* **288**, 95–103. doi:10.1016/j.mce.2008.04.012

For Review Only

Howie G. J., Sloboda D. M., and Vickers M. H. (2012). Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. *Br. J. Nutr.* **108**, 298–307. doi:10.1017/S000711451100554X

Ishii K., Kanatsu-Shinohara M., Toyokuni S., and Shinohara T. (2012). FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. *Development* **139**, 1734–1743. doi:10.1242/dev.076539

Jazwiec P. A., and Sloboda D. M. (2019). Nutritional adversity, sex and reproduction: 30 years of DOHaD and what have we learned? *J. Endocrinol.* **242**, T51–T68. doi:10.1530/JOE-19-0048

Jha K. N., Coleman A. R., Wong L., Salicioni A. M., Howcroft E., and Johnson G. R. (2013). Heat shock protein 90 functions to stabilize and activate the testis-specific serine/threonine kinases, a family of kinases essential for male fertility. *J. Biol. Chem.* **288**, 16308–16320. doi:10.1074/jbc.M112.400978

Jijiwa M., Kawai K., Fukihara J., Nakamura A., Hasegawa M., Suzuki C., Sato T., Enomoto A., Asai N., Murakumo Y., and Takahashi M. (2008). GDNF-mediated signaling via RET tyrosine 1062 is essential for maintenance of spermatogonial stem cells. *Genes to Cells* **13**, 365–374. doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01171.x

Johnston D. S., Olivas E., DiCandeloro P., and Wright W. W. (2011). Stage-specific changes in GDNF expression by rat Sertoli cells: a possible regulator of the replication and differentiation of stem spermatogonia. *Biol. Reprod.* **85**, 763–769. doi:10.1095/biolreprod.110.087676

Kennedy D., Jäger R., Mosser D. D., and Samali A. (2014). Regulation of apoptosis by heat shock proteins. *IUBMB Life* **66**, 327–338. doi:10.1002/iub.1274

Kereliuk S., Brawerman G., Dolinsky V., Kereliuk S. M., Brawerman G. M., and Dolinsky V. W. (2017). Maternal macronutrient consumption and the developmental origins of metabolic disease in the offspring. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1451. doi:10.3390/ijms18071451

Khorram O., Keen-Rinehart E., Chuang T. Der, Ross M. G., and Desai M. (2015). Maternal undernutrition induces premature reproductive senescence in adult female rat offspring. *Fertil. Steril.* **103**, 291–298. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.09.026

Kotoglou P., Kalaitzakis A., Vezyraki P., Tzavaras T., Michalis L. K., Dantzer F., Jung J. U., and

For Review Only

Angelidis C. (2009). Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. *Cell Stress Chaperones* **14**, 391–406. doi:10.1007/s12192-008-0093-6

Langley-Evans S. C. (2015). Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *J. Hum. Nutr. Diet.* **28**, 1–14. doi:10.1111/jhn.12212

Langley-Evans S. C., and McMullen S. (2010). Developmental origins of adult disease. *Med. Princ. Pract.* **19**, 87–98. doi:10.1159/000273066

Léonhardt M., Lesage J., Croix D., Dutriez-Casteloot I., Beauvillain J. C., and Dupouy J. P. (2003). Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol. Reprod.* **68**, 390–400. doi:10.1095/biolreprod.102.003269

Martin G. B., Blache D., Miller D. W., and Vercoe P. E. (2010). Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. *Animal* **4**, 1214–1226. doi:10.1017/S1751731109991674

Meng X., Lindahl M., Hyvönen M. E., Parvinen M., de Rooij D. G., Hess M. W., Raatikainen-Ahokas A., Sainio K., Rauvala H., Lakso M., Pichel J. G., Westphal H., Saarma M., and Sariola H. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* **287**, 1489–1493. doi:10.1126/science.287.5457.1489

Montero J., and Letai A. (2017). Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? *Nat. Publ. Gr.* **25**, 56–64. doi:10.1038/cdd.2017.183

Murphy C. J., and Richburg J. H. (2014). Implications of Sertoli cell induced germ cell apoptosis to testicular pathology. *Spermatogenesis* **4**, e979110. doi:10.4161/21565562.2014.979110

Oatley J. M., Avarbock M. R., and Brinster R. L. (2007). Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 25842–25851. doi:10.1074/jbc.M703474200

Pedrana G., Viotti H., Lombide P., Cavestany D., Martin G., Vickers M., and Sloboda D. (2020). Maternal undernutrition during pregnancy and lactation affects testicular morphology, the stages of spermatogenic cycle, and the testicular IGF-I system in adult offspring. *J. Dev. Orig. Health Dis.* doi: 10.1017/S2040174420000306

For Review Only

Puli O. R., Danysh B. P., McBeath E., Sinha D. K., Hoang N. M., Powell R. T., Danysh H. E., Cabanillas M. E., Cote G. J., and Hofmann M. C. (2018). The Transcription Factor ETV5 Mediates BRAFV600E-Induced Proliferation and TWIST1 Expression in Papillary Thyroid Cancer Cells. *Neoplasia (United States)* **20**, 1121–1134. doi:10.1016/j.neo.2018.09.003

Rossi P., and Dolci S. (2013). Paracrine mechanisms involved in the control of early stages of mammalian spermatogenesis. *Frontiers in Endocrinology* **4**, 181. doi: 10.3389/fendo.2013.00181

Russell L. D., Chiarini-garcia H., Korsmeyer S. J., and Knudson C. M. (2002). Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development. **958**, 950–958. doi:10.1095/biolreprod66.4.950

Sagare-Patil V., Bhilawadikar R., Galvankar M., Zaveri K., Hinduja I., and Modi D. (2017). Progesterone requires heat shock protein 90 (HSP90) in human sperm to regulate motility and acrosome reaction. *J. Assist. Reprod. Genet.* **34**, 495–503. doi:10.1007/s10815-017-0879-5

Saradha B., Vaithinathan S., and Mathur P. P. (2008). Lindane alters the levels of HSP70 and clusterin in adult rat testis. *Toxicology* **243**, 116–123. doi:10.1016/j.tox.2007.09.029

Sarge K. D., and Cullen K. E. (1997). Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 191–197. doi:10.1007/pl00000591

Schlesser H. N., Simon L., Hofmann M.-C., Murphy K. M., Murphy T., Hess R. A., and Cooke P. S. (2008). Effects of ETV5 (ets variant gene 5) on testis and body growth, time course of spermatogonial stem cell loss, and fertility in mice. *Biol. Reprod.* **78**, 483–489. doi:10.1095/biolreprod.107.062935

Schmidt J. A., Avarbock M. R., Tobias J. W., and Brinster R. L. (2009). Identification of glial cell line-derived neurotrophic factor-regulated genes important for spermatogonial stem cell self-renewal in the rat. *Biol. Reprod.* **81**, 56–66. doi:10.1095/biolreprod.108.075358

Scieglinska D., and Krawczyk Z. (2015). Expression, function, and regulation of the testis-enriched heat shock HSPA2 gene in rodents and humans. *Cell Stress Chaperones* **20**, 221–235. doi:10.1007/s12192-014-0548-x

Selim M. E., Rashed E. H., Aleisa N., and Daghestani M. H. (2012). The protection role of heat shock protein 70 (HSP-70) in the testes of cadmium-exposed rats. *Bioinformation* **8**, 58–64.

For Review Only

doi:10.6026/97320630008058

Shaha C., Tripathi R., and Prasad Mishra D. (2010). Male germ cell apoptosis: Regulation and biology. *Phil. Trans. R. Soc. B* **365**, 1501–1515. doi:10.1098/rstb.2009.0124

Shamas-Din A., Kale J., Leber B., and Andrews D. W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a008714. doi:10.1101/cshperspect.a008714

Sharpe R. M. (2018). Programmed for sex: Nutrition-reproduction relationships from an inter-generational perspective. *Reproduction* **155**, S1–S16. doi:10.1530/REP-17-0537

Simon L., Ekman G. C., Tyagi G., Hess R. A., Murphy K. M., and Cooke P. S. (2007). Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance. *Exp. Cell Res.* **313**, 3090–3099. doi:10.1016/j.yexcr.2007.05.002

Sinclair K. D., Rutherford K. M. D., Wallace J. M., Brameld J. M., Stöger R., Alberio R., Sweetman D., Gardner D. S., Perry V. E. A., Adam C. L., Ashworth C. J., Robinson J. E., and Dwyer C. M. (2016). Epigenetics and developmental programming of welfare and production traits in farm animals. *Reprod. Fertil. Develop.* **28**, 1443–1478. doi:10.1071/RD16102

Singh D., Paduch D. A., Schlegel P. N., Orwig K. E., Mielnik A., Bolyakov A., and Wright W. W. (2017). The production of glial cell line-derived neurotrophic factor by human sertoli cells is substantially reduced in sertoli cell-only testes. *Hum. Reprod.* **32**, 1108–1117. doi:10.1093/humrep/dex061

Tadokoro Y., Yomogida K., Ohta H., Tohda A., and Nishimune Y. (2002). Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech. Dev.* **113**, 29–39. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11900972

Takashima S., Kanatsu-Shinohara M., Tanaka T., Morimoto H., Inoue K., Ogonuki N., Jijiwa M., Takahashi M., Ogura A., and Shinohara T. (2015). Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cell Rep.* **4**, 489–502. doi:10.1016/j.stemcr.2015.01.010

Toledo F. C., Perobelli J. E., Pedrosa F. P. C., Anselmo-Franci J. A., and Kempinas W. D. G. (2011). In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult

For Review Only

male rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **9**, 94. doi:10.1186/1477-7827-9-94

Tyagi G., Carnes K., Morrow C., Kostereva N. V., Ekman G. C., Meling D. D., Hostetler C., Griswold M., Murphy K. M., Hess R. A., Hofmann M.-C., and Cooke P. S. (2009). Loss of Etv5 decreases proliferation and RET levels in neonatal mouse testicular germ cells and causes an abnormal first wave of spermatogenesis. *Biol. Reprod.* **81**, 258–266. doi:10.1095/biolreprod.108.075200

Verba K. A., and Agard D. A. (2017). How Hsp90 and Cdc37 Lubricate Kinase Molecular Switches. *Trend Biochem. Sci.* **42**, 799–811. doi:10.1016/j.tibs.2017.07.002

Wadhwa P. D., Buss C., Entringer S., and Swanson J. M. (2009). Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin. Reprod. Med.* **27**, 358–368. doi:10.1055/s-0029-1237424

Wright A., Reiley W. W., Chang M., Jin W., Lee A. J., Zhang M., and Sun S. C. (2007). Regulation of early wave of germ cell apoptosis and spermatogenesis by deubiquitinating enzyme CYLD. *Dev. Cell* **13**, 705–716. doi:10.1016/j.devcel.2007.09.007

Yamamoto C. M., Hikim A. P., Lue Y., Portugal A. M., Guo T. B., Hsu S. Y., Salameh W. A., Wang C., Hsueh A. J., and Swerdloff R. S. (2001). Impairment of spermatogenesis in transgenic mice with selective overexpression of Bcl-2 in the somatic cells of the testis. *J. Androl.* **22**, 981–991. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700863

For Review Only

Figure legends

Fig. 1. Representative photographs of immunoreactive caspase-3 protein (brown) in rat testis of offspring whose mothers were undernourished during pregnancy and lactation (UNPL), showing cross sections of seminiferous tubules at stage VII of spermatogenic cycle. a) localization in Sertoli cells (white arrows). a, b) Round spermatids (black arrow) near the basal lamina at the bottom of seminiferous tubules, where spermatocytes and spermatogonial cells should be localized. a) Round spermatid cells (dotted area) and spermatozoids are seen in the lumen of seminiferous tubule. The presence of detached round spermatids at the lumen suggests failure of the cellular unions in seminiferous epithelium. c) A negative control (no primary antibody) was included in each run and showed no staining (not shown). Scale bar represents 10 μm.

Fig. 2. Representative photographs of immunoreactive Bcl-2 protein (brown) in the testis of offspring of mothers that were underfed during pregnancy and lactation (UNPL). A): a) Apoptotic bodies immune-positive to Bcl-2 (white arrows) and b) apoptotic round spermatids showing a negative blue nucleus with loss of round shape (black arrow) detected at the lumen of the seminiferous tubules in stage VII of spermatogenic cycle (prior to spermiation). c) Lumen of seminiferous tubule showing spermatozoids. Spermatid retention could be an early and sensitive indicator of testosterone depletion. B) Upper image: a negative control (no primary antibody) was included in each run and showed no staining. Scale bar represents 10 μm.

Fig. 3. Effect of maternal undernutrition on immunolocalization (brown) and relative mRNA levels for caspase-3 Bax and Bcl-2 in the testis. A) Representative photographs of tissue stained for immunoreactive caspase-3. Spermatogonia and spermatocytes were negative to caspase-3 in control testes, but immunopositive caspase-3 was evident in all underfed groups, in round spermatids close to the basal membrane (white arrows). Sertoli cells show intense immunoexpression of caspase-3 in UNPL offspring (black arrow). B) Percentage of immune-positive caspase-3 cells in each section. C) Relative caspase-3 mRNA levels. D) Representative photographs of tissue stained for immunoreactive Bax showing positive Sertoli cells (black arrows) and spermatogonia (white arrows). E) Percentage of immune-positive Bax cells in each section. F) Relative Bax mRNA levels. G) Representative photographs of tissue stained for immunoreactive Bcl-2, showing localization in the cytoplasm of Sertoli cells and in the acrosome region in round and elongated spermatids, the in UNL and UNPL groups. Apoptotic bodies positive to Bcl-2 are evident near the basal compartment (black arrows). H) Percentage of immune-positive Bcl-2 cells in each section. I) Relative mRNA levels for Bcl-2. A negative control (no primary antibody) was included in each run and showed no staining. CONT: Control

For Review Only

group. UNP: undernourished during pregnancy. UNL: undernourished during lactation. UNPL: undernourished during both pregnancy and lactation. Scale bar represents 10 μm. Data values are mean ± SEM. Bars with different letters different significantly ($p < 0.05$).

Fig. 4. Effect of maternal undernutrition on transcription factors, GDNF and ETV5, in the testis of adult offspring. A) Representative photographs of tissue stained for immunoreactive GDNF (brown) showing staining of germ and Sertoli cells. B) Percentage immunostained area for GDNF in the seminiferous tubules. C) Percentage immunostained area for GDNF at stage VII of spermatogenic cycle. D) Representative photographs of tissue stained for immunoreactive ETV5 showing staining in Sertoli cells, and in round and large spermatids. E) Percentage immunostained area for ETV5 IA. CONT: Control group. UNP: undernourished during pregnancy. UNL: undernourished during lactation. UNPL: undernourished during both pregnancy and lactation. Scale bar represents 10 μm. Data values are mean ± SEM. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$) from one another. Upper right: negative control for immunohistochemistry (no primary antibody) showing no staining.

Fig. 5. Effect of maternal undernutrition on heat shock proteins in the testis of adult offspring. A) Representative photographs of tissue stained for immunoreactive HSP70, showing localization in spermatogonia and spermatocytes at pachytene stage (black arrow) in the UNP, UNL and UNPL treatments. B) Percentage immunostained area of HSP70 immunostained area. C) Representative photographs of testes stained for immunoreactive of HSP90, showing intense immunostaining on the nuclei of spermatogonia, the cytoplasm of pachytene spermatocytes (black arrow) and the cytoplasm of round spermatids; the staining was intense in the nuclei of elongated spermatids (white arrow) in the UNP group. D) Percentage immunostained area for HSP90. CONTROL: Control group. UNP: undernourished during pregnancy. UNL: undernourished during lactation. UNPL: undernourished during both pregnancy and lactation. Scale bar represents 10 μm. Data values are mean ± SEM. Bars with different letters differ significantly ($p < 0.05$). Upper right: negative control for immunohistochemistry (no primary antibody) showing no staining.

Fig. 6. Schema summarising the effects of maternal undernutrition on the balance between cell proliferation and apoptosis in spermatogenesis in adult offspring. The imbalance is the result of changes in two Sertoli cell transcription factors, glial-cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) and Ets variant gene 5 (ETV5), both of inhibit apoptosis in germ cells through effects on the production of cysteinyl-aspartate protease 3 (caspase-3), BCL2-associated X apoptosis regulator (Bax), and B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2). Effects on the production of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in germ cells would disrupt meiosis and spermiogenesis. There are

For Review Only

some differences between pregnancy and lactation in the effects of maternal undernutrition, perhaps reflecting differences in the stages of development of the testis.

For Review Only

Table 1. Primaries antibodies for immunohistochemistry studies of rat testis

Target protein	Antibody	Species raised in	Clonality	Catalogue number and supplier	Concentration
Caspase-3	Anti-active caspase-3	rabbit	Polyclonal IgG	ab4051, Abcam, USA	**1:200**
Bax	Anti-Bax	rabbit	Monoclonal IgG Clone E63	ab32503, Abcam, USA	**1:200**
Bcl-2	Anti-Bcl-2	rabbit	Polyclonal IgG	ab7973, Abcam, USA	**1:200**
GDNF	Anti-glial cell line derived neurotrophic factor	rabbit	Polyclonal IgG	ab18956, Abcam, USA	**1:200**
ETV5	Anti-ETV5	rabbit	Polyclonal IgG	ab102010, Abcam, USA	**1:100**
HSP70	Anti-heat shock protein 70	mouse	Monoclonal IgM	33- 3800 (MB-H1), Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA	**1:200**
HSP90	Anti-heat shock protein 90	mouse	Monoclonal IgG2a, kappa Clon H9010	37-9400 (H9010), Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA	**1:200**

Caspase-3: cysteinyl-aspartate protease 3. Bax: BCL2 associated X apoptosis regulator. Bcl-2: B-cell leukemia/lymphoma 2. ETV5: E26 transformation variant 5, GDNF: Glial cell line-derived neurotrophic factor. HSP70: heat shock protein 70. HSP90: heat shock protein 90.

For Review Only

Table 2. Primers for testicular gene expression for transcript levels quantified by qPCR in rat testis

Rat mRNA	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length (bp)	NCBI Reference Sequence
Caspase-3	GAGCTTGGAACGC GAAGAAA	TCCACGGAGGTTT CGTTGT	59	NM_012922.2
BAX	TGACGGCAACTTC AACTGGG	GCAGCCGATCTCG AAGGAA	143	NM_017059.2
Bcl-2	GGATCCAGGATAA CGGAGGC	ATGCACCCAGAGT GATGCAG	141	NM_016993.1

Caspase-3: cysteinyl-aspartate protease 3, BAX: BCL2 associated X apoptosis regulator, Bcl-2: B cell leukemia/lymphoma 2

For Review Only

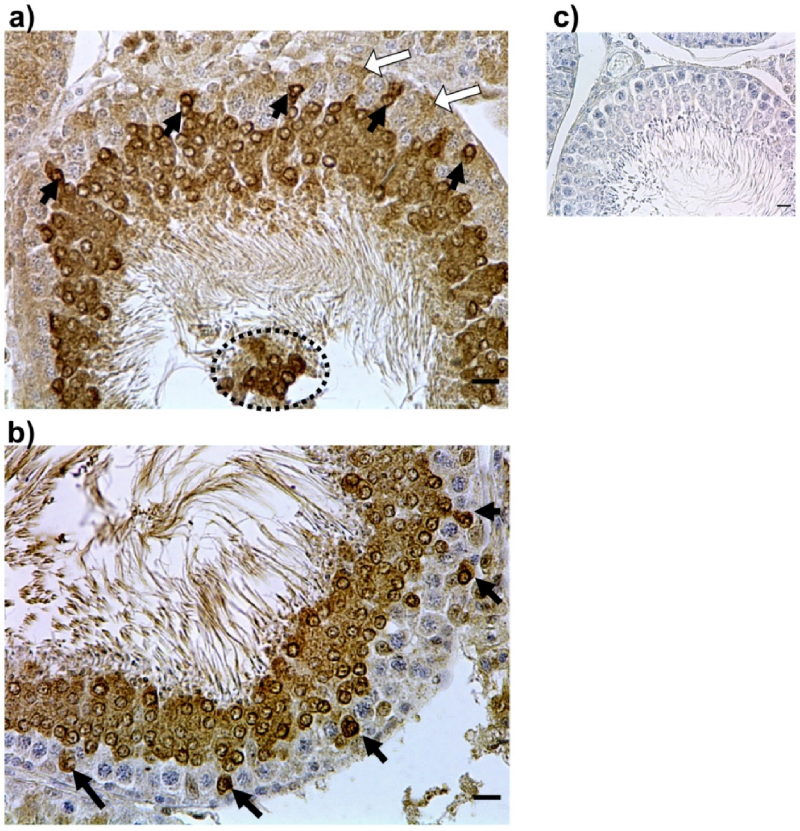


Fig. 1. Representative photographs of immunoreactive caspase-3 protein (brown) in rat testis of offspring whose mothers were undernourished during pregnancy and lactation (UNPL), showing cross sections of seminiferous tubules at stage VII of spermatogenic cycle. a) localization in Sertoli cells (white arrows). a, b) Round spermatids (black arrow) near the basal lamina at the bottom of seminiferous tubules, where spermatocytes and spermatogonial cells should be localized. a) Round spermatid cells (dotted area) and spermatozoids are seen in the lumen of seminiferous tubule. The presence of detached round spermatids at the lumen suggests failure of the cellular unions in seminiferous epithelium. c) A negative control (no primary antibody) was included in each run and showed no staining (not shown). Scale bar represents 10 μm.

209x279mm (300 x 300 DPI)

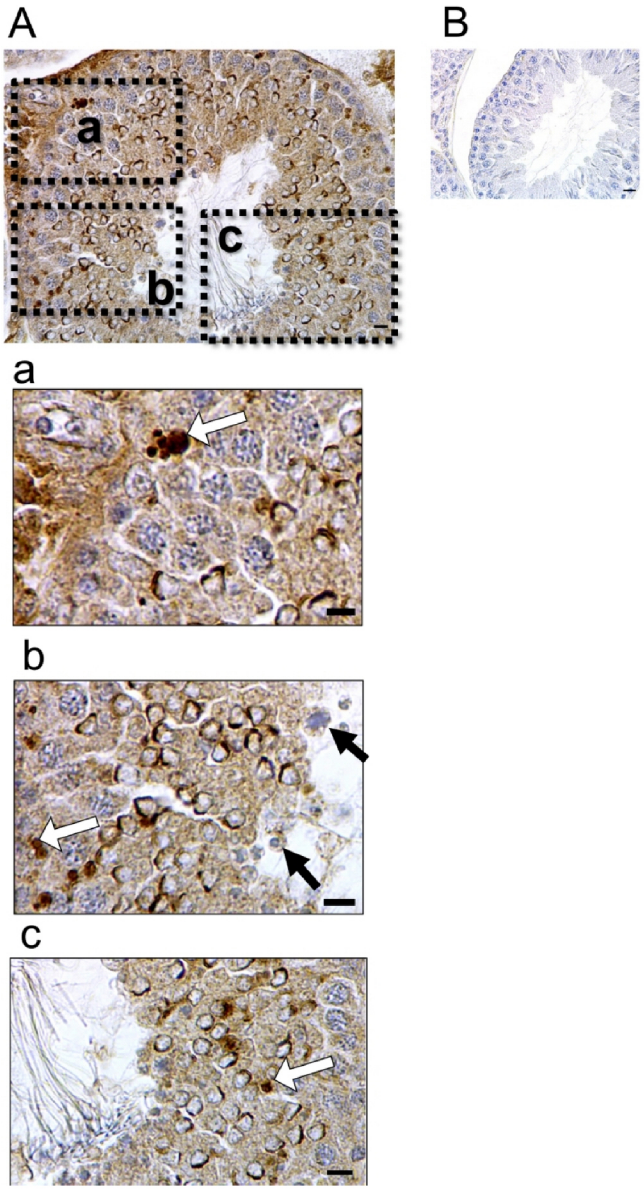


Fig. 2. Representative photographs of immunoreactive Bcl-2 protein (brown) in the testis of offspring of mothers that were underfed during pregnancy and lactation (UNPL). A): a) Apoptotic bodies immune-positive to Bcl-2 (white arrows) and b) apoptotic round spermatids showing a negative blue nucleus with loss of round shape (black arrow) detected at the lumen of the seminiferous tubules in stage VII of spermatogenic cycle (prior to spermiation). c) Lumen of seminiferous tubule showing spermatozoids. Spermatid retention could be an early and sensitive indicator of testosterone depletion. B) Upper image: a negative control (no primary antibody) was included in each run and showed no staining. Scale bar represents 10 μm.

209x279mm (300 x 300 DPI)

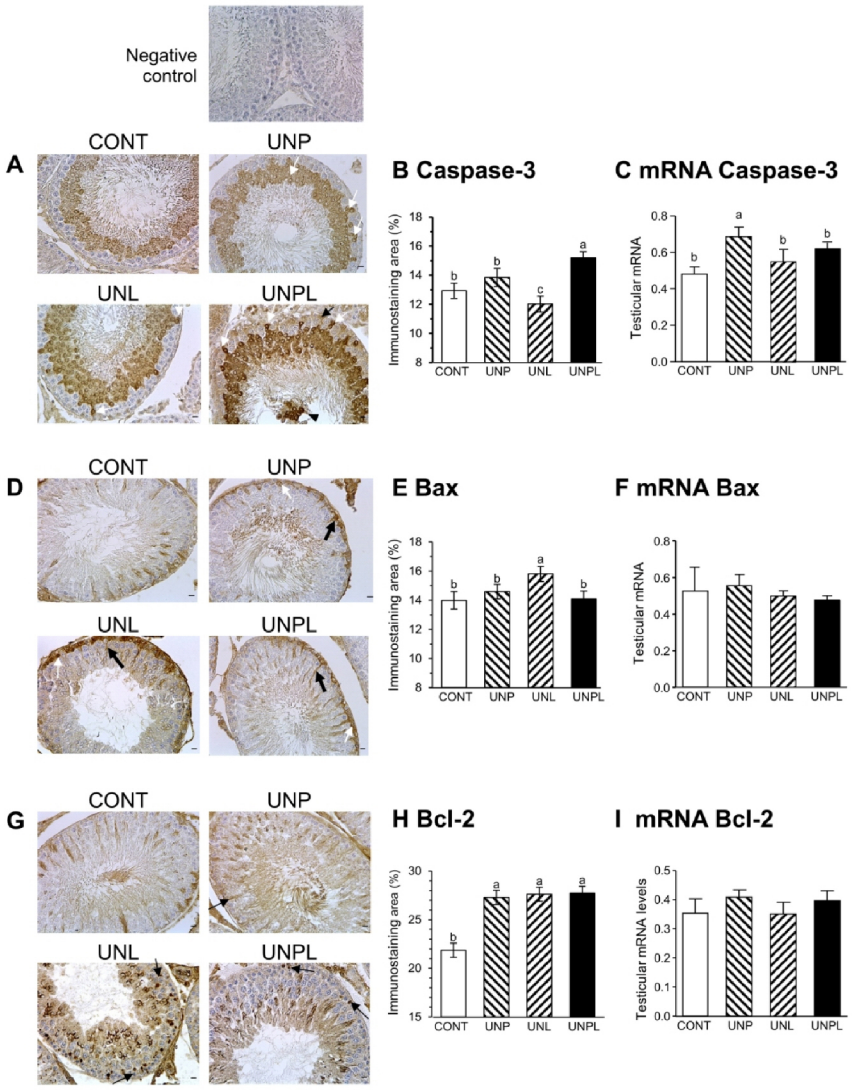


Fig. 3. Effect of maternal undernutrition on immunolocalization (brown) and relative mRNA levels for caspase-3 Bax and Bcl-2 in the testis. A) Representative photographs of tissue stained for immunoreactive caspase-3. Spermatogonia and spermatocytes were negative to caspase-3 in control testes, but immunopositive caspase-3 was evident in all underfed groups, in round spermatids close to the basal membrane (white arrows). Sertoli cells show intense immunoexpression of caspase-3 in UNPL offspring (black arrow). B) Percentage of immune-positive caspase-3 cells in each section. C) Relative caspase-3 mRNA levels. D) Representative photographs of tissue stained for immunoreactive Bax showing positive Sertoli cells (black arrows) and spermatogonia (white arrows). E) Percentage of immune-positive Bax cells in each section. F) Relative Bax mRNA levels. G) Representative photographs of tissue stained for immunoreactive Bcl-2, showing localization in the cytoplasm of Sertoli cells and in the acrosome region in round and elongated spermatids, the in UNL and UNPL groups. Apoptotic bodies positive to Bcl-2 are evident near the basal compartment (black arrows). H) Percentage of immune-positive Bcl-2 cells in each section. I) Relative mRNA levels for Bcl-2. A negative control (no primary antibody) was included in each run and showed no staining. CONT: Control group. UNP: undernourished during pregnancy. UNL: undernourished

during lactation. UNPL: undernourished during both pregnancy and lactation. Scale bar represents 10 μm. Data values are mean ± SEM. Bars with different letters different significantly ($p < 0.05$).

209x279mm (300 x 300 DPI)

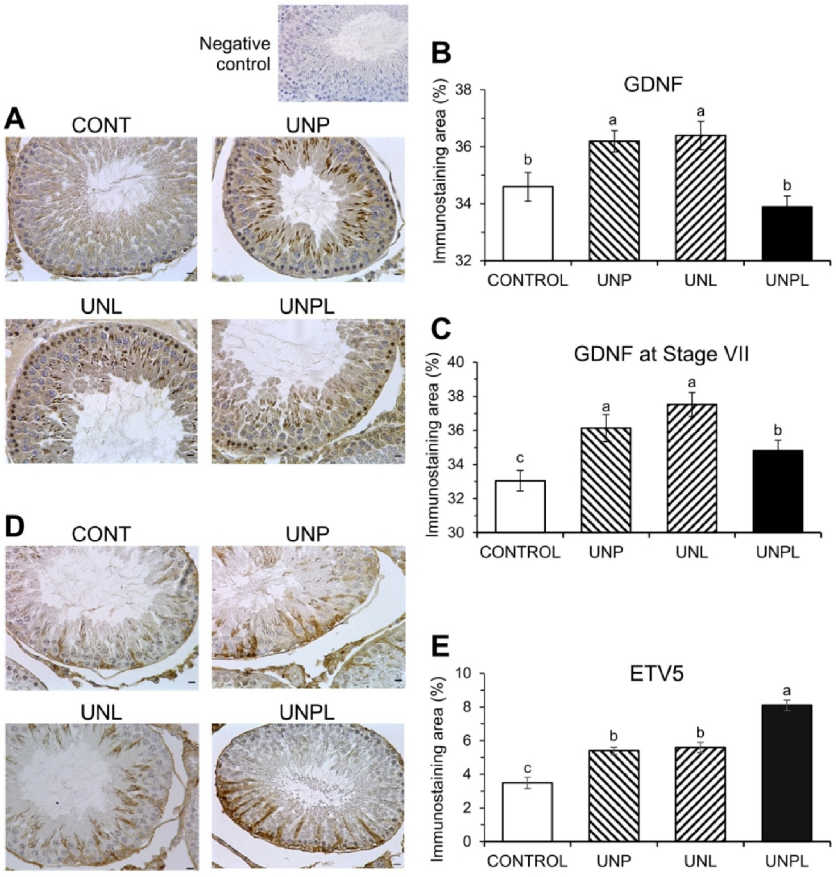


Fig. 4. Effect of maternal undernutrition on transcription factors, GDNF and ETV5, in the testis of adult offspring. A) Representative photographs of tissue stained for immunoreactive GDNF (brown) showing staining of germ and Sertoli cells. B) Percentage immunostained area for GDNF in the seminiferous tubules. C) Percentage immunostained area for GDNF at stage VII of spermatogenic cycle. D) Representative photographs of tissue stained for immunoreactive ETV5 showing staining in Sertoli cells, and in round and large spermatids. E) Percentage immunostained area for ETV5 IA. CONT: Control group. UNP: undernourished during pregnancy. UNL: undernourished during lactation. UNPL: undernourished during both pregnancy and lactation. Scale bar represents 10 μm. Data values are mean ± SEM. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$) from one another. Upper right: negative control for immunohistochemistry (no primary antibody) showing no staining.

209x279mm (300 x 300 DPI)

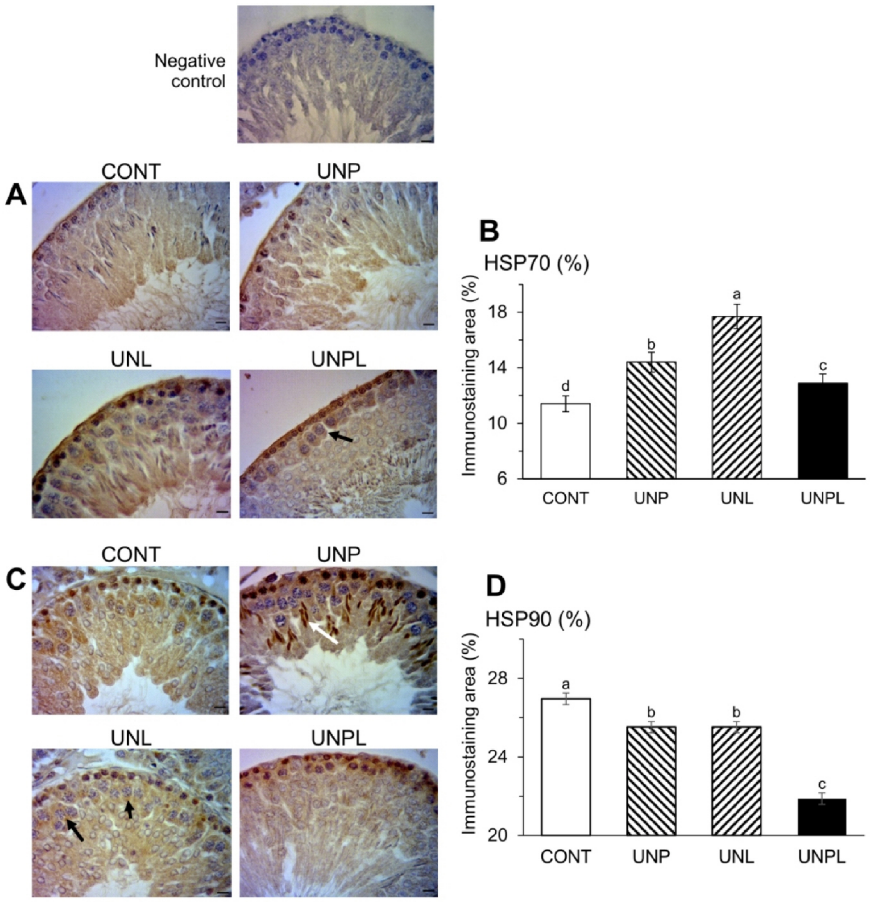


Fig. 5. Effect of maternal undernutrition on heat shock proteins in the testis of adult offspring. A) Representative photographs of tissue stained for immunoreactive HSP70, showing localization in spermatogonia and spermatocytes at pachytene stage (black arrow) in the UNP, UNL and UNPL treatments. B) Percentage immunostained area of HSP70 immunostained area. C) Representative photographs of testes stained for immunoreactive of HSP90, showing intense immunostaining on the nuclei of spermatogonia, the cytoplasm of pachytene spermatocytes (black arrow) and the cytoplasm of round spermatids; the staining was intense in the nuclei of elongated spermatids (white arrow) in the UNP group. D) Percentage immunostained area for HSP90. CONTROL: Control group. UNP: undernourished during pregnancy. UNL: undernourished during lactation. UNPL: undernourished during both pregnancy and lactation. Scale bar represents 10 μm. Data values are mean ± SEM. Bars with different letters differ significantly ($p < 0.05$). Upper right: negative control for immunohistochemistry (no primary antibody) showing no staining.

209x279mm (300 x 300 DPI)

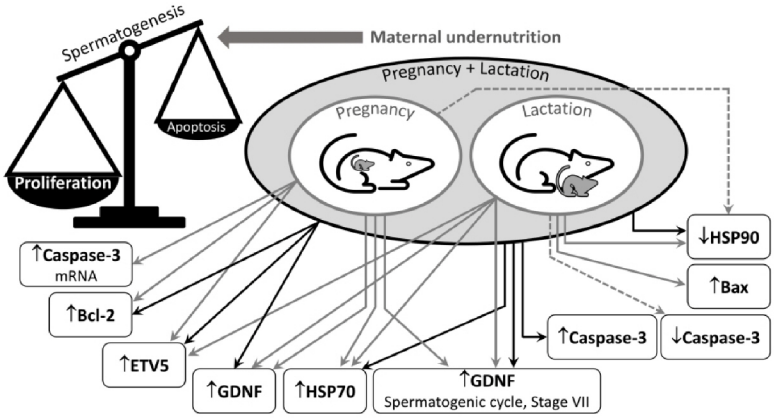


Fig. 6. Schema summarising the effects of maternal undernutrition on the balance between cell proliferation and apoptosis in spermatogenesis in adult offspring. The imbalance is the result of changes in two Sertoli cell transcription factors, glial-cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) and Ets variant gene 5 (ETV5), both of inhibit apoptosis in germ cells through effects on the production of cysteinyl-aspartate protease 3 (caspase-3), BCL2-associated X apoptosis regulator (Bax), and B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2). Effects on the production of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in germ cells would disrupt meiosis and spermiogenesis. There are some differences between pregnancy and lactation in the effects of maternal undernutrition, perhaps reflecting differences in the stages of development of the testis.

338x190mm (300 x 300 DPI)

Table 1. Primaries antibodies for immunohistochemistry studies of rat testis

Target protein	Antibody	Species raised in	Clonality	Catalogue number and supplier	Concentration
Caspase-3	Anti-active caspase-3	rabbit	Polyclonal IgG	ab4051, Abcam, USA	**1:200**
Bax	Anti-Bax	rabbit	Monoclonal IgG Clone E63	ab32503, Abcam, USA	**1:200**
Bcl-2	Anti-Bcl-2	rabbit	Polyclonal IgG	ab7973, Abcam, USA	**1:200**
GDNF	Anti-glial cell line derived neurotrophic factor	rabbit	Polyclonal IgG	ab18956, Abcam, USA	**1:200**
ETV5	Anti-ETV5	rabbit	Polyclonal IgG	ab102010, Abcam, USA	**1:100**
HSP70	Anti-heat shock protein 70	mouse	Monoclonal IgM	33- 3800 (MB-H1), Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA	**1:200**
HSP90	Anti-heat shock protein 90	mouse	Monoclonal IgG2a, kappa Clon H9010	37-9400 (H9010), Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA	**1:200**

Caspase-3: cysteinyl-aspartate protease 3. Bax: BCL2 associated X apoptosis regulator. Bcl-2: B-cell leukemia/lymphoma 2. ETV5: E26 transformation variant 5, GDNF: Glial cell line-derived neurotrophic factor. HSP70: heat shock protein 70. HSP90: heat shock protein 90.

For Review Only

Table 2. Primers for testicular gene expression for transcript levels quantified by qPCR in rat testis

Rat mRNA	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length (bp)	NCBI Reference Sequence
Caspase-3	GAGCTTGGAACGC GAAGAAA	TCCACGGAGGTTT CGTTGT	59	NM_012922.2
BAX	TGACGGCAACTTC AACTGGG	GCAGCCGATCTCG AAGGAA	143	NM_017059.2
Bcl-2	GGATCCAGGATAA CGGAGGC	ATGCACCCAGAGT GATGCAG	141	NM_016993.1

Caspase-3: cysteinyl-aspartate protease 3, BAX: BCL2 associated X apoptosis regulator, Bcl-2: B cell leukemia/lymphoma 2

For Review Only