



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**IMPACTO DE LA SOBRENUTRICIÓN MATERNA EN GESTACIÓN Y
LACTANCIA SOBRE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, CRECIMIENTO,
PROTEÍNAS APOPTÓTICAS Y DE PROLIFERACIÓN TESTICULARES EN LAS
CRÍAS DE RATAS EN LA VIDA ADULTA**

Sobrenutrición materna en ratas y su efecto en los testículos de sus crías adultas

MARÍA HELEN VIOTTI CRESCI

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2023



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA



FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**IMPACTO DE LA SOBRENUTRICIÓN MATERNA EN GESTACIÓN Y
LACTANCIA SOBRE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, CRECIMIENTO,
PROTEÍNAS APOPTÓTICAS Y DE PROLIFERACIÓN TESTICULARES EN LAS
CRÍAS DE RATAS EN LA VIDA ADULTA**

Sobrenutrición materna en ratas y su efecto en los testículos de sus crías adultas

MARÍA HELEN VIOTTI CRESCI

Dra. PhD. Graciela Pedrana
Directora de Tesis

2023

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Alejandro Bielli, PhD

**Director de Departamento de Biociencias Veterinarias,
Facultad de Veterinaria, Universidad de la República – Uruguay**

Ana Meikle, PhD

**Directora del Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario
Facultad de Veterinaria, Universidad de la República – Uruguay**

Daniel Cavestany, PhD

**Investigador Asociado al Programa de Posgrados,
Facultad de Veterinaria, Universidad de la República – Uruguay**

2023

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



Centro de Posgrados
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE MAESTRIA

ORIENTACIÓN: SALUD ANIMAL

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: FVET, 19/12/2023

TRIBUNAL: ALEJANDRO BIELLI, ANA MEIKLE, DANIEL CAVESTANY

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
3003191-6	VIOTTI CRESCI, MARIA HELEN	555	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

La tesis esta muy bien redactada y sigue una secuencia que es muy fácil de seguir. Se destaca la prolijidad y creatividad en la exposición de figuras tanto en la revisión como en los resultados expuestos. Se trata de un modelo experimental sólido, con un modelo de sobrenutrición establecido y validado de programación fetal que incluye variables de respuesta bien elegidas con determinaciones en momentos estratégicos – en su mayor parte referenciados -para el testeo de la hipótesis. Los resultados están muy bien descritos, con gráficas que permiten visualizar las diferencias entre grupos. Los resultados son originales y de impacto internacional. La propuesta implica un enfoque integral, abarcativo y ambicioso que permite concluir en varios mecanismos respecto del impacto de la sobrenutrición materna durante la gestación y lactancia en la fisiología reproductiva en machos adultos. La presentación de la defensa fue muy prolija y siguió una secuencia clara, resumiendo los hallazgos de forma pedagógica. La interacción con el tribunal fue de excelencia, con apertura a los comentarios y críticas, lo que permitió un razonamiento conjunto. Teniendo en cuenta el material escrito, la presentación y el intercambio con el tribunal se otorga la máxima calificación de aprobado con mención.

TRIBUNAL

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Dra. Graciela Pedrana por guiarme e impulsarme en los estudios e investigación.

A la Facultad de Veterinaria por brindarme las herramientas para poder desarrollarme académicamente como docente e investigadora.

A mis padres que desde un principio confiaron en mí para brindarme una carrera profesional.

A mis compañeros de la Unidad Académica de Histología y Embriología que día a día estuvieron para ayudarme y colaborar en mi desarrollo académico.

A los investigadores del extranjero, Dra. Deborah Sloboda, Dr. Graeme Martin, que compartieron su investigación y experiencia para nosotros desarrollar diferentes líneas de trabajo.

A Martín por acompañarme y comprender que el esfuerzo en el desarrollo profesional implica muchas horas de dedicación y dejar muchos momentos de lado.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	6
2.1 Programación fetal – el paradigma DOHaD	6
Programación fetal e hipótesis de Barker	6
Concepto DOHaD	6
La nutrición como factor de programación	7
Nutrición y reproducción en el macho	7
2.2 Testículo de rata	8
Desarrollo embrionario del testículo	8
Anatomía y función testicular	8
Histología testicular	9
<i>Parénquima testicular</i>	10
<i>Epitelio seminífero</i>	10
<i>Espermatogénesis en la rata</i>	12
<i>Espermatocitogénesis</i>	12
<i>Meiosis</i>	13
<i>Espermiogénesis</i>	13
<i>Espermatozoide</i>	13
<i>Ciclo espermatogénico en los túbulos seminíferos de la rata</i>	14
2.3 Célula de Sertoli	15
Funciones de las células de Sertoli	15
Factores de transcripción en el testículo	16
ETV5 (factor de transcripción etv variante del gen 5)	16
GDNF (factor derivado de las células gliales)	18
Factores de crecimiento en el testículo	18
IGF-I (factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I)	19
2.4 Células de Leydig	20
2.5 Apoptosis	21
Proteínas apoptóticas: caspasa-3, Bax y Bcl-2	22

<i>Caspasa-3</i>	22
<i>FamiliaBcl-2</i>	23
<i>Bax</i>	23
<i>Bcl-2</i>	23
<i>Apoptosis testicular</i>	24
2.6 Proteína de proliferación celular: Ki-67.....	24
2.7 Efectos de la subnutrición materna en la descendencia adulta.....	25
2.8 Efectos de la sobrenutrición materna en la descendencia adulta	25
Sobrenutrición materna y las alteraciones metabólicas en las crías.....	26
Sobrenutrición materna y las alteraciones a nivel testicular en las crías	26
Sobrenutrición materna y apoptosis testicular en las crías.....	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	29
Objetivo general:.....	29
Objetivos específicos:	29
6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN	30
7. MATERIALES Y MÉTODOS	31
7.1 Animales y Diseño experimental	31
7.2 Extracción de sangre y ensayos hormonales	33
7.3 Muestreo de testículos y procesamiento histológico.....	33
7.4 Técnica de Hematoxilina y Eosina.....	34
7.5 Inmunohistoquímica.....	34
7.6 Análisis de imágenes de morfometría	35
7.7Análisis de imágenes de inmunohistoquímica	36
7.8 Cuantificación de área inmunomarcada	36
7.9 Conteo de células espermatogonias Ki-67 positivas	36
7.10 Análisis de expresión génica por qPCR	36
7.11 Análisis estadístico.....	38
8. RESULTADOS	39
8.1 Parámetros fisiológicos	39
<i>Peso corporal al nacimiento, peso corporal y edad a la pubertad, peso corporal adulto</i>	39
<i>Medición de hormonas: androstenediona y testosterona</i>	39
8.2 Parámetros morfológicos y morfométricos testiculares	40
<i>Peso testicular, peso testicular relativo e índice gonadosomático</i>	41

<i>Diámetro de túbulos seminíferos</i>	41
<i>Número de células de Sertoli por corte transversal de túbulo seminífero</i>	43
<i>Número de espermatogonias en proliferación por corte transversal de túbulo seminífero</i> ...	43
8.3 Inmunoexpresión de proteínas testiculares: factores de transcripción y de crecimiento ...	43
<i>ETV5</i>	43
<i>GDNF</i>	44
<i>IGF-I</i>	44
8.4 Inmunolocalización e inmunoexpresión de proteínas apoptóticas testiculares.....	46
<i>Caspasa-3</i>	46
<i>Bax</i>	46
<i>Bcl-2</i>	46
8.5 Expresión de los transcritos ARNm de caspasa-3, Bax y Bcl-2.....	48
9. DISCUSIÓN	50
9.1 Efecto rebote de la sobrenutrición materna en el peso de las crías en la vida adulta.....	50
9.2 Efecto de la sobrenutrición materna en el incremento del factor ETV5 y el peso corporal adulto.....	51
9.3 Efecto de la sobrenutrición materna en el inicio temprano de la pubertad y el peso corporal a la pubertad.....	52
9.4 Efecto de la sobrenutrición materna en el inicio temprano de la pubertad y el peso corporal adulto.....	52
9.5 Efecto de la sobrenutrición materna en el detrimento del peso testicular realtivo en función del aumento del peso corporal.....	53
9.6 Sobrenutrición materna y el aumento del diámetro de los túbulos seminíferos.....	53
9.7 Sobrenutrición materna en el aumento del número de células de Sertoli y espermatogonias en proliferación.....	54
9.8 Sobrenutrición materna y su efecto en las espermatogonias en las crías adultas.....	54
<i>Factor de transcripción ETV5 y la autorrenovación decélulas madre espermatogonias</i>	54
<i>Factor de transcripción GDNF y la autorrenovación de células madre espermatogonias</i>	54
<i>Factor de crecimiento IGF-I y la proliferación de las células madres espermatogonias</i>	55
9.9 Sobrenutrición materna y su efecto en la apoptosistesticular en las crías adultas.....	55
<i>Sobrenutrición materna y apoptosis en células germinales por disminución de IGF-I</i>	55
<i>Sobrenutrición materna y apoptosis en espermátidas por caspasa-3</i>	56
<i>Sobrenutrición materna y efecto sobre caspasa -3 y Bcl-2</i>	56
10. CONCLUSIONES	57
Perspectivas a futuro: sobrenutrición y epigenética.....	57
11. REFERENCIAS	58

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Composición de las dietas maternas y de las crías, utilizadas en el experimento. Dieta estándar para el (grupo Control) Teklad Global 18% protein Rodent Diet y Dieta hipercalórica (grupo Sobrenutrido) D12451.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en el análisis inmunohistoquímico en testículos de rata.

Tabla 3. Primers utilizados para evaluar la expresión génica en testículos de rata mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

Tabla 4. Inmunolocalización de los factores de transcripción ETV5 y GDNF, del factor de crecimiento IGF-I, de las proteínas apoptóticas, caspasa-3, Bax y Bcl-2 y del marcador de proliferación celular Ki-67 en el testículo de las crías adultas cuyas madres fueron alimentadas con una dieta hipercalórica durante la gestación y lactancia.

Figura 1. Esquema general del concepto de programación fetal, durante la gestación. El feto se adaptará según su demanda nutricional y el suministro por parte de la madre de los nutrientes que necesita para crecer. En el animal postnatal, si su demanda nutricional se corresponde con el suministro nutricional materno, el feto se adaptará en el útero y tendrá luego un desarrollo normal. Mientras que, si la demanda nutricional no corresponde con la oferta nutricional materna, aumenta el riesgo de que padezca enfermedades cuando sea adulto. Adaptado de Vanhees et al. 2014.

Figura 2. Esquema representativo del testículo y epidídimo de mamífero en un corte sagital. Se observa la túnica vaginal que rodea al testículo, y los tabiques de tejido conjuntivo que subdividen el parénquima testicular en lobulillos que contienen los túbulos seminíferos contorneados, los que desembocan en los túbulos rectos. Luego la rete testis se continúa con los conductillos eferentes que atraviesan la albugínea y salen para formar el epidídimo. Elaborado por: Dra. Helen Viotti.

Figura 3. Imagen de un corte transversal del testículo de rata Wistar a los 160 días de edad coloreado con la Técnica de Hematoxilina-eosina. Autor: Viotti-Pedrana. Escaneado en escáner MoticEasyScan One USA, proyecto Institucional, Facultad de Veterinaria.

Figura 4. Imagen de un corte transversal del testículo de rata Wistar a los 160 días de edad coloreado con la Técnica de Hematoxilina-eosina. Autor: Viotti-Pedrana. a) Túbulos seminíferos en corte transversal, luz de túbulo seminífero (asterisco) y tejido intersticial (flecha). Magnificación 100 aumentos. b) Se observan células del epitelio seminífero y células de Sertoli (flecha). Magnificación 600 aumentos. c) Se observa tejido intersticial con células de Leydig (flecha). Magnificación 400 aumentos.

Figura 5. Esquema representativo del epitelio seminífero y las células que lo componen. Se observan las células de Sertoli y sus ramificaciones que rodean a las células germinales. Se reconocen espermatogonias, espermatocitos, espermátidas redondas y alargadas. Elaborado por: Dra. Helen Viotti.

Figura 6. Esquema representativo de los estadios del ciclo del epitelio seminífero en la rata. Se observan las 14 asociaciones celulares posibles en los túbulos seminíferos. Elaborado por: Dra. Helen Viotti. Adaptado de: Kerr et al. 2006. Espermatogonia: A1, A1^m, A2, A2^m, A3, A3^m, A4^m, In, B^m. Espermatocitos en meiosis I pre-leptoteno PI, En leptoteno L, en zigoteno Z, en paquiteno P, en diploteno DI, en meiosis II II. Espermátidas: redondas del 1 al 7, en elongación del 8 al 18 y el 19 espermatozoide previo a ser liberado o espermiación.

Figura 7. Esquema representativo de las acciones de ETV5 y GDNF en las células de Sertoli y las espermatogonias en el testículo. ETV5 (factor de transcripción etv variante del gen 5), GDNF (factor derivado de las células gliales), CCL9 (ligando 9 de quimiocina), Lhx1, proteína homeobox LIM 1, Bcl6b, CLL/linfoma de células B 6. RET (receptor tirosina quinasa), GFRA1 correceptor específico de ligando. Elaborado por: Dra. Helen Viotti. Adaptado de Eo et al. 2012).

Figura 8. Esquema representativo de las acciones de IGF-I en las células de Sertoli, células de la línea germinal y células de Leydig. IGF1R (receptor de IGF-I). Elaborado por: Dra. Helen Viotti.

Figura 9. Esquema de las dos principales vías de señalización mediante las cuales una célula sufre apoptosis. A) La vía extrínseca se inicia por la unión de ligandos específicos a receptores de la superficie celular TNF y Fas que produce la activación de la caspasa 8 quien comienza una cascada de activación de la apoptosis de la célula. B) La vía intrínseca se inicia a nivel mitocondrial y lleva a la conformación del apoptosoma, un complejo de proteínas que genera la activación de la caspasa 9 quien inicia la cascada que llevará a la muerte por apoptosis. Adaptado de Zamora et al. 2005; Megías et al. 2023.

Figura 10. Representación esquemática del diseño experimental. Se utilizaron dos niveles de nutrición materna (Control y Sobrenutrido) durante la gestación (0-21 días), y para la lactancia, desde el nacimiento (día 21 prenatal) hasta el destete en el día (22 postnatal). Después del destete, todas las crías fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta estándar hasta el final del estudio (día 160) cuando se tomaron las muestras de sangre y de los testículos. Se observó la pubertad (P) entre los días 35 y 37.

Figura 11. Parámetros fisiológicos de ratas adultas cuyas madres recibieron durante la gestación y lactancia una dieta hipercalórica (grupo Sobrenutrido) en comparación con el grupo de dieta estándar (grupo Control). a) peso corporal desde el nacimiento, pubertad y a los 160 días de vida. b) edad a la pubertad, c) concentración de androstenediona, d) concentración de testosterona. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Figura 12. Parámetros morfométricos testiculares de ratas adultas cuyas madres recibieron durante la gestación y lactancia una dieta hipercalórica (grupo Sobrenutrido) en comparación con el grupo de dieta estandar (grupo Control). a) peso testicular a los 160 días de vida. b) peso testicular relativo. c) índice gonadosomático. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Figura 13. Histología testicular de ratas adultas cuyas madres recibieron durante la gestación y lactancia una dieta hipercalórica (grupo Sobrenutrido) en comparación con el grupo de dieta estandar (grupo Control). A1: imagen de túbulos seminíferos para el grupo Control. A2: imagen de túbulos seminíferos para el grupo Sobrenutrido donde se observa mayor diámetro tubular que en grupo Control. Magnificación 100x; barra de escala 100 μm . A3: Diámetro de túbulos seminíferos (μm). B1-B2: imagen de túbulos seminíferos, Célula de Sertoli (flecha) para el grupo Control y Sobrenutrido. Magnificación 600x; barra de escala 10 μm . B3: Número de células de Sertoli. C1: Inmunolocalización de Ki-67 en espermatogonias para el grupo Control. C2: Inmunolocalización más intensa de Ki-67 en espermatogonias para el grupo Sobrenutrido. Magnificación 100x; barra de escala 20 μm . C3: Número de espermatogonias en proliferación. Control negativo: para la técnica de inmunohistoquímica. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Figura 14. Inmunolocalización e immunoexpresión de los factores de transcripción y crecimiento en el testículo de ratas cuyas madres fueron alimentadas durante la gestación y lactancia con una dieta hipercalórica (Sobrenutrido) y una dieta estandar (Control). Inmunolocalización de ETV5, A1-2 grupo Control. A3-4 Grupo Sobrenutrido. Inmunomarcación más evidente en grupo Sobrenutrido en región del acrosoma en espermátidas redondas (flechas negras) y células de Sertoli (flechas blancas). A5: Immunoexpresión de ETV5, porcentaje de área inmunomarcada (%). Inmunolocalización de GDNF, B1-2 grupo Control. B3-4 grupo Sobrenutrido. Inmunomarcación evidente en espermátidas alargadas y células de Leydig (asterisco) con menor intensidad en Sobrenutrido. B5: Immunoexpresión de GDNF, porcentaje de área inmunomarcada (%). Inmunolocalización de IGF-I, C1-2 grupo Control. C3-4 grupo Sobrenutrido. Inmunomarcación más evidente en el grupo Control en células de Leydig (asterisco) y en células de Sertoli (flecha blanca). C5: Immunoexpresión de IGF-I, porcentaje de área inmunomarcada (%). Magnificación 100x; barra de escala 20 μm . Control negativo: para la técnica de inmunohistoquímica. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Figura 15. Inmunolocalización e immunoexpresión de las proteínas apoptóticas en el testículo de ratas cuyas madres fueron alimentadas durante la gestación y lactancia con una dieta hipercalórica (Sobrenutrido) y una dieta estandar (Control). Inmunolocalización de caspasa-3, A1-2 grupo Control. A3-4 Grupo Sobrenutrido. Inmunomarcación más evidente en grupo Sobrenutrido en espermátidas redondas (flecha negra) y alargadas (flecha blanca) y espermatozoides. A5: Immunoexpresión de caspasa-3, porcentaje de área inmunomarcada (%). Inmunolocalización de Bax, B1-2 grupo Control. B3-4 grupo Sobrenutrido. Inmunomarcación evidente en espermatogonias y células de Sertoli. B5: Immunoexpresión

de Bax, porcentaje de área inmunomarcada (%). Inmunolocalización de Bcl-2, C1-2 grupo Control. C3-4 grupo Sobrenutrido. Inmunomarcación más evidente en el grupo Sobrenutrido en región del acrosoma en espermátidas redondas (flecha negra) y en células de Sertoli (flecha blanca). C5: Inmunoexpresión de Bcl-2, porcentaje de área inmunomarcada (%). Magnificación 100x; barra de escala 20 μ m. Control negativo: para la técnica de inmunohistoquímica. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Figura 16. Efecto en el testículo de ratas cuyas madres fueron alimentadas durante la gestación y lactancia con una dieta hipercalórica (Sobrenutrido) y una dieta estandar (Control) en los niveles relativos de ARNm para caspasa-3, Bax y Bcl-2. A) Niveles relativos de ARNm para caspasa-3. B) Niveles relativos de ARNm para Bax. C) Niveles relativos de ARNm para Bcl-2. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Figura 17. Resumen esquemático de los efectos de la dieta materna hipercalórica sobre los testículos en las crías adultas. Efectos en su crecimiento y parámetros morfométricos, además de factores que afectan la proliferación y apoptosis de células germinales; y las consecuencias para la regulación de la espermatogénesis por parte de las células de Sertoli. Esencialmente, una dieta materna hipercalórica durante la gestación y lactancia conduce a un desequilibrio entre la proliferación y la apoptosis en las células germinales, lo que afecta la cantidad de espermatogonias producidas, con efectos secundarios en la espermiogénesis y la fertilidad.

LISTA DE ABREVIATURAS

- DOHaD** Developmental Origins of Health and Disease
- ETV5** variante 5 del factor de transcripción
- GDNF** factor neurotrófico derivado de las células gliales
- IGF-I** factor de crecimiento similar a la insulina I
- INSR** receptor de insulina
- IGF-IR** receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I
- Caspasa-3** cisteinil-aspartato proteasas
- Bax** Bcl-2-like protein 4
- Bcl-2** proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B.
- Bcl-6** linfoma de células B 6
- Ki-67** marcador de proliferación celular
- TGF- β** factores de crecimiento transformante beta
- GFR alfa 1** receptor de GDNF
- TNF** factor de necrosis tumoral
- Fas** proteína de membrana ligando
- BH3** proteína proapoptótica que interacciona mediante dominios BH3
- P53** proteína supresora tumoral
- SAS** programa de análisis estadístico (Statistical Analysis System)

RESUMEN

El sobrepeso y la obesidad materna causan alteraciones en la función reproductiva de la prole. La hipótesis de la presente tesis plantea que la sobrenutrición materna durante la gestación y la lactancia aumenta la expresión de los factores de transcripción, de crecimiento, apoptóticos y de proliferación celular en el testículo de las crías ratas adultas. Para testear la hipótesis se utilizaron ratas Wistar preñadas (n=20) alimentadas *ad libitum* con una dieta hipercalórica (grupo Sobrenutrido) o con dieta estándar (grupo Control) durante la gestación y lactancia. Después del destete, las crías machos (n=20) fueron alimentadas con una dieta estándar hasta el día 160 posnatal cuando sus testículos fueron disecados y procesados para el análisis morfométrico y de inmunohistoquímica. Se evaluaron parámetros fisiológicos, morfológicos testiculares, factores de transcripción, crecimiento, apoptóticos y de proliferación a nivel testicular. El peso corporal al nacimiento y a la pubertad disminuyeron en el grupo Sobrenutrido con respecto al grupo Control, mientras que aumentó el peso corporal en el animal adulto ($P < 0,05$). El peso testicular relativo y el índice gonadosomático disminuyeron en el grupo Sobrenutrido con respecto al Control ($P < 0,05$). Sin embargo, el diámetro de los túbulos seminíferos, número de células de Sertoli y de espermatogonias en proliferación, aumentaron en el grupo Sobrenutrido frente al grupo Control ($P < 0,05$). Asimismo, la inmunoexpresión de ETV5 aumentó en el grupo Sobrenutrido en comparación al Control, mientras que GDNF e IGF-I disminuyeron ($P < 0,05$). Las proteínas apoptóticas caspasa-3 y Bcl-2 aumentaron su expresión en Sobrenutridos en comparación con el Control ($P < 0,05$). Por lo tanto, la obesidad materna durante la gestación y lactancia afecta los parámetros morfológicos testiculares y los factores de transcripción, vinculados a la proliferación de espermatogonias en el proceso de espermatogénesis. La dieta alta en grasas y en proteínas aumentó el número de espermatogonias sugiriendo un desbalance entre dichas células y las células de Sertoli, pudiendo alterar la eficiencia de la espermatogénesis. Además, la dieta materna hipercalórica administrada durante la gestación y lactancia disminuyó la producción de factores esenciales para el testículo como GDNF e IGF-I a nivel testicular, sugiriendo consecuencias sobre la espermatogénesis en los testículos de las crías en la vida adulta.

SUMMARY

Maternal overweight and obesity cause alterations in the reproductive function of the offspring. The hypothesis of this thesis states that maternal overnutrition during pregnancy and lactation increases the expression of transcription factors, growth factors, apoptotic factors and cell proliferation in the testis of adult rat offspring. To test the hypothesis, pregnant Wistar rats (n=20) were used, fed ad libitum with a high-calorie diet (Overnutrition group) or with a standard diet (Control group) during pregnancy and lactation. After weaning, male pups (n=20) were fed a standard diet until postnatal day 160 when their testes were dissected and processed for morphometric and immunohistochemistry analysis. Physiological and testicular morphological parameters, transcription, growth, apoptotic and proliferation factors were evaluated at the testicular level. Body weight at birth and at puberty decreased in the Overnutrition group compared to the Control group, while body weight increased in the adult animal ($P < 0.05$). Relative testicular weight and gonadosomatic index decreased in the Overnutrition group compared to the Control ($P < 0.05$). However, the diameter of the seminiferous tubules, number of Sertoli cells and proliferating spermatogonia increased in the Overnutrition group compared to the Control group ($P < 0.05$). Likewise, the immunoexpression of ETV5 increased in the Overnutrition group compared to the Control, while GDNF and IGF-I decreased ($P < 0.05$). The apoptotic proteins caspase-3 and Bcl-2 increased their expression in Overnutrition compared to Control ($P < 0.05$). Therefore, maternal obesity during pregnancy and lactation affects testicular morphological parameters and transcription factors, linked to the proliferation of spermatogonia in the process of spermatogenesis. The high-fat and high-protein diet increased the number of spermatogonia, suggesting an imbalance between these cells and Sertoli cells, potentially altering the efficiency of spermatogenesis. Furthermore, the high-calorie maternal diet administered during pregnancy and lactation decreased the production of essential factors for the testicle such as GDNF and IGF-I at the testicular level, suggesting consequences on spermatogenesis in the testicles of the offspring in adult life.

1. INTRODUCCIÓN

El término programación fetal se define como la respuesta de un organismo a un desafío específico durante un período de tiempo denominado período ventana, que es crítico para el desarrollo del animal, que modifica su desarrollo, con efectos que pueden perdurar hasta la edad adulta (Zambrano et al. 2014). Para englobar el término “programación fetal” y la programación de la vida posnatal, existen numerosos estudios que confirman la teoría del denominado paradigma DOHaD “Developmental Origins of Health and Disease”. Esta teoría establece que un factor que afecta un período crítico del desarrollo en la vida temprana (pre o posnatal) provoca alteraciones en el crecimiento, con lo cual un mismo genotipo puede originar diferentes fenotipos en respuesta a diferentes entornos ambientales durante el período del desarrollo del animal (Williams et al. 2014). El tema de la programación fetal cuenta hoy en día con muchos estudios tanto en animales como en humanos (Jazwiec & Sloboda 2019). Estos estudios utilizando modelos experimentales animales, así como estudios epidemiológicos en humanos han demostrado cómo la fisiología tanto materna como paterna, así como la composición corporal, la calidad nutricional y el ejercicio durante el periodo de preconcepción y gestación tienen efectos marcados y permanentes en el riesgo de padecer enfermedades en la edad adulta de la descendencia (Wang et al. 2018).

La nutrición es uno de los factores de programación fetal. Tanto la subnutrición como la sobrenutrición afectan de manera negativa a la descendencia. Los fetos de dichas madres dependen del suministro de nutrientes que reciba esa madre para condicionar su desarrollo, ya que las alteraciones en el metabolismo materno expondrán al feto a un entorno intrauterino alterado que puede predisponer a la descendencia a enfermedades metabólicas en el futuro (Williams et al. 2014). Hoy en día, la sobrenutrición u obesidad es un problema crítico de salud pública en humanos a nivel mundial y tiene un marcado incremento de su prevalencia en mujeres gestantes. Tales evidencias pueden ser explicadas a través de la teoría de la programación fetal como mecanismo de producción de obesidad en la vida extrauterina. Los factores de riesgo relacionados con la obesidad son múltiples, ocasionados por las condiciones adversas de la vida intrauterina, lo que influye posteriormente en la aparición de la obesidad (Baisan et al. 2014). En mujeres en edad fértil la incidencia de obesidad está aumentando, lo que conlleva a riesgos tanto para la madre como para el niño (WHO, 2000). Como consecuencia de la obesidad pueden surgir complicaciones en las madres como serdiabetes gestacional, aborto espontáneo, hipertensión y preeclampsia durante la etapa de gestación (Metsälä et al. 2006). Por otra parte, predispone a los niños a desarrollar problemas de obesidad, hipertensión, diabetes, enfermedades cardiovasculares y además enfermedad renal crónica más adelante en su vida (Catalano et al. 2006; Ruager-Martin et al. 2010). La Organización Mundial de la Salud (OMS) sostiene una constante lucha contra la propagación mundial de la obesidad. Es por ello que se dan ciertos lineamientos sobre el manejo de la obesidad materna, que recomiendan que las mujeres con obesidad intenten un estilo de vida diferente, modificado antes de la gestación (Dodd et al. 2014). A pesar de esto, hay poca evidencia sobre el beneficio de estos lineamientos, con pocos estudios que evalúen los resultados clínicos de pérdida de peso antes de la concepción para dichas mujeres, los cuales evitarían a futuro problemas de obesidad (Opray et al. 2015).

Para estudiar la obesidad es de gran utilidad el uso de modelos en roedores (ratones, ratas y cobayas) que proporcionan datos de la relación entre las exposiciones en las primeras etapas de la vida y los factores de riesgo metabólicos en la edad adulta, es decir para investigar los mecanismos subyacentes de programación fetal. Las ventajas del uso de modelos en roedores es su corta gestación y vida útil, y los costos relativamente económicos de mantener grandes cohortes de animales; estos factores permiten realizar estudios para demostrar las consecuencias a largo plazo que se producen en respuesta a intervenciones dietéticas como es la exposición a sobrenutrición materna, ya que el aumento de peso puede inducirse con una dieta rica en grasas. (McMullen & Mostyn 2009). Varios factores juegan un papel crucial en el desarrollo de la obesidad como son los factores genéticos y ambientales, y la dieta como factor ambiental es uno de los principales (Bastías-Pérez et al. 2020). Se ha observado que los animales de laboratorio pueden manifestar características del síndrome metabólico, como obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares e hipertensión bajo la influencia de una dieta hipercalórica (Ainge et al. 2011; Bautista et al. 2017).

Asimismo, los usos de dietas ricas en grasas en ratas durante el desarrollo intrauterino predisponen a la descendencia a alteraciones en la síntesis de lípidos y aumento del estrés oxidativo, lo que conlleva a alteraciones en la fertilidad en el macho con reducción en el número de espermatozoides por gramo de testículo (Bautista et al. 2017). Cuando la obesidad continúa en la etapa de la lactación, la producción de espermatozoides en las crías que alcanzan la vida adulta se reduce en una quinta parte y produce envejecimiento prematuro de los espermatozoides (Bautista et al. 2017).

Es así que, la obesidad puede afectar el sistema reproductor del macho y generar un desequilibrio en el normal ambiente testicular y por lo tanto en el desarrollo de una espermatogénesis normal. Dicha espermatogénesis se da por la incidencia de los factores de transcripción, de crecimiento y hormonas producidas por las células de Sertoli (Alves et al. 2016). Se han estudiado algunos factores como los determinantes para mantener la población estable de espermatogonias. Los factores de transcripción esenciales para mantener la espermatogénesis son: el factor de transcripción variante ETV5 (ETV5) (Schlessner et al. 2008), el factor derivado de células gliales GDNF (Yang et al. 2010) y el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I: IGF-I (Escott et al. 2014).

El factor ETV5 actúa en conjunto con el factor GDNF que es esencial para la autorrenovación de las células madres espermatogonias, fundamentales para el desarrollo de una espermatogénesis normal (Wei et al. 2023). Asimismo, para una espermatogénesis normal debe existir un equilibrio entre el proceso de proliferación y el de apoptosis en las células germinales. Tanto la proliferación celular de las espermatogonias como la degeneración de los espermatozoides coinciden durante la función testicular normal en los mamíferos. De esta manera, la apoptosis que es controlada hormonalmente controla el número de células testiculares, regulando la homeostasis entre las células de Sertoli y las células germinales. En ratas las espermatogonias son las células que mueren con mayor frecuencia en los testículos, mientras que los espermatozoides primarios y secundarios, y las espermátidas, sufren apoptosis con menos frecuencia (Dadhich et al. 2010).

Estudios previos con dietas hipercalóricas luego del nacimiento bloquearon la apoptosis en las espermatogonias y disminuyeron el número de espermatozoides en ratas macho (Mao et al. 2018). En cambio, cuando las hembras durante la gestación en ratones recibieron una dieta

hipercalórica, sus crías machos fueron subfértiles. Estos machos nacidos de madres obesas presentan alteración de la calidad y la funcionalidad espermática (Rodrigo et al. 2022).

A pesar de los numerosos estudios existentes sobre las dietas maternas hipercalóricas y los mecanismos subyacentes de los efectos de dichas dietas sobre el testículo de sus crías en la vida adulta, aún hay mecanismos que no se han dilucidado. Uno de los mecanismos planteados es que la dieta materna hipercalórica afecta el metabolismo de las células de Sertoli a través de algunos factores intratesticulares producidos por Sertoli como son ETV5 y GDNF, con repercusiones sobre la proliferación y apoptosis de las células germinales que dependen de Sertoli.

Por lo tanto, el presente estudio buscó determinar en un modelo de obesidad en ratas, los efectos de las dietas maternas hipercalóricas durante la gestación y lactancia sobre los factores reguladores de la espermatogénesis producidos por las células de Sertoli en las crías macho en la edad adulta.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1 Programación fetal – el paradigma DOHaD

Programación fetal e hipótesis de Barker

La programación fetal ocurre durante el desarrollo embrionario y fetal, siendo un período crítico en el que se crean tejidos y órganos. La nutrición insuficiente durante este período de tiempo produce alteraciones permanentes en algunas funciones metabólicas, estructurales y fisiológicas del feto.

La "hipótesis de Barker", establece que dichos cambios programados durante este período crítico predisponen al feto a ciertas enfermedades posnatales, coincidiendo este período con el momento de la diferenciación celular (Kwon & Kim 2017).

David Barker fue uno de los pioneros en el área de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad de los adultos, cuyos estudios epidemiológicos vincularon a un entorno intrauterino adverso con la manifestación de enfermedades metabólicas en la vida posnatal. También se ha demostrado que un crecimiento deficiente a nivel intrauterino durante la primera infancia en humanos, da como resultado un metabolismo adaptado y una composición corporal alterada que pueden aumentar el riesgo de enfermedades crónicas en la edad adulta (Hoffman et al. 2021).

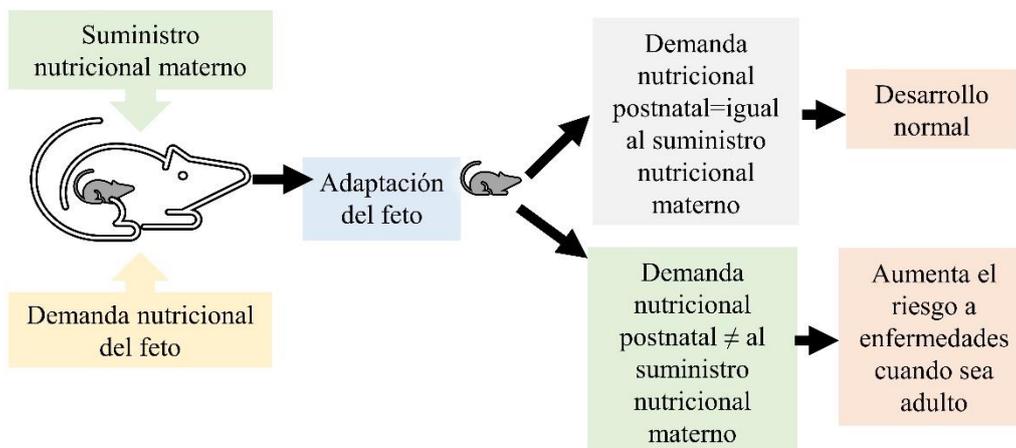


Figura 1. Esquema general del concepto de programación fetal, durante la gestación. El feto se adaptará según su demanda nutricional y el suministro por parte de la madre de los nutrientes que necesita para crecer. En el animal postnatal, si su demanda nutricional se corresponde con el suministro nutricional materno, el feto se adaptará en el útero y tendrá luego un desarrollo normal. Mientras que, si la demanda nutricional no corresponde con la oferta nutricional materna, aumenta el riesgo de que padezca enfermedades cuando sea adulto. Adaptado de Vanhees et al. 2014.

Concepto DOHaD

Numerosos estudios epidemiológicos y en animales han apoyado más aún el trabajo de Barker y explican cómo la restricción del crecimiento intrauterino inducido por la placenta en humanos

se manifiesta con disglucemia, dislipidemia, enfermedad del hígado graso y resultados cardiovasculares adversos en la descendencia cuando llegan a adultos (Hoffman et al. 2021). Hoy en día, gracias a numerosos estudios en el campo de la medicina humana y en animales de experimentación se ha demostrado que la salud a lo largo de la vida está relacionada con la calidad de vida en los inicios o primeras etapas del desarrollo y es por ello que se conoce el concepto de "programación del desarrollo" ahora llamado DOHaD. Este concepto propone que la fisiología y el metabolismo fetal y neonatal pueden verse alterados por diferentes desafíos o factores durante un período de tiempo ventana que es considerado crítico durante la gestación y la lactancia. Estas alteraciones generan respuestas estructurales y funcionales persistentes en el feto que se asocian con el desarrollo de enfermedades o alteraciones en el adulto (Zambrano et al. 2021) (Figura 1).

De esta manera, es que existe el riesgo de desencadenar enfermedades en la descendencia por factores ambientales que se presentan en la etapa de gestación en el feto y que incluyen la malnutrición materna, el estrés, la hipoxia, la exposición a corticosteroides, a productos químicos, etc (Gluckman et al. 2010). La exposición materna a factores ambientales promueve cambios epigenéticos en la descendencia, muchas veces asociados a cambios en el fenotipo.

La nutrición como factor de programación

La nutrición es el factor ambiental más importante que influye en los procesos de desarrollo a través de la regulación de los mecanismos epigenéticos. La epigenética se conoce como el estudio de aquellos cambios heredados en la expresión genética que no están relacionados con las modificaciones en la secuencia de ADN. Los procesos epigenéticos incluyen la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las histonas y la expresión desregulada del ARN no codificante (Mejia-Montilla et al. 2020; Justulin et al. 2023). Asimismo, pueden generarse cambios en el epigenoma por mecanismos protectores del feto que le permiten una adaptación a las condiciones intrauterinas. Estos cambios interfieren con el desarrollo fetal y se manifiestan muchas veces en la edad adulta como enfermedades crónicas. En el proceso de programación intrauterina, las alteraciones pueden incluir cambio de función de los tejidos, ya sean cambios permanentes en procesos hormonales y celulares (Mejia-Montilla et al. 2020).

Nutrición y reproducción en el macho

Tanto la subnutrición como la sobrenutrición son factores de programación del desarrollo que pueden generar alteraciones a nivel reproductivo. Hay evidencia que una subnutrición materna disminuye el número de espermatozoides en las crías macho adultas (Zambrano et al. 2021). De la misma manera, una sobrenutrición materna produce una disminución en el número de espermatozoides en las crías macho adultas (Galarza et al. 2019; Sertorio et al. 2022).

2.2 Testículo de rata

Desarrollo embrionario del testículo

El desarrollo de los testículos se da a partir de la cresta nefrogénica (o cordón) que discurre a lo largo de la porción dorsal de la pared abdominal por encima de la capa parietal del peritoneo. Dicha capa parietal es invaginada por los testículos en desarrollo, luego los mismos se desplazan y se abren camino desde el interior de la cavidad abdominal hasta llegar al escroto. Los testículos descienden a los 30-40 días de edad en la rata. Mientras la evaginación tubular del peritoneo parietal, los testículos y el conducto deferente atraviesan la pared abdominal en su recorrido hasta llegar al escroto, recogen varias capas de tejido o fascias. Tenemos una fascia espermática externa que se une en el anillo inguinal externo y una fascia interna en el anillo inguinal interno. El canal inguinal que se ubica oblicuamente a través de la pared abdominal, encierra el cordón espermático (estructura tubular) que se extiende desde el canal inguinal hasta el escroto. Dicho cordón contiene el conducto deferente, el proceso vaginal, arterias, un plexo de venas, linfáticos y nervios, además de grasa cerca de los testículos en la rata. Con respecto al proceso vaginal, este permanece abierto durante toda la vida, lo que conlleva a que la cavidad peritoneal se extienda hacia el escroto. Posteriormente, las paredes de esta cavidad se cierran juntas, denominándose esta estructura, la túnica vaginal (Maynard & Downes 2019).

Por otra parte, los cordones gonadales quedan separados del epitelio celómico por una capa de mesénquima, la denominada túnica albugínea en la cual discurren vasos sanguíneos hacia el interior de la gónada. En cuanto al desarrollo y organización interna de los testículos, partimos de los cordones gonadales, los cuales se organizan para formar los túbulos seminíferos, los que se desarrollan totalmente en la vida postnatal. Los túbulos seminíferos se organizan y sus extremos se conectan con una red central, la denominada rete testis, que se continúa por medio de los conductillos eferentes (derivados de los túbulos mesonéfricos) hacia el exterior. En el testículo formado las células germinales se diferencian en espermatogonias, alojadas en la pared de los túbulos seminíferos y asociadas a las células de Sertoli (derivadas de las células epiteliales mesonéfricas). Por el contrario, las células intersticiales o de Leydig que se ubican en el tejido intersticial entre los túbulos seminíferos derivan de células del mesénquima relacionadas con la cresta gonadal (Noden & DeLahunta 1990).

Anatomía y función testicular

Los testículos son órganos bilaterales localizados junto a cada epidídimo (Barone 2001). En la rata tienen una forma ovalada y miden cuando el animal es adulto 20 x 14 mm (Malley 2009, Maynard & Downes 2019). En la mayoría de los roedores el peso testicular es de 0,8% a 2,2% del peso corporal (Setchell & Breed 2006). El escroto se distingue fácilmente en posición ventrolateral respecto al ano. La piel del escroto es delgada y está cubierta de pelos delgados. El canal inguinal (comunicación entre el interior del abdomen y el del escroto) permanece abierto durante toda la vida y tiene un diámetro de 8 a 12mm en distensión, lo que permite que los testículos se hallen tanto en el abdomen como en el escroto. Estos animales son criptórquidos facultativos, es decir que son capaces de introducir a voluntad los testículos dentro de la cavidad abdominal (Malley 2009, Yllera et al. 2020). En el testículo se llevan a cabo dos funciones, por

un lado, endocrinas y, por otro lado, exocrinas. El componente exocrino está dado por la producción de los gametos altamente diferenciados denominados espermatozoides. Mientras que las funciones endocrinas, son realizadas por las células intersticiales de Leydig, situadas en el compartimento intersticial (productoras de andrógenos) y las células de Sertoli responsables de la producción de por ejemplo inhibina entre otras hormonas (Dyce et al. 2012; Yllera et al. 2020).

Histología testicular

Albugínea

Los testículos están rodeados por la túnica albugínea, una firme cápsula de tejido conjuntivo denso, con abundantes fibras colágenas, de color azul blanquecino, de 20-40 μm de espesor en la rata (Maynard & Downes 2019) (Figura 2).

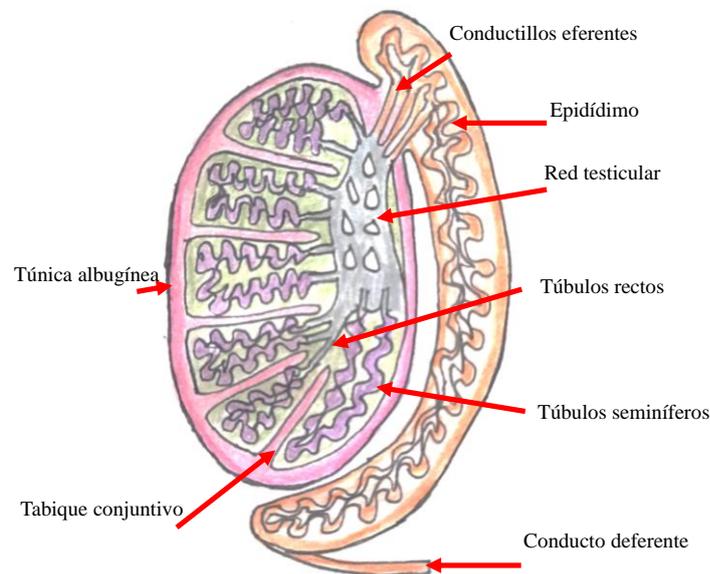


Figura 2. Esquema representativo del testículo y epidídimo de mamífero en un corte sagital. Se observa la túnica vaginal que rodea al testículo, y los tabiques de tejido conjuntivo que subdividen el parénquima testicular en lobulillos que contienen los túbulos seminíferos contorneados, los que desembocan en los túbulos rectos. Luego la rete testis se continúa con los conductillos eferentes que atraviesan la albugínea y salen para formar el epidídimo. Elaborado por: Dra. Helen Viotti.

Por fuera del testículo se encuentra la hoja visceral de la túnica vaginal, que está en contacto con la túnica albugínea (Cervený et al. 2011; Maynard & Downes 2019). Esta túnica albugínea está delimitada superficialmente por células mesoteliales, y en su interior hay una capa de fibroblastos, fibras de colágeno y haces de células musculares lisas. El grosor de la capa muscular varía entre las especies, con una sola capa en la rata de laboratorio (Setchell & Breed 2006). Por otra parte, se encuentran unidas la capa visceral y parietal de la túnica vaginal y el conducto deferente al testículo por medio de un tejido conectivo denominado mesorquio, el cual contiene los vasos sanguíneos y los conductos eferentes que van desde los túbulos seminíferos hasta el epidídimo. Debajo de la túnica albugínea se encuentra una capa vascular,

la túnica vascular (Maynard & Downes 2019). La túnica albugínea se continúa en la región del mediastino testicular con tejido conectivo que rodea los vasos intratesticulares. El mediastino testicular en muchos roedores es relativamente pequeño y situado en una posición marginal (Wrobel & Bergmann 2006) siendo el tejido conjuntivo muy escaso con hebras finas que se localizan entre los túbulos seminíferos (Maynard & Downes 2019).

Parénquima testicular

El parénquima testicular está formado por los túbulos seminíferos contorneados, túbulos seminíferos rectos, red del testículo (rete testis) con conductillos eferentes de salida que atraviesan la albugínea y constituyen la cabeza del epidídimo (Cervený et al. 2011) (Figura 3).

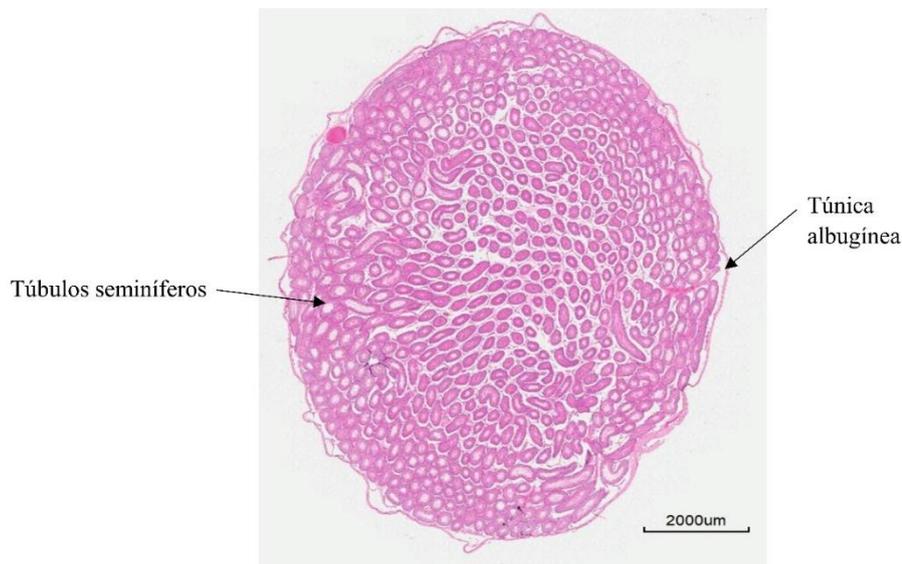


Figura 3. Imagen de un corte transversal del testículo derecho de ratona Wistar a los 160 días de edad coloreado con la técnica de Hematoxilina-eosina. Autor: Viotti-Pedrana. Escaneado en escáner MoticEasyScan One USA, proyecto Institucional, Facultad de Veterinaria.

Los túbulos seminíferos tienen forma de horquilla y ambos extremos están conectados en el mesorquio a la rete testis (Maynard & Downes 2019). Cada testículo de la ratona contiene alrededor de 30 túbulos seminíferos contorneados, con un diámetro externo de aproximadamente 250 μm y una longitud total de unos 20 m por testículo (12 m/g) y una superficie de 340 cm^2 (Figura 4a). Los túbulos están rodeados de tejido peritubular que comprende una membrana basal y una (en ratas) capa de células mioepiteliales o miofibroblastos, intercalados con capas de fibras de colágeno, glicosaminoglicanos y proteoglicanos; en roedores, hay una capa externa de vasos linfáticos que están tapizados con células endoteliales linfáticas (Setchell & Breed 2006). Asimismo, los túbulos seminíferos tienen un epitelio germinal donde se llevará a cabo la formación de los futuros espermatozoides (Cervený et al. 2011).

Epitelio seminífero

El epitelio seminífero o germinal es un epitelio estratificado, en el cual se encuentran las células de Sertoli y espermatogonias que se apoyan sobre lámina basal de los túbulos seminíferos y las células en otras etapas del desarrollo en los siguientes estratos del epitelio germinal. A las células de Sertoli se las conoce como células nodrizas; son esenciales para el desarrollo de las

células germinales, ya que con sus prolongaciones citoplasmáticas envuelven y protegen a las células germinales en desarrollo hasta que se diferencian a espermatozoides y se liberan en la luz del túbulo seminífero (Maynard & Downes 2019). Los espacios intersticiales entre los túbulos seminíferos, denominados tejido intersticial, están ocupados por tejido conjuntivo laxo, en la rata presentan un sistema bien desarrollado de sinusoides linfáticos y vasos sanguíneos adyacente a los túbulos. Además, se pueden observar en este tejido las células endocrinas de Leydig (productoras de testosterona) (Figura 4c). En la rata el número de estas células es relativamente escaso y, a menudo, se encuentran rodeadas de espacios linfáticos (Setchell & Breed 2006, Maynard & Downes 2019).

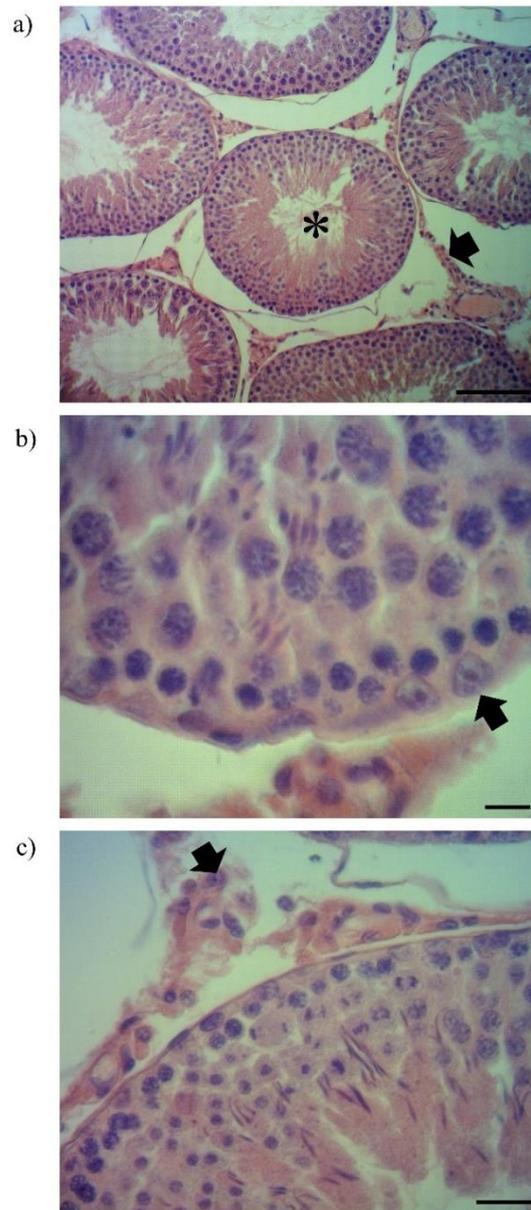


Figura 4. Imagen de un corte transversal del testículo derecho de rata Wistar a los 160 días de edad coloreado con la técnica de Hematoxilina-eosina. Autor: Viotti-Pedrana. a) Túbulos seminífero en corte transversal, luz de túbulo seminífero (asterisco) y tejido intersticial (flecha). Magnificación 100 aumentos. b) Se observan células del epitelio seminífero y células de Sertoli (flecha). Magnificación 600 aumentos. c) Se observa tejido intersticial con células de Leydig (flecha). Magnificación 400 aumentos.

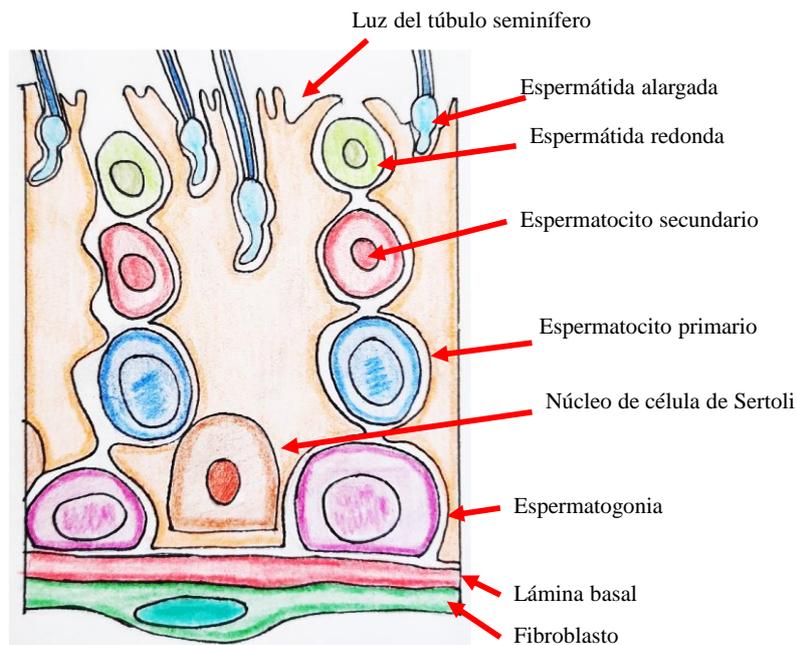


Figura 5. Esquema representativo del epitelio seminífero y las células que lo componen. Se observa las células de Sertoli y sus ramificaciones que rodean a las células germinales. Se reconocen espermatogonias, espermatocitos, espermatidas redondas y alargadas. Elaborado por: Dra. Helen Viotti

Espermatogénesis en la rata

La espermatogénesis es un proceso por el cual se desarrollan los espermatozoides a partir de las espermatogonias. Dicho proceso se subdivide en tres fases: 1) espermatocitogénesis: es el proceso por el cual las espermatogonias se dividen mitóticamente y finalmente se convierten en espermatocitos primarios. 2) meiosis: aquí la maduración de los espermatocitos da como resultado espermatidas con un número reducido (haploide) de cromosomas. 3) espermiogénesis: es el proceso de transformación de las espermatidas en espermatozoides. Además de la población celular involucrada en la espermatogénesis (población cíclica), el epitelio germinal contiene una línea separada de células madre y precursoras de espermatogonias (Wrobel & Bergmann 2006) (Figura 5).

Espermatocitogénesis

La espermatogénesis en la rata es un proceso muy ordenado que tiene lugar en los túbulos seminíferos. Los túbulos seminíferos de las ratas recién nacidas contienen espermatogonias ubicadas centralmente, que luego se asientan en la membrana basal de los túbulos seminíferos al alcanzar los 5 días de vida (Lagos-Cabré & Moreno 2008). De esta forma las espermatogonias de la rata se caracterizan por tener forma redondeada. Son las células madre del sistema, se dividen para mantener su propio número y para producir las células que luego siguen el proceso de desarrollo de los espermatozoides. Las espermatogonias se dividen por mitosis en tipos A y B (Maynard & Downes 2019). Las espermatogonias con características nucleares intermedias

entre el tipo A y el tipo B se identifican por la presencia de finas placas de cromatina cerca de la membrana nuclear (Kerr et al. 2006). El tipo A son las células de reemplazo y el tipo B son las células que se convierten en espermátocitos. Las espermatogonias tempranas de tipo B no se pueden distinguir de las espermatogonias en general, pero pronto aumentan de tamaño y comienzan el proceso de la meiosis (Maynard & Downes 2019).

Meiosis

En la rata, la meiosis comienza entre los días 13 y 14 de vida, cuando se pueden distinguir las primeras células meióticas en la etapa de leptoteno. Las células meióticas que experimentan la primera y segunda división se denominan espermátocitos primarios y secundarios, respectivamente. Los espermátocitos primarios surgen de las espermatogonias tipo B que pierden contacto con la membrana basal de los túbulos seminíferos. A medida que continúa la meiosis, un espermátocito secundario da lugar a dos células haploides denominadas espermátidas, que pueden observarse por primera vez en ratas de 24 y 25 días de vida (Lagos-Cabré & Moreno 2008).

Espermiogénesis

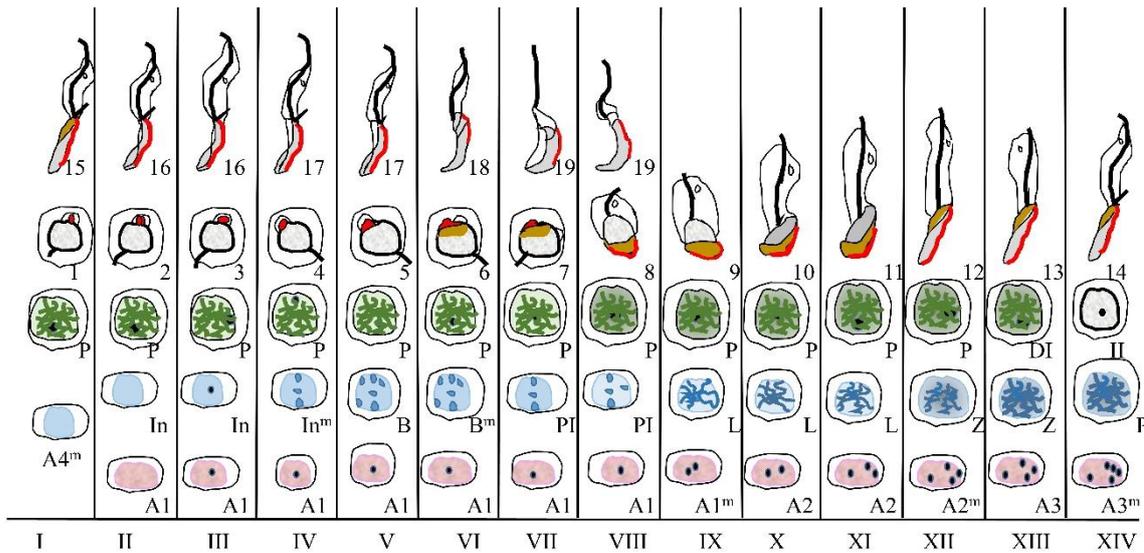
El desarrollo de las espermátidas en espermatozoides tiene lugar mientras las espermátidas están parcialmente contenidas por las células de Sertoli (Fawcett, 1995). A medida que las espermátidas se alargan, se forma un denso casquete acrosómico en el extremo de la espermátida, incrustado más profundamente en las células de Sertoli, y el núcleo de la espermátida se condensa en una masa de material de tinción oscura. El otro extremo de la espermátida que se alarga se convierte en la cola del espermatozoide, formada por un flagelo largo, rodeado de mitocondrias que están dispuestas en espiral alrededor de la primera parte del flagelo. El citoplasma que no utiliza el espermatozoide se denomina cuerpo residual (Maynard & Downes 2019).

Espermatozoide

El espermatozoide completamente desarrollado comprende una cabeza (capuchón acrosómico y núcleo) y una cola. La cola se divide en una pieza de conexión central rodeada por la espiral mitocondrial, una pieza principal larga y una cola más corta. El espermatozoide de rata mide aproximadamente 190 μm de largo y tiene una cabeza en forma de gancho. Las formas de las cabezas de los espermatozoides varían ampliamente entre las especies de mamíferos. Los espermatozoides de los pequeños roedores son mucho más largos que los del hombre (Bishop y Walton, 1960).

Ciclo espermatogénico en los túbulos seminíferos de la rata

En la rata, el desarrollo de generaciones de espermatogonias, espermatocitos, espermatidas y espermatozoides está estrechamente integrado con el de otras generaciones presentes en la misma zona del túbulo. Por lo tanto, las células no están dispuestas al azar, sino que están organizadas en asociaciones celulares bien definidas (Leblond & Clermont 1952). Es así que la espermatogénesis se caracteriza por una estricta regulación y sincronización cronológica de los procesos de división y diferenciación celular. El término estadio, describe una combinación particular de poblaciones de células, como se observa dentro de una sección histológica del túbulo seminífero (Kerr et al. 2006).



Estadíos

Figura 6. Esquema representativo de los estadios del ciclo del epitelio seminífero en la rata. Se observan las 14 asociaciones celulares en los túbulos seminíferos. Elaborado por: Dra. Helen Viotti. Adaptado de: Kerr et al. 2006. Espermatogonia: A1, A1^m, A2, A2^m, A3, A3^m, A4^m, In, B^m. Espermatocitos en meiosis I preleptoteno PI, En leptoteno L, en zigoteno Z, en paquiteno P, en diploteno DI, en meiosis II II. Espermatidas: redondas del 1 al 7, en elongación del 8 al 18 y el 19 espermatozoide previo a ser liberado por el proceso de espermiación.

Las regiones del túbulo ocupadas por una determinada etapa de células germinales se denominan segmentos. La suma de todos los segmentos a lo largo del túbulo constituye una onda espermatogénica. Las asociaciones celulares características surgen de generaciones de células en diferentes estados de diferenciación (Kerr et al. 2006). De Le Blond y Clermont, 1952, definieron el término ciclo del epitelio seminífero como la serie de cambios o eventos en un área determinada del epitelio seminífero (Kerr et al. 2006). Según criterios morfológicos, el número de estadios del ciclo del epitelio seminífero no es necesariamente fijo varía con las especies (Liebich2019). Los autores de Leblond y Clermont en 1952 dividieron la espermatogénesis en la rata en 14 etapas o asociaciones celulares. La secuencia completa de 14 etapas o asociaciones celulares constituye un ciclo del epitelio seminífero. En la rata, toda la sección transversal del túbulo está en la misma etapa del ciclo seminífero y se extiende sobre varios milímetros del túbulo seminífero adyacente. La duración del ciclo en la rata es de 48-53

días. Los períodos correspondientes del ciclo del epitelio seminífero con sus asociaciones celulares definidas son designados por números romanos. Es entonces que se necesitan 12 días para que una espermatogonia se convierta en espermatocito, para que un espermatocito se convierta en espermátida redonda y para que una espermátida redonda se convierta en espermátida alargada; y que al final de los últimos 12 días la espermátida alargada se convierta en un espermatozoide. Por tanto, una espermatogonia tarda 48 días en convertirse en un espermatozoide (Maynard & Downes 2019).

2.3 Célula de Sertoli

Las células de Sertoli juegan un papel central en la diferenciación de los testículos, que ocurre alrededor de 11,5 días después del coito en ratones. Dichas células de Sertoli proliferan activamente antes del nacimiento y en el caso de las ratas, la proliferación se extiende a 3 semanas, en las ratas luego del nacimiento. A partir de entonces, el número de células de Sertoli por testículo se considera estable a lo largo de la vida del animal (Figueiredo et al. 2016, Auharek & de França 2010) (Figura 4b). Las células de Sertoli son células grandes y alargadas que abarcan todo el epitelio germinal desde la membrana basal hasta la luz. Están fuertemente unidas a la membrana basal y forman una lámina celular continua a través de uniones estrechas organizadas basolaterales que ocluyen el epitelio germinal del intersticio (Bhushan et al. 2016). En la rata las células de Sertoli descansan sobre la lámina basal de los túbulos seminíferos y tienen núcleos ovalados. Estas células son altas y se extienden hasta la superficie del epitelio con prolongaciones citoplasmáticas largas que se envuelven alrededor de las cohortes de células germinales en desarrollo (Bhushan et al. 2016, Maynard & Downes 2019).

Funciones de las células de Sertoli

Dentro de las funciones que cumplen las células de Sertoli están las de soporte y nutrición a las espermatogonias que se localizan en el compartimento basal del epitelio seminífero, en contacto directo con las células de Sertoli y la membrana basal. Este microambiente circundante se denomina nicho de células madres (Auharek & de França 2010, Maynard & Downes 2019). Por lo tanto, las células de Sertoli dan soporte a las células germinales en desarrollo durante su división y maduración (Meachem et al. 1996). En ratas, en el animal adulto la célula de Sertoli puede llegar a soportar aproximadamente 20 células germinales en desarrollo (Chojnacka et al. 2016). Varios estudios han indicado que el número de células de Sertoli en los testículos de ratas adultas determina el potencial espermatogénico final del animal adulto (Meachem et al. 1996). Otra función de las células de Sertoli es la fagocitosis, durante la maduración de las espermátidas se da la liberación de partes del citoplasma, formando los denominados cuerpos residuales. Los cuerpos residuales son fagocitados por las células de Sertoli (Bhushan et al. 2016). Las células de Sertoli forman parte de la barrera hematotesticular. Se ha observado que alrededor de los 20 días de vida en la rata las células de Sertoli dejan de dividirse se forman uniones estrechas entre las células vecinas, de modo que se establece la barrera hematotesticular (Bhushan et al. 2016). La síntesis y secreción de proteínas es otra función que realizan las células de Sertoli. Algunas de ellas son la proteína transportadora de andrógenos, una proteína similar a la transferrina, un activador del plasminógeno, y la inhibina (Cervený et al. 2011; Liebich 2019). Por otro lado, las células de Sertoli sintetizan, bajo el control de la FSH y los

andrógenos, un gran número de proteínas que secretan hacia la luz de los tubos seminíferos, hacia las células germinales y el espacio intersticial (Staub & Johnson 2018).

Factores de transcripción en el testículo

Los factores de transcripción son proteínas capaces de unirse específicamente a secuencias cortas de ADN (elementos en cis) localizadas en los promotores de genes, y de interactuar con el complejo de pre-iniciación de la transcripción para inducir o inhibir la actividad de la enzima ARN polimerasa II. De esta manera, los factores de transcripción modulan la tasa de transcripción de sus genes blanco (García-Morales et al. 2013). Por lo tanto, los factores de transcripción gobiernan diversos aspectos del crecimiento y la diferenciación celular como interruptores principales de la expresión génica (Eo et al. 2012). En el testículo la célula de Sertoli produce factores de transcripción como el ETV5 (factor de transcripción etv variante del gen 5) (Schlesser et al. 2008) y el factor derivado de células gliales GDNF (factor neurotrófico derivado de células gliales) (Yang et al. 2010). Tienen una gran variedad de funciones durante el desarrollo, incluyendo la regulación de la morfogénesis de tejidos, la angiogénesis y la diferenciación celular. En el testículo las células madre espermatogonias forman una subpoblación de células germinales que se renueva para mantener la producción espermática a lo largo de la vida. Las células madre espermatogonias residen en la parte basal del epitelio del túbulo seminífero, en asociación con las células de Sertoli que les proveen a las células germinales de factores de crecimiento y diferenciación. Además de las células de Sertoli, las de Leydig y mioides todas pueden influir en el microambiente de las células germinales a través de factores solubles (Cooke et al. 2006). El mantenimiento de la regulación, autorrenovación y diferenciación de las células madre espermatogonias es crítico para la espermatogénesis normal y tiene aplicabilidad clínica significativa en la comprensión de algunos tipos de infertilidad (Tyagi et al. 2009). Los factores y hormonas producidas por la célula de Sertoli son fundamentales para lograr un microambiente testicular y el desarrollo de una espermatogénesis normal (Alves et al. 2016).

ETV5 (factor de transcripción etv variante del gen 5)

El ETV5 o ERM se expresa tanto en las células de Sertoli como en las células germinales, pero su rol específico en cada tipo celular no ha sido aún determinado (Simon et al. 2010). Trabaja en conjunto con el GDNF, creando un microambiente para que la espermatogénesis ocurra, siendo un factor crítico para el mantenimiento de las células madre/progenitoras espermatogonias (Simon et al. 2007). Es así que se conoce que una de las funciones de GDNF es ser un activador parácrino de ETV5. Existe una vía molecular dual gobernada por ETV5 en los testículos. Las células de Sertoli producen GDNF y otros factores que actúan sobre los receptores de las espermatogonias. ETV5 en las células madres espermatogonias se activa e induce genes como son Lh \times 1 y Bcl6b que son fundamentales para la autorrenovación de las células madres espermatogonias. En las células de Sertoli, ETV5 también contribuye a la producción de CCL9 (ligando 9 de quimiocina), que se utiliza para la quimioatracción de células germinales (Eo et al. 2012) Figura 7. Una disminución en la producción de citoquinas en ratones knock-out, resulta en una disminución en la actividad quimiotáctica y reducción de

la migración de células madre espermatogonias a los nichos de células de Sertoli, por lo tanto, reducción y pérdida de células germinales (Simon et al. 2010).

En ratones knock-out para el gen que codifica el ERM, se observó que presentaban disminución de la proliferación celular sin bloqueo de la espermatogénesis normal, presentando en adultos un fenotipo de células de Sertoli morfológicamente normales en la membrana basal (Chen et al. 2005).

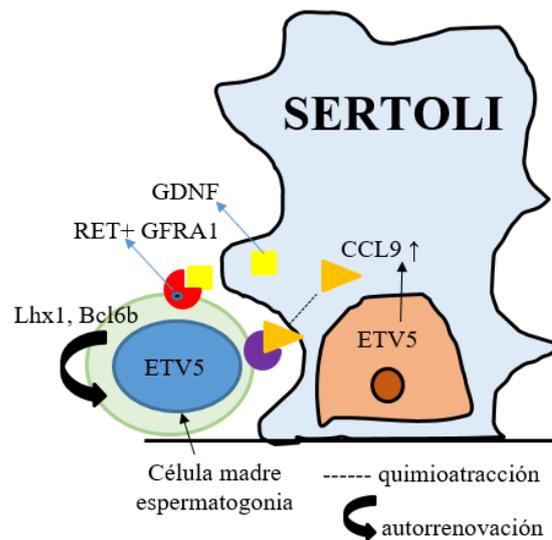


Figura 7. Esquema representativo de las acciones de ETV5 y GDNF en las células de Sertoli y las espermatogonias en el testículo. ETV5 (factor de transcripción etv variante del gen 5), GDNF (factor derivado de las células gliales), CCL9 (ligando 9 de quimiocina), Lhx1, proteína homeobox LIM 1, Bcl6b, CLL/linfoma de células B 6. RET (receptor tirosina quinasa), GFRA1 correceptor específico de ligando. Elaborado por: Dra. Helen Viotti. Adaptado de Eo et al. 2012).

El factor de transcripción ETV5 se ha relacionado con la obesidad en estudios de asociación del genoma completo. Además, los ratones deficientes en ETV5 (knock-out) tienen un peso corporal reducido, una masa grasa más baja y son resistentes a la obesidad inducida por la dieta, lo que vincula directamente a ETV5 con la regulación del equilibrio energético y el metabolismo (Gutierrez-Aguilar et al. 2015). Por otro lado, se vió en ratones que ETV5 se expresa en altos niveles en células de Sertoli juveniles y también ARNm de ETV5 en células madre espermatogonias murinas cultivadas. Por lo tanto, la falta de ETV5 puede producir cambios en las células de Sertoli y/o germinales que impiden la fertilidad de los espermatozoides (Schlessner et al. 2008). Además, se ha localizado la expresión testicular de ETV5 en las células de Sertoli adultas en el ratón, así como también en testículos neonatales y en células germinales. La expresión neonatal de ETV5 en estos tipos celulares plantea la interrogante con respecto a su potencial función en la autorrenovación de las células madre espermatogonias y sus roles específicos en Sertoli y las células germinales. Las células madre espermatogonias mantienen un equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación. Esta regulación depende de los factores producidos tanto por las células de Sertoli como en las

células madre y la subsiguiente comunicación intercelular entre estos tipos de células en el microambiente denominado nicho de células madre espermatozonias (Morrow et al. 2007).

GDNF (factor derivado de las células gliales)

El GDNF forma parte de la superfamilia de los factores de crecimiento transformante beta (TGF- β). El GDNF y su receptor (GFR alfa 1) fueron encontrados en testículos de diferentes especies, incluyendo ratón y rata (Ryu et al. 2005) bovinos (Oatley et al. 2004) y primates (Maki et al. 2009). El GDNF es una proteína encargada del control del crecimiento celular y procesos de diferenciación, producida por las células de Sertoli (Tadokoro et al. 2002) y las células peritubulares (Spinnler et al. 2010). El factor GDNF cumple un rol en el mantenimiento y autorrenovación de las células madres espermatozonias, y dicha función la cumple enviando señales a través del receptor tirosina quinasa (RET) presente en las espermatozonias y que requiere un correceptor específico de ligando (GFRA1), que está en la membrana plasmática. La señalización RET provoca la activación secundaria de importantes vías de señalización esenciales para la autorrenovación de las espermatozonias (Tyagi et al. 2009) (Figura 7).

Según estudios *in vivo* e *in vitro* el GDNF es un factor clave responsable del mantenimiento de las poblaciones de espermatozonias células madre/progenitoras, regulando su renovación (Oatley et al. 2007). El GDNF regula el número de células madre en el desarrollo de los testículos en el ratón. La sobreexpresión de GDNF en las células germinales y de Sertoli produce un exceso de espermatozonias que tienen receptores para esta proteína en su superficie. Mientras que una reducción de la síntesis de GDNF en ratones knock-out produce un número anormalmente bajo de espermatozonias. Esto demuestra la importancia de un número adecuado de células germinales y la proporción correcta de células germinales y células de Sertoli para el mantenimiento de la espermatogénesis (Setchell 2006). En un estudio de diabetes inducida en el tiempo en ratas, se observó una disminución de los niveles de ARNm, de GDNF y sus receptores, así como de Bcl-6b con respecto al grupo de animales control. Mientras que las células de Sertoli y de Leydig disminuyeron, así como el recuento de espermatozoides y su viabilidad, como consecuencia se afecta potencialmente la relación entre las células de Sertoli y las células madres espermatozonias y se inhibe el proceso de autorrenovación de las células madres espermatozonias (Azarniad et al. 2020).

Factores de crecimiento en el testículo

Los factores de crecimiento son moléculas capaces de estimular una variedad de procesos celulares que incluyen la proliferación celular, la migración, la diferenciación y la morfogénesis multicelular durante el desarrollo y la regeneración de tejidos (Ren et al. 2020). Los factores de crecimiento son proteínas secretadas naturalmente por las células e interactúan directamente con la matriz extracelular circundante o se unen a los receptores de la membrana celular. La unión del factor de crecimiento con su receptor específico estimula las vías de transducción de señales celulares que desencadenan eventos como la migración celular, la supervivencia, la adhesión, la proliferación, el crecimiento y la diferenciación celular (Mitchell et al. 2016).

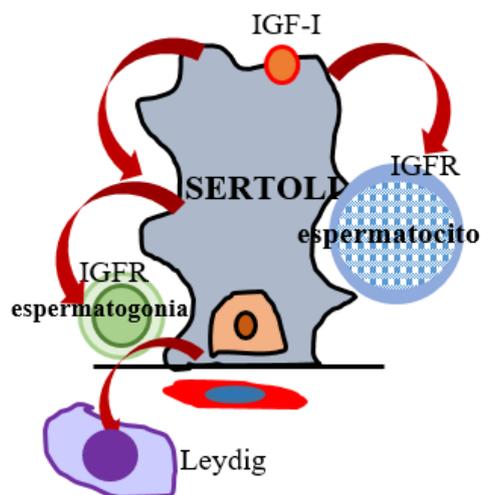


Figura 8. Esquema representativo de las acciones de IGF-I en las células de Sertoli, células de la línea germinal y células de Leydig. IGFR (receptor de IGF-I). Elaborado por: Dra. Helen Viotti.

IGF-I (factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I)

La familia de los factores de crecimiento IGF-I e IGF-II son pequeños polipéptidos mitógenos de cadena sencilla que proporcionan señales para el control del crecimiento, el metabolismo y la función reproductiva. IGF juega un papel fundamental en la regulación del crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular y afecta a casi todos los órganos y sistemas del cuerpo. Así como tiene que ver con el correcto desarrollo y función de los testículos. De esta manera los factores gonadales locales como los de la familia IGF modulan el rendimiento reproductivo (Griffeth et al. 2014). Por otra parte, se describió sólo una isoforma de IGF-I en el hombre (IGF-I B) que se detectó en el compartimento nuclear. Los factores de crecimiento se han identificado en el nucléolo, que es el sitio primario de la biogénesis de las subunidades de los ribosomas, así como de muchos otros procesos bioquímicos (Poreba & Durzynska 2020). Otros estudios han demostrado que el receptor (IGF-IR) se transloca al núcleo celular, donde se une a regiones que aumentan la transcripción de genes. El IGF-IR nuclear (IGF-IR) interactúa física y funcionalmente con algunas proteínas nucleares, el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es un elemento de unión con IGF-IR. El PCNA es un componente fundamental de la maquinaria de la replicación y un regulador principal de la vía de tolerancia al daño del ADN. Es decir, el IGF-IR interactúa con el PCNA y lo fosforila, esto se observó en células madre embrionarias humanas y en otras líneas celulares (Waraky et al. 2007). Las células de Sertoli producen el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) que actúa sobre la diferenciación de las células germinales (Staub & Johnson 2018). La IGF-I es un polipéptido que posee actividad promotora del crecimiento en un amplio rango de células. Se expresa en los testículos de varias especies en las células de Leydig y de Sertoli en el adulto (Figura 8). El IGF-I tiene un rol paracrino en las células de Leydig estimulando la secreción de testosterona (Yoon et al. 2011). Además, tiene un rol paracrino en los espermatocitos en la etapa de meiosis y en las espermatogonias regulando su mitosis. Por otro lado, tiene una acción autocrina para la célula de Sertoli (Soder et al. 1992). El ARNm de IGF-Ir se encuentra en los espermatocitos y espermátidas en ratas adultas (Villalpando et al.

2008; McCoski et al. 2021). Existen datos que indican que la IGF-I juega un rol fundamental en la fisiología testicular, encontrándose aumento de la hormona circulante en la pubertad y cuando existe deficiencia de IGF-I se produce un retraso en el inicio de la pubertad (Moore & Morris 1993). Estudios *in vitro* mostraron que la IGF-I estimula la maduración de células de Leydig aumentando la expresión de enzimas esteroidogénicas y la producción de testosterona. Asimismo, regula la proliferación de células de Leydig y de Sertoli en los testículos de ratones prenatales. En ratones knock-out para el gen de IGF-I los testículos presentaron un tamaño reducido y contaban con un menor número de células de Leydig, además de reducirse los niveles de testosterona en plasma (Rouiller-Fabre et al. 1998). Funciones similares de IGF-I se han demostrado en los testículos de mamíferos adultos (Wang et al. 2003; Villalpando et al. 2008). Se observó que al bloquear el receptor de IGF I en ratón, en las células de Sertoli y germinales, los testículos de animales adultos mostraron una reducción del 75 % en el tamaño de los testículos y la producción diaria de espermatozoides como resultado de una reducción en la tasa de proliferación de células de Sertoli inmaduras durante el período testicular fetal tardío y neonatal temprano (Pitetti et al. 2013). Los niveles plasmáticos de IGF-I medidos en crías adultas de ratas sobrealimentadas se redujeron significativamente en comparación con los animales de control (Smith et al. 2014). Mientras que los fetos de toro expuestos a la sobrenutrición materna experimentaron una disminución en la expresión de IGF1, IGF2 y del receptor de IGF1 (IGF1R), todos ellos involucrados en el desarrollo de los testículos y la esteroidogénesis (McCoski et al. 2021).

2.4 Células de Leydig

Las células de Leydig adultas se originan a partir de una célula madre indiferenciada. En los roedores, existen dos poblaciones de células de Leydig, una población durante el período fetal y otra durante la pubertad (Chen et al. 2017). En ratones y ratas, la primera generación, de células de Leydig fetales, se desarrolla entre los cordones testiculares en los días 11–12 de gestación. Una vez desarrolladas, las células de Leydig fetales se convierten en células diferenciadas. Tienen la capacidad de producir androstenediona y factor 3 similar a la insulina (INSL3) justo antes del nacimiento. El andrógeno producido por las células de Leydig fetales es indispensable para el desarrollo del aparato reproductor y el descenso de los testículos. Las células de Leydig fetales de roedores permanecen en el intersticio testicular después del nacimiento, pero pueden involucrar gradualmente y solo unas pocas persisten en los testículos adultos (Ye et al. 2017). La rata tiene relativamente pocas células de Leydig y, a menudo, se encuentran rodeadas de espacios linfáticos (Maynard & Downes 2019). Las células de Leydig progenitoras son evidentes por primera vez en rata al día 11 de vida, por sus expresiones de enzimas esteroidogénicas. En el día 21 de vida, estas células alcanzaron el nivel máximo en los testículos. Para el día 35 después del nacimiento, las células de Leydig progenitoras se convierten por completo en células de Leydig inmaduras, y para el día 56, la mayoría de las células de Leydig inmaduras se convierten en células de Leydig adultas (Ye et al. 2017). Las células de Leydig adultas son redondas y más grandes que las células de Leydig inmaduras. Las células de Leydig adultas tienen un retículo endoplásmico liso bien desarrollado y abundantes mitocondrias (Shan et al. 1993, Ge & Hardy 1997) (Figura 4c).

2.5 Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso muy regulado que una vez que comenzó ya no puede detenerse. La apoptosis o muerte celular programada, es esencial para la biología del desarrollo, en el mantenimiento del equilibrio de los tejidos en renovación. Si las células ya no son necesarias, se activan los eventos bioquímicos intracelulares que conducen a cambios celulares característicos y a programar la muerte de la célula. Los cambios celulares incluyen reducción celular, fragmentación nuclear, condensación de cromatina, fragmentación del ADN y descomposición del ARNm (Hussar 2022) (Figura 9).

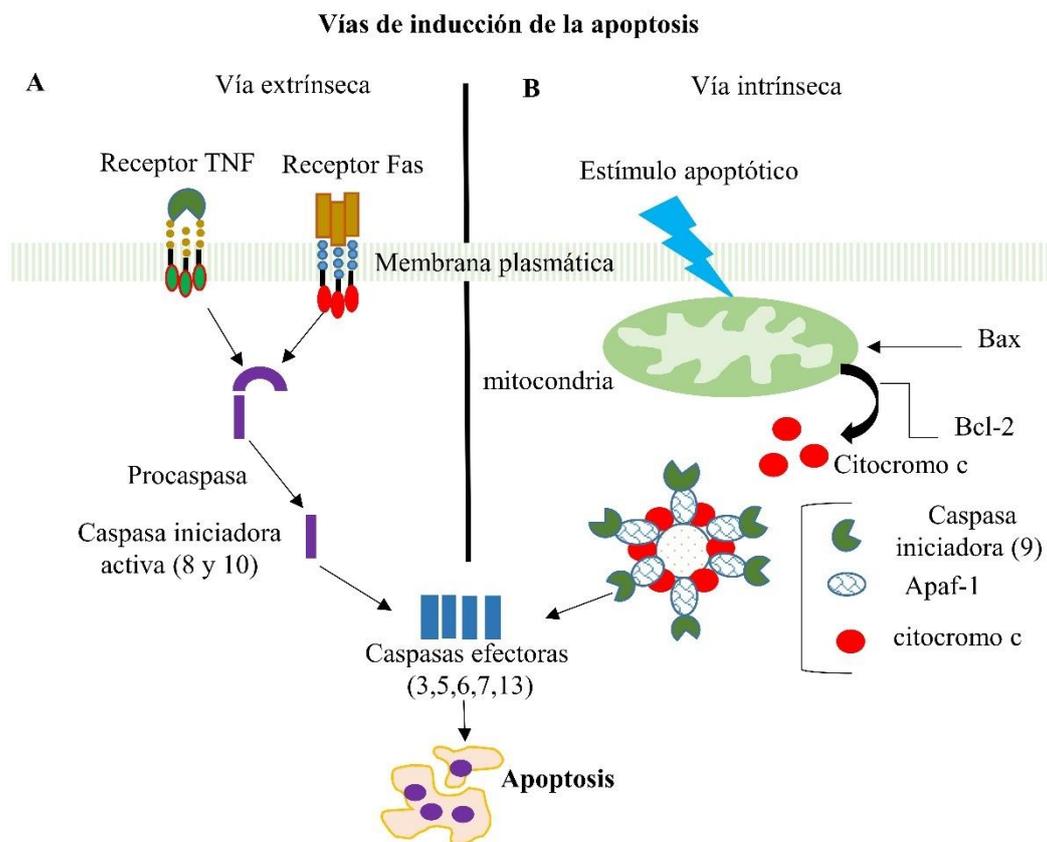


Figura 9. Esquema de las dos principales vías de señalización mediante las cuales una célula sufre apoptosis. A) La vía extrínseca se inicia por la unión de ligandos específicos a receptores de la superficie celular TNF (factor de necrosis tumoral) y Fas (ligando) que produce la activación de la caspasa 8 quien comienza una cascada de activación de la apoptosis de la célula. B) La vía intrínseca se inicia a nivel mitocondrial y lleva a la conformación del apoptosoma, un complejo de proteínas que genera la activación de la caspasa 9 quien inicia la cascada que llevará a la muerte por apoptosis. Adaptado de Zamora et al. 2005; Megías et al. 2023.

Proteínas apoptóticas: caspasa-3, Bax y Bcl-2.

Caspasa-3

Las proteínas denominadas caspasas (cisteinil-aspartato proteasas) son importantes en la regulación de la apoptosis, los procesos inflamatorios y en el desarrollo (Fesik & Shi 2001). Tras su activación desencadenan el proceso de apoptosis, y lo realizan por diferentes vías: la vía intrínseca o la vía extrínseca de la apoptosis (Figura 6).

La **vía intrínseca** de la apoptosis es una respuesta celular a un cambio en la estructura intracelular causado por un ambiente en condiciones de estrés. Dichas fuentes de estrés que provocan cambios celulares pueden ser exógenas o endógenas. Dentro de los factores desencadenantes exógenos se conocen las toxinas, la radiación, los ácidos grasos, etc. Mientras que los factores de estrés endógenos incluyen el daño en el ADN, el estrés en el retículo endoplásmico, la translocación mitocondrial, la activación de p53, la sobreexpresión de proteínas que solo contienen BH3, la homeostasis de Ca^{2+} y/o el desequilibrio en el estado redox (Wang et al. 2017). Como las señales causadas por ambos tipos de desencadenantes influyen en las mitocondrias, la vía intrínseca de la apoptosis se conoce como vía mitocondrial (Figura 6). Los efectos de las señales provocan la permeabilidad selectiva de la membrana interna o externa mitocondrial, lo que conlleva a que las proteínas del espacio intermembrana se liberen hacia el citosol. La familia de proteínas Bcl-2 está involucrada en el proceso de formación de macroporos en la membrana mitocondrial externa. Las proteínas pro-apoptóticas activas, Bak, Bax y Bok, sufren hetero-homo oligomerización, lo que conduce a la formación de macroporos que permiten que las proteínas mitocondriales del espacio intermembrana entren en el citosol (Urbani et al. 2021). A partir de las proteínas mitocondriales se libera el citocromo c, que luego de la liberación citosólica, participa en la formación de un complejo proteico conocido como apoptosoma, que escinde la pro-caspasa-9 en caspasa-9 activa. A su vez, la activación de caspasa-9 activa la procaspasa-3 en caspasa-3 efectora. Se inicia así la cascada de las caspasas (Cagnol et al. 2011).

Por otra parte, en la **vía extrínseca** las señales del entorno extracelular son las que llevan a la muerte de la célula por apoptosis. Existen dos vías principales en las vías extrínsecas de la apoptosis: el TNF y la vía Fas (modelo mediado por ligando) (Azzwali et al. 2019). Estas vías involucran receptores de la familia de receptores TNF que están asociados con señales externas, y ambas vías inducen la muerte celular al activar las caspasas, que luego activan a las caspasas ejecutoras; después de lo cual, las células mueren al degradar las proteínas (Hussar 2013).

Las caspasas son clasificadas en: caspasas iniciadoras, ejecutoras e inflamatorias, participando las caspasas iniciadoras y ejecutoras en la apoptosis y las caspasas inflamatorias participando en la infección por patógenos intracelulares (Galluzzi et al. 2016). Dentro de las caspasas ejecutoras están las caspasas 3-6-7. Inicialmente, las caspasas se producen en forma inactiva y luego son activadas por varias señales apoptóticas de pro-caspasas. Las caspasas también participan en la proliferación y diferenciación celular, la supresión de tumores y el desarrollo neuronal (Hussar 2022).

Familia Bcl-2

La familia Bcl-2 consta de miembros proapoptóticos (Bax: Bcl-2-like protein 4) y antiapoptóticos (Bcl-2: B-cell CLL/lymphoma 2), y controlan la apoptosis a través de sus miembros que inhiben o promueven la apoptosis (Hussar et al. 2013).

La familia Bcl-2 comprende muchas proteínas que comparten dominios de homología Bcl-2, y las proteínas de esta familia tienen una estructura general que consiste en una hélice α hidrofóbica rodeada de hélices α anfipáticas (propiedades tanto hidrófilas como hidrófobas) (Youle & Strasser 2008).

Tanto los miembros pro como antiapoptóticos de esta familia, regulan la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, que desempeña un papel importante en el control de la apoptosis. Por otro lado, se sabe que las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 pueden inducir, y los miembros antiapoptóticos pueden inhibir, la liberación de citocromo c en el citosol, después de lo cual, la activación de caspasa-3 y caspasa-9 conduce a la apoptosis (Hussar et al. 2022).

Bax

La proteína Bax es un miembro pro-apoptótico de múltiples dominios de la familia Bcl-2, y en el caso del testículo adulto, las células dentro del compartimiento basal son eliminadas por un mecanismo dependiente de Bax. Dicha proteína es necesaria para el desarrollo normal de la apoptosis de las células espermatozonias (Russell et al. 2002). Por otra parte, Bax es parte de los reguladores centrales de la vía intrínseca de la apoptosis, que luego se activan y se oligomerizan (se convierten monómeros en complejos macromoleculares, generando la polimerización) en la membrana mitocondrial externa para producir su permeabilización, siendo esta una etapa clave en la determinación de la salida de citocromo c al citosol (Peña-Blanco & García-Sáez 2018). La salida del citocromo c es gracias a que Bax junto con otra proteína BH3 forman un poro toroidal que se caracteriza por la fusión de las hojas de la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial externa e interna para formar una superficie continua en el borde del poro, que es formado por lípidos y proteínas (Gilbert et al. 2014).

Bcl-2

La sobreexpresión de la proteína Bcl-2 (antiapoptótica) bloquea la muerte celular. Las formas propuestas de bloqueo de apoptosis son por medio de la regulación de las proteínas antiapoptóticas, por inhibición de los activadores directos de las proteínas BH3, impidiendo que activen a la proteína Bax. Asimismo, otro modelo sugiere una inhibición directa de Bax que bloquea entonces al proceso de apoptosis (Peña-Blanco & García-Sáez, 2018).

Por otro lado, en cuanto a su participación en la reproducción, se vio en ratones que el aumento de Bcl-2 da como resultado una interrupción en la espermatogénesis normal y como consecuencia alteraciones en la fertilidad (Furuchi et al. 1996), produciendo un fenotipo similar al de los ratones con deficiencia de Bax (Pedrana et al. 2013).

Es de esta manera que la relación existente entre Bcl-2 y Bax juega un papel muy importante en la apoptosis de las espermatozonias (Liu et al. 2003).

Apoptosis testicular

La apoptosis y la proliferación celular son dos importantes procesos que están involucrados en el funcionamiento normal de los testículos en mamíferos. La actividad testicular está controlada genética y hormonalmente, influyendo también las condiciones ambientales. La espermatogénesis es un indicador importante de los diferentes factores que afectan la reproducción animal. La espermatogénesis requiere que los procesos proliferativos y degenerativos estén bien equilibrados. Los testículos adultos mantienen una tasa alta de proliferación celular, que involucra principalmente espermatogonias de tipo A. Por otro lado, ya completado el desarrollo gonadal, las células de Sertoli sufren mitosis entre los días 15 y 17 de la edad posnatal (Dadhich et al. 2010). 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 20 a 32 días de nacidos, siendo menor en los adultos (De Rooij & Russell 2000). La apoptosis regula con precisión la homeostasis entre las células de Sertoli y las células germinales. En los testículos de rata, la apoptosis de las espermatogonias tipo A2, A3 y A4 ocurre regularmente, mientras que los espermatocitos primarios y secundarios, así como las espermátidas, sufren apoptosis con menos frecuencia. Por el contrario, las espermatogonias de tipo A1, intermedio y B rara vez degeneran (Dadhich et al. 2010).

2.6 Proteína de proliferación celular: Ki-67

La proteína Ki-67 se expresa y se relaciona con la etapa de la proliferación celular. En la etapa de la interfase, esta proteína puede observarse exclusivamente a nivel del núcleo celular, mientras que, en la etapa de mitosis, la mayor parte de la proteína se reubica en la superficie de los cromosomas. De esta manera, se la considera un excelente marcador para determinar la fracción de crecimiento de una población celular determinada, ya que está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G 1, S, G 2 y mitosis), pero está ausente en las células en reposo (G 0). Hoy en día se la utiliza de forma rutinaria en investigación básica en animales de laboratorio, principalmente en roedores. La proteína Ki-67 se considera imprescindible para el avance a través del ciclo de división celular (Scholzen & Gerdes 2000).

Por otra parte, a nivel testicular el factor Ki-67 está implicado en la proliferación y diferenciación de las células espermatogonias, siendo muy importante en el proceso de espermatogénesis. Dicho factor se usa comúnmente como marcador debido a los enlaces especiales en las células que crecen y se dividen activamente. Por lo tanto, los niveles de expresión de proteínas Ki-67 en los testículos son el marcador estándar de proliferación y de evaluación del estado de proliferación de células espermátogénicas (Zhao et al. 2018).

Como ejemplo de uso en medicina humana, este marcador se utiliza en el diagnóstico de patologías tumorales mamarias como marcador de proliferación de células en proceso de mitosis. Asimismo, se lo utilizó en ensayos con ratas para evaluar la proliferación epitelial en la glándula mamaria, cuyos resultados pueden cuantificarse de manera manual, así como utilizando análisis de imágenes con inteligencia artificial (Dovmark et al. 2022).

A nivel testicular en humanos, el biomarcador Ki-67 se utiliza en el diagnóstico de los tumores testiculares de células germinales, mostrando una mayor expresión de Ki-67 asociada con un peor pronóstico de dicho cáncer testicular (Lourenço et al. 2022).

Por otra parte, en cuanto a estudios de obesidad utilizando modelos en ratas machos adultas, alimentadas con una dieta hipercalórica, se observó una disminución del área inmunomarcada para Ki-67 en el tejido testicular frente al grupo de animales alimentados con una dieta control (El-Wakf et al. 2019). Estudios previos en ratones adultos, con diabetes inducida mediante una dieta con mayor porcentaje de grasas, la inmunoexpresión de Ki-67 a nivel testicular fue menor frente al grupo de animales alimentados con una dieta control (Budak 2021).

2.7 Efectos de la subnutrición materna en la descendencia adulta

Nuestro grupo de investigación observó en modelos de subnutrición materna en ratas, que las crías machos presentaban disminución de la edad y del peso a la pubertad, disminución del peso corporal adulto a los 160 días de vida, aumento del número de células de Sertoli y de espermatogonias, y disminución del diámetro de los túbulos seminíferos disminuyó en el testículo de las crías macho adultas (Genovese et al. 2010; Pedrana et al. 2020). Asimismo, se observó que la subnutrición materna en ratas aumenta la inmunoexpresión del factor de transcripción ETV5 y de IGF-I, mientras que disminuyó la inmunoexpresión del factor GDNF (en el testículo de las crías adultas (Pedrana et al. 2020, 2021). En cuanto a las proteínas apoptóticas en el modelo de subnutrición materna, se observó un aumento de la inmunoexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 al igual que de la caspasa-3 en los testículos de las crías macho adultas (Pedrana et al. 2021).

2.8 Efectos de la sobrenutrición materna en la descendencia adulta

El mundo atraviesa una epidemia de obesidad, donde el sobrepeso coexiste con el bajo peso y las deficiencias de nutrientes. Esto se debe a la condición del hombre a la exposición nutricional y ambiental durante la gestación que pueden programar al feto para que tenga un mayor riesgo de enfermedades crónicas en la adultez. De esta manera, es que se hace referencia a estudios en epidemiología y las adaptaciones del hombre a la energía, al desarrollo de la placenta, a las alteraciones en el metabolismo y las exposiciones ambientales que son claves para generar enfermedades en el adulto. Además, comprender los mecanismos tanto fisiológicos como epigenéticos y moleculares del DOHaD es fundamental para entender de manera global los problemas de la obesidad y otras enfermedades crónicas.

Durante la gestación de una madre obesa los fetos deben reprogramar el desarrollo de órganos y tejidos, debido al panorama metabólico alterado, lo que lleva a cambios a largo plazo en la estructura y la función. La reprogramación fetal relacionada con la obesidad materna ha sido definida como la “hipótesis de sobrenutrición del desarrollo” que explica la asociación entre la obesidad de la madre y su descendencia (Hoffman et al. 2021; Shrestha et al. 2021).

Sobrenutrición materna y las alteraciones metabólicas en las crías

Hay pruebas en humanos que también sugieren que la obesidad materna tiene efectos duraderos para la descendencia, incluyendo un mayor riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares. Los cambios fisiológicos durante la gestación, incluido el aumento de citocinas inflamatorias, la resistencia a la insulina asociada, dan como resultado un mayor suministro de nutrientes al feto, que pueden contribuir a que presenten hiperinsulinemia compensatoria, aumento de la adiposidad y aumento del riesgo cardio-metabólico de por vida (Stirrat & Reynolds 2014).

Por otra parte, estudios en rumiantes sobre la sobrenutrición materna, demostraron que las crías machos de dichas madres, presentaron respuestas específicas de diferentes órganos como ser: páncreas, músculo esquelético, tejido adiposo e intestinos, lo que resulta en una reducción de la sensibilidad a la insulina, aumento de la adipogénesis y alteración del crecimiento y el rendimiento de la canal (McCoski et al. 2021).

En el caso de las ratas, se ha determinado que dietas ricas en grasas durante la gestación y la lactancia aumentan la probabilidad de que las crías machos presenten mayor peso corporal, así como hiperglucemia e hiperinsulinemia (Howie et al. 2009, Howie et al. 2013). Así mismo, existe evidencia de que la obesidad materna en ratas y la sobrenutrición durante la gestación y la lactancia tienen consecuencias para el metabolismo de la descendencia, la función cardiovascular y endocrina (Rodríguez-González et al. 2015).

Sobrenutrición materna y las alteraciones a nivel testicular en las crías

La obesidad materna durante la gestación en humanos, se ha asociado con un mayor peso al nacer de su descendencia masculina, lo que representa un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de próstata y cáncer testicular, más adelante en la vida adulta (Coghe et al. 2022).

Se han estudiado muchos modelos experimentales en animales que sugieren que la obesidad materna afecta la función reproductiva en la descendencia masculina. Es así que en estudios en ratones se produce una disminución de la testosterona a las 11 semanas de vida, y por tanto una mayor predisposición a la infertilidad en los machos, cuando sus madres recibieron una dieta alta en grasas y azúcares durante la gestación. Además, dicha exposición en el útero a una dieta alta en grasas y azúcares redujo el recuento de espermatozoides en las crías macho a las 31 semanas de edad (Mao et al. 2018).

Asimismo, las crías macho adultas de ratas cuyas madres consumieron un alto contenido calórico durante la gestación y la lactancia presentaron reducción en los niveles plasmáticos de testosterona, así como un comportamiento sexual alterado en comparación con el grupo control. En cuanto al conteo general de espermatozoides fue reducido, con una disminución en las espermátidas redondas y alargadas. Además, la calidad del semen también se vio afectada, ya que la viabilidad y motilidad de los espermatozoides se redujo y el número de espermatozoides que presentaron estrés oxidativo alterado se incrementó, lo que resultó en una disminución de las tasas de fertilidad en la edad adulta (Jazwiec & Sloboda 2019). Otro estudio en ratas, de madres alimentadas con una dietarica en grasas y azúcares, mostró que sus crías machos presentaron conteo de espermatozoides y producción diaria de los mismos reducida por el efecto materno (Sertorio et al. 2022). Otros autores coinciden en sus estudios, al informar que, en ratas las dietas altas en grasas afectan el desarrollo sexual de las crías machos reduciendo la

cantidad de células germinales y somáticas, reduciendo la motilidad de los espermatozoides y alterando la morfología de los espermatozoides y del tejido testicular. Estos resultados sugieren que el sobrepeso materno afecta severamente la capacidad reproductiva de la descendencia masculina, lo que probablemente conduce a una condición de subfertilidad y una reducción prematura de la vida reproductiva (Galarza et al. 2019).

Sobrenutrición materna y apoptosis testicular en las crías

La programación por sobrenutrición se relaciona con la apoptosis. Se observó en un estudio en ratones con madres obesas en la etapa de gestación y lactancia, que la cantidad de caspasa-3 activa y la expresión del ARNm, aumentaron en las crías macho en el tejido pancreático, mientras que no hubo diferencias en la expresión de Bax y Bcl-2 (Nicholas et al. 2020). Mientras que, en un estudio en ratones, cuyas madres fueron alimentadas con una dieta rica en grasas y azúcares, la apoptosis disminuyó en el tejido testicular en los animales a las 11 semanas de vida (Mao et al. 2018). Asimismo, en estudios en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas, aparecieron niveles más bajos de caspasa-3 en el tejido testicular de las crías macho, en comparación con el grupo de crías cuyas madres recibieron una dieta estándar (Meneghini et al. 2022).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El vínculo entre la nutrición y la reproducción es un tema de gran impacto en veterinaria, así como en medicina humana. Numerosos estudios han vinculado aspectos para comprender los efectos de la nutrición sobre la reproducción con implicancias para el rendimiento reproductivo. Tanto la subnutrición como la sobrenutrición generan consecuencias negativas para la progeñe.

La sobrenutrición materna con dietas hipercalóricas aumenta los riesgos de obesidad y envejecimiento prematuro de la capacidad reproductiva en la progeñe tanto en humanos como en modelos animales.

Estudios recientes han demostrado efectos de la subnutrición materna sobre el desarrollo de los testículos en el feto. En este sentido, hemos demostrado que la subnutrición materna afecta la espermatogéñesis en la descendencia adulta con cambios en los factores de transcripción y crecimiento en las células de Sertoli y alteración en la regulación de la apoptosis y proliferación celular. La subnutrición materna en la etapa de gestación y lactancia aumentó la expresión de los factores IGF-I, ETV5, y disminuyó el factor GDNF. Asimismo, las proteínas apoptóticas caspasa-3, y Bcl-2 aumentaron en las crías adultas de madres subnutridas, así como el marcador de proliferación celular Ki-67 (Pedrana et al, 2020; Pedrana et al. 2021).

Este trabajo busca dilucidar las consecuencias reproductivas que se presentan en la descendencia adulta a nivel testicular en animales cuyas madres fueron alimentadas con una dieta hipercalórica durante la gestación y la lactancia. Estos datos permitirán saber cómo influye la programación fetal por sobrenutrición, en qué momento se observan cambios a nivel de los factores de transcripción y crecimiento, factores apoptóticos y de proliferación celular. Y cómo dichos parámetros pueden afectar la futura fertilidad del animal en la vida adulta.

4. HIPÓTESIS

La sobrenutrición materna durante la gestación y lactancia aumenta y la expresión de los factores de transcripción, de crecimiento, apoptóticos y de proliferación celular, en el testículo de las crías ratas adultas.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar las consecuencias de la programación fetal por sobrenutrición materna en ratas durante la gestación y la lactancia determinando efectos sobre el testículo de las crías adultas.

Objetivos específicos:

- Determinar cambios en los parámetros fisiológicos: peso al nacimiento, edad y peso a la pubertad, peso corporal adulto
- Determinar cambios en los parámetros metabólicos: androstenediona y testosterona.
- Determinar cambios morfológicos a nivel testicular: peso testicular del animal adulto, peso testicular relativo e índice gonadosomático, diámetro de túbulos seminíferos, número de células de Sertoli, número de espermatogonias en proliferación.
- Determinar la inmunexpresión testicular de los factores de transcripción (ETV5, GDNF) en las crías adultas.
- Determinar la inmunexpresión testicular del factor de crecimiento (IGF-I) en las crías adultas.
- Determinar la inmunexpresión a nivel testicular de las proteínas apoptóticas (caspasa-3, Bax y Bcl-2) en la descendencia adulta.
- Determinar la expresión de los transcritos (ARNm) de caspasa-3, Bax y Bcl-2.

6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo estudió el efecto de una dieta materna hipercalórica sobre la expresión de los factores de transcripción, crecimiento, apoptóticos y de proliferación celular en el testículo de las crías macho adultas. Se utilizó un diseño experimental con un modelo en ratas, donde se implementó una dieta materna hipercalórica durante la gestación y la lactancia, mientras que a otro grupo se le administró por el mismo período de tiempo una dieta control o estándar. Todo el trabajo con animales fue aprobado bajo las directrices del Comité de Ética Animal de la Universidad de Auckland (R402). En el presente estudio, se utilizó un modelo establecido de programación fetal, basado en la manipulación de la nutrición materna (Howie et al. 2012).

Para comprender los efectos de la dieta materna hipercalórica sobre la morfología testicular, los parámetros fisiológicos, metabólicos, factores de transcripción, crecimiento, procesos de apoptosis y proliferación celular se evaluaron parámetros fisiológicos, morfométricos y la inmunoexpresión de ETV5, GDNF, IGF-I, caspasa-3, Bax, Bcl-2 y Ki-67 mediante inmunohistoquímica. Además de los ARNm de caspasa-3, Bax y Bcl-2 por la técnica de qPCR y los parámetros metabólicos con un Kits de ELISA. Los testículos de las crías macho fueron muestreados a los 160 días de vida y se obtuvieron los testículos de los animales adultos a partir de los cuales se realizaron los análisis morfométricos e inmunohistoquímicos.

Etapas 1: tareas de microtomía de bloques de parafina de los dos grupos de estudio, coloración con técnica de rutina Hematoxilina-Eosina para morfometría, realizando la medición del diámetro de los túbulos seminíferos, el número de células de Sertoli.

Etapas 2: ensayos con kits de ELISA, donde se analizarán las muestras de plasma de las crías macho para los parámetros metabólicos androstenediona y testosterona.

Etapas 3: ensayos con la técnica de inmunohistoquímica para semi-cuantificar la inmunoexpresión de los factores de transcripción (ETV5 y GDNF), el factor de crecimiento (IGF-I), las proteínas apoptóticas (caspasa-3, Bax y Bcl-2) y realizar el conteo de espermatogonias en proliferación positivas a Ki-67.

Etapas 4: ensayos con la técnica de qPCR para cuantificar la expresión de los ARNm de caspasa-3, Bax y Bcl-2.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Animales y Diseño experimental

Todo el diseño experimental fue aprobado bajo las pautas del Comité de Ética Animal de la Universidad de Auckland (R402). Se utilizó un modelo establecido de programación fetal basado en la manipulación de la nutrición materna (Howie et al. 2012).

Se obtuvieron ratas Wistar hembra de 120 días de edad (n=10) de la Unidad Vernon Jansen de la Universidad de Auckland, donde se desarrolló el modelo animal. Se realizó el apareamiento luego del monitoreo del ciclo estral de rata para control del estro. Todas las mediciones de impedancia vaginal se realizaron con el Monitor de ciclo estral (EC40 Fine Science Tools, Foster City, CA, USA). El control del estro se realizó mediante el verificador de impedancia vaginal de ratas diseñado para obtener información precisa para determinar el día óptimo para el apareamiento durante el ciclo estral de las ratas (Chesney et al. 2020). Dicho instrumento mide las diferencias en la resistencia eléctrica en la vagina de la rata durante el ciclo ovárico, la resistencia eléctrica inherente de la pared vaginal de la rata aumenta notablemente cerca del comienzo del estro y luego vuelve a caer a niveles bajos durante el resto del ciclo ovárico (Ramos et al. 2001). Un valor ≥ 3 kiloohmios (k Ω) indica proestro mientras que las otras 3 etapas del ciclo tienen valores inferiores a 3 k Ω . El rango de medición es de 0 a 19,9 kiloohmios (Chesney et al. 2020).

<https://stoeltingco.com/Neuroscience/Electronic-Vaginal-Estrous-Cycle-Monitor--Rat~9773>

Las medidas de impedancia reflejan los cambios que ocurren naturalmente en la resistencia eléctrica de la mucosa vaginal durante las diferentes etapas del ciclo. Un solo individuo puede realizar mediciones en segundos sin necesidad de una interpretación subjetiva de los resultados.

Luego del apareamiento las ratas fueron alojadas individualmente en jaulas estándar para ratas en la misma habitación, con libre acceso al agua, a una temperatura constante de 25°C y un ciclo de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad. Las madres preñadas se asignaron aleatoriamente a dos grupos dietéticos (5 por grupo).

(1) **Grupo Control:** donde las madres fueron alimentadas con una dieta estándar *ad libitum* durante la gestación y la lactancia (grasa 6.2 %, proteína 18,6 % ; carbohidratos 44,2%; energía digestible 3,1 Kcal/g, calorías (%) Kcals/g de grasa 18%, de proteína 24%, de carbohidratos 58%, Teklad Global Dieta Proteica, Dieta 2018), <https://insights.envigo.com/hubfs/resources/data-sheets/2018-datasheet-0915.pdf> (Tabla 1).

(2) **Grupo Sobrenutrido:** donde las madres fueron alimentadas con una dieta alta en grasas *ad libitum* durante la gestación y lactancia (grasa 24 %, proteína 24%; carbohidratos 41%; energía digestible 4,73 Kcal/g, calorías (%) Kcals/g de grasa 45%, proteínas 20 %, carbohidratos 35%. D12451, Research Diets, Inc New Brunswick, NJ, USA) <http://67.20.83.195/china/pdf/Data%20Sheets/D12451.pdf> (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de las dietas maternas y de las crías, utilizadas en el experimento. Dieta estándar para el (grupo Control) Teklad Global 18% protein Rodent Diet y Dieta hipercalórica (grupo Sobrenutrido) D 12451.

Formulación de la ración	Dieta estándar (grupo Control) Teklad Global 18% protein Rodent Diet	Dieta hipercalórica (grupo Sobrenutrido) D12451
Proteína cruda %	18,6	24
Lípidos %	6,2	24
Carbohidratos %	44,2	41
Densidad energética Kcal/g (kJ/g)	3,1 (13)	4,73
Calorías en proteínas %	28	20
Calorías en lípidos %	18	45
Calorías en carbohidratos %	58	35

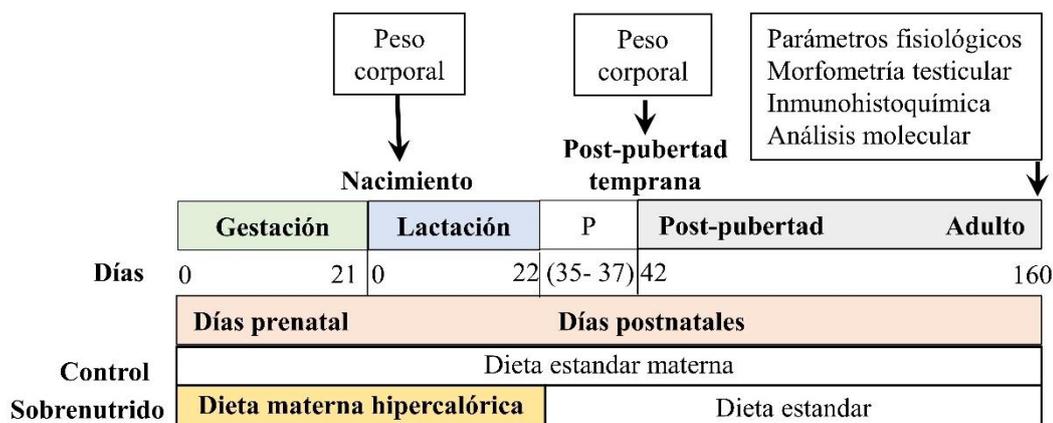


Figura 10. Representación esquemática del diseño experimental. Se utilizaron dos niveles de nutrición materna (Control y Sobrenutrido) durante la gestación (DG) 0-21, y para la lactancia, desde el nacimiento (día 21 prenatal) hasta el destete en el día (22 postnatal). Después del destete, todas las crías fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta estándar hasta el final del estudio (día 160) cuando se tomaron las muestras de sangre y de los testículos. Se observó la pubertad (P) entre los días 35 y 37.

Al término de la gestación las crías que nacieron se pesaron y se ajustó el tamaño de la camada para garantizar la estandarización de la nutrición hasta el día del destete (22 días posparto). Después del destete, las crías machos se alojaron de a dos y se alimentaron con la dieta estándar

ad libitum hasta el final del estudio (160 días). A partir del día 27 posnatal, las crías fueron pesadas y chequeadas diariamente en busca de marcadores de madurez reproductiva, como es la separación balano-prepucial en machos, para determinar el inicio de la pubertad (Lewis et al. 2002; Yoshimura et al. 2005). Se registró el peso corporal en la etapa de post-pubertad al día 42 postparto y en la edad adulta a los 160 días de nacido (Figura 7).

7.2 Extracción de sangre y ensayos hormonales

En el día 160 postnatal, las crías machos (n = 20; 10 por grupo dietético) se mantuvieron en ayuno durante toda la noche, se pesaron, se anestesiaron con pentobarbital (60 mg kg⁻¹ip) y se realizó la extracción de sangre de la vena de la cola (Vickers et al. 2011) la cual se colocó en tubos con heparina, luego se centrifugó a (2400 × g, 20 min) obteniendo el plasma, el cual se almacenó a -20 °C para estudios hormonales.

Las muestras de plasma de las crías macho se analizaron mediante kits de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) para androstenediona y testosterona (Biocode Hycel AER004; Immunodiagnostic Systems, Boldon Colliery, UK) androstenediona (A4 DSL-4200, Beckman Coulter) y testosterona total (TT; DSL4100, Beckman), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se analizaron por duplicado. El límite inferior de sensibilidad del ensayo de testosterona total fue de 347 pmol/L. Los coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo para un control de una concentración 1 nmol/L fueron de 6% y 15% respectivamente. Se calcularon las concentraciones de testosterona libre (cFT) a partir de la testosterona total medida.

7.3 Muestreo de testículos y procesamiento histológico

Inmediatamente después de la extracción de sangre los animales fueron sacrificados por decapitación. Los testículos fueron obtenidos mediante disección retirando la piel del escroto y la túnica vaginal y pesados. Los datos de peso (g) se utilizaron para calcular el peso relativo de los testículos (peso de los testículos sobre el peso corporal del animal) y, por lo tanto, el índice gonadosomático se calculó mediante (el peso relativo de los testículos x 100).

Los testículos izquierdos fueron congelados y almacenados en nitrógeno líquido a -80 °C para análisis moleculares. Los testículos derechos fueron fijados por inmersión en formaldehído bufferado al 4 % (formaldehído 37% 100 ml, agua destilada 900 ml, fosfato de sodio monobásico 4 g, fosfato de sodio dibásico anhidro 6,5 g) pH 7,2 durante 24 h, para luego realizar estudios histológicos y de inmunohistoquímica. Los testículos que fueron fijados en formaldehído luego se deshidrataron por inmersión en concentraciones crecientes de etanol (70%, 95% y 100%), se sumergieron en cloroformo por 24 horas, y luego se impregnaron en tres baños sucesivos de parafina líquida a 58-60°C por 45 minutos cada uno (Historesin; Leica, Germany) para la confección de bloques. Se realizaron los cortes histológicos a 5 µm con un micrótopo (Leica 149 Reichert Jung Biocut 2030, Wetzlar, Germany) para su posterior coloración con Hematoxilina-eosina y ensayos de inmunohistoquímica.

7.4 Técnica de Hematoxilina y Eosina

Se realizó la coloración de hematoxilina-eosina de rutina, en los cortes de testículos de rata. En primera instancia las láminas histológicas se colocaron en xilol para el desparafinado, luego se realizó la hidratación sumergiendo las láminas en graduaciones decrecientes de etanol (100%, 95% y 70%) y luego en agua destilada. Posteriormente se sumergieron en Hematoxilina de Mayer por 2 minutos, realizando el virado en agua corriente por 5 minutos. Luego se sumergieron en colorante eosina por 1 minuto. Las láminas fueron lavadas y luego colocadas en sucesivos baños con graduaciones crecientes de etanol (70%, 95% y 100%) para su deshidratación. Posteriormente los cortes fueron montados colocando el cubreobjetos con bálsamo de montaje (Entellan®, Merck Darmstadt, Germany).

7.5 Inmunohistoquímica

Los cortes histológicos de testículo fueron procesados para la detección de la inmunoexpresión de los factores de transcripción ETV5, GDNF, de crecimiento IGF-I, proteínas apoptóticas caspasa-3, Bax, Bcl-2, el marcador de proliferación celular Ki-67. Se utilizó el protocolo de estreptavidina-biotina-peroxidasa, descrito anteriormente por Pedrana et al. 2021. Se procedió al desparafinado de las secciones histológicas por calor a 60°C durante 15 minutos en estufa (TH 030 A, Dry oven/incubator, Labotec Group) y luego se colocaron en 300 ml de solución de buffer citrato 0,01M (citrato de sodio 29,4 g, agua destilada 1000 ml) (pH 6, 0) con 5 mL de Tween 20, durante 5 minutos en el microondas a máxima potencia (potencia: 100%, 800 Watts) como tratamiento previo de desparafinado, recuperación de antígenos y rehidratación. Mediante este proceso de recuperación antigénica inducida por calor, se exponen los epítopes de los sitios antigénicos y se rompen los enlaces cruzados de las proteínas formados por el proceso de fijación de formaldehído y de este modo se desenmascaran los sitios antigénicos ocultos. Luego se procede al enfriado con agua destilada, y buffer fosfato salino PBS (fosfato de sodio dibásico anhidro 11,4g, fosfato de sodio monobásico monohidrato 2,54 g, agua destilada 1000 ml, cloruro de sodio 8 g) a pH 7,4. La inactivación de las peroxidasas endógenas del tejido se realizó mediante la colocación de una solución de peróxido de hidrógeno al 3% por 20 minutos. Inmediatamente después las láminas se lavaron en solución de PBS y luego se bloquearon las uniones inespecíficas con suero normal de rata. Posteriormente, las secciones se incubaron durante toda la noche (18 horas a 4 ° C) en una cámara húmeda, para cada anticuerpo estudiado (Tabla 2)

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en el análisis inmunohistoquímico en testículos de ratas adultas.

Proteína	Anticuerpo	Especie	Clona	Nº Catálogo y origen	Concentración
ETV5	Anti- ETV5	Conejo	Policlonal IgG	Ab 102010, Abcam, USA	1:100
GDNF	Anti- GDNF	Conejo	Policlonal IgG	Ab 18956, Abcam, USA	1:200
IGF-I	Anti- IGF-I	Conejo	Policlonal IgG	Ab 9572, Abcam, USA	4µg/ml
caspasa-3	Anti- caspasa-3 activa	Conejo	Policlonal IgG	AF 835 R&D Systems	5µg/ml
Bax	Anti- Bax	Conejo	Monoclonal IgG Clona E63	Ab 32503, Abcam, USA	1:200
Bcl-2	Anti- Bcl-2	Conejo	Policlonal IgG	Ab 7973, Abcam, USA	1:200
Ki-67	Anti- Ki-67	Conejo	Monoclonal SP6 IgG	Ab 16667, Abcam, USA	1:200

Al otro día, las secciones histológicas se incubaron durante 30 min con el anticuerpo secundario biotinilado (Kit Rabbit Specific HRP/DAB-ABC-Detection IHC, ab 64261; Abcam, Eugene, OR, USA). Luego, los cortes histológicos se incubaron con el complejo enzimático estreptavidina-peroxidasa durante 30 min. Para la visualización del antígeno las láminas se incubaron con una solución cromógena de diaminobencidina (DAB) (1,5 ml de peróxido de hidrógeno + 30 µl de DAB) durante 5 min. Posteriormente las secciones se contrastaron con hematoxilina de Mayer, se deshidrataron por inmersión en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 95% y 70%) y se montaron con (Entellan®, Merck Darmstadt, Germany) con cubreobjetos de vidrio. Todos los ensayos contenían un control negativo de la técnica de inmunohistoquímica utilizando diferentes secciones testiculares incubadas con suero de rata diluido 1:100 en PBS.

7.6 Análisis de imágenes de morfometría

Los preparados de testículo coloreados con hematoxilina-eosina fueron analizados por morfometría. Las imágenes digitales se obtuvieron utilizando un microscopio óptico (Olympus CX23, Olympus Scientific Solutions Americas Corp MA 02453, USA.) conectado a una cámara digital (Dino-Eyepiece Edge, AM-7025X) y luego se capturaron con el software DinoCapture 2.0 (<https://www.dinolite.us/es/features/dinocapture/>). Los diámetros de los

túbulos seminíferos se midieron en 50 cortes transversales por medio de dos diámetros a una magnificación final de 100 aumentos. Por otra parte, se realizó el conteo de las células de Sertoli en 50 cortes transversales de túbulos seminíferos con un aumento final de 400 aumentos. Se contaron únicamente las células cuyos núcleos se podían identificar.

7.7 Análisis de imágenes de inmunohistoquímica

Las imágenes digitales se obtuvieron utilizando un microscopio óptico (Olympus CX23, Olympus Scientific Solutions Americas Corp MA 02453, USA.) conectado a una cámara digital (Dino-Eyepiece Edge, AM-7025X) y luego se capturaron con el software DinoCapture 2.0 (<https://www.dinolite.us/es/features/dinocapture/>). Se analizaron las imágenes de inmunohistoquímica de los testículos de ratas que muestran el área inmunomarcada para ETV5, GDNF, IGF-I, caspasa-3, Bax, Bcl-2, que se analizaron con el software ImageJ (versión 1.53, 6 de mayo de 2018; Wayne Rasband, NIH, EE. UU.; [http://rsb.info.nih.gov/ij.](http://rsb.info.nih.gov/ij/)).

7.8 Cuantificación de área inmunomarcada

Las áreas inmunomarcadas se midieron utilizando una macro que incluía el umbral de color de las imágenes RGB y la conversión a imágenes binarias. Los valores del umbral se verificaron y normalizaron con controles llevados a cabo en varias corridas para la calibración. Este proceso proporcionó valores cuantitativos para el porcentaje (%) de área inmunomarcada en 1000 imágenes digitales para cada testículo, por animal y por inmunohistoquímica.

7.9 Conteo de células espermatogonias Ki-67 positivas

El conteo del número de espermatogonias Ki-67 positivas se realizó en 50 cortes transversales de túbulos seminíferos a una magnificación de 400 aumentos. Dicho conteo se realizó de forma manual, con el cell counter plugin del software ImageJ (versión 1.52b, 6 de mayo de 2018; Wayne Rasband, NIH, EE. UU.; [http://rsb.info.nih.gov/ij.](http://rsb.info.nih.gov/ij/)).

7.10 Análisis de expresión génica por qPCR

El ARN total se extrajo utilizando el kit (mini kit AllPrep DNA/RNA; cat 80204; Qiagen, Germantown, MD 20874, USA). El ADN genómico se eliminó de cada muestra mediante tratamiento con ADNasa libre de ARNasa (Invitrogen Life Technologies, Auckland, New Zealand) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad y la pureza del ARN se analizaron con un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000; BioLab Ltd San Diego, CA, USA) y el software NanoDrop (versión 3.1.2). Todas las muestras de ARN se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. Para la síntesis de ADNc de primera cadena, se utilizaron 5 mg de ARN total con transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV-RT; Promega Corp., Madison, WI, USA.) y un termociclador estándar (GeneAmp® PCR System 9700; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Posteriormente se preparó una mezcla que contenía 5 mL M-MLV 5x (cat. M531A; In Vitro Technologies, Madison, WI, USA), 0,5 mL de M-MLV-RT (cat. M170B; In Vitro Technologies) y 1,25 mL 10 mM de desoxinucleósido trifosfato (cat. R0181; Global Science.). Se utilizó las siguientes condiciones de ciclado: una

etapa inicial de desnaturalización de 5 min a 96 °C seguida de 30 ciclos (30s cada uno) de 96 °C (etapa de desnaturalización), 60 °C (etapa de alineamiento) y 72 °C (etapa de extensión). El cDNA se almacenó a -20 °C hasta el ensayo cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR). La expresión génica testicular para caspasa-3, Bax y Bcl-2 y la referencia endógena (β -actina) fue medida mediante qPCR utilizando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7900HT (Applied Biosystems, NZ). Todos los primers fueron diseñados utilizando el software Primer 3 (versión 0.4.0, Whitehead Institute for Biomedical Research, <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) fabricado por Invitrogen (Invitrogen Life Technologies). Los controles del conjunto de primers eran para β -actina (Tabla 3). Las condiciones óptimas de los primers se ajustaron a las condiciones del ciclador: longitud 20 pb (rango 17–23 pb); T_m 63°C (rango 60–65°C); longitud del amplicón 100–300 pb. Se realizaron análisis de disociación para garantizar la especificidad y solo se usaron muestras que producían un solo pico en las curvas de disociación. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa usando el E-Gel® CloneWell 0.8 % SYBR Safe gel (cat. G6618-08; Invitrogen, Burlington, ONT, Canadá), se corrieron en el E-Gel® iBase™ Power System (cat. G6400; Invitrogen, California, USA) y se secuenciaron por espectrofotometría (Allan Wilson Centre, Massey, University, NZ). Las secuencias resultantes se evaluaron utilizando el NCBI BLAST para garantizar la especificidad. Los niveles de transcritos se cuantificaron mediante qPCR utilizando las siguientes condiciones: un período inicial de 2 min a 50 °C para la normalización (Etapa 1), seguido de una activación enzimática a 95 °C durante 2 min (Etapa 2); una amplificación del producto génico a través de 40 ciclos sucesivos de 95°C por 15 s y luego a 60°C por 1 min (Etapa 3); seguido de una etapa de disociación de 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 2 min a 99 °C (Etapa 4). Se generó una curva estándar a partir del umbral de ciclo medio (Ct) de ocho estándares (dilución serial 1:5) de una concentración conocida por triplicado y se generaron curvas de amplificación y disociación para todos los estándares y muestras (Applied Biosystems, California, USA). Cada muestra se analizó por triplicado. Los niveles de expresión se normalizaron a la cantidad de actina β y los datos se analizaron utilizando $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 3. Primers utilizados para evaluar la expresión génica en testículos de rata mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

ARNm	Primers	Primers reverso	Largo Amplicón (pb)	Referencia de secuencia NCBI
caspasa-3	GAGCTTG	TCCACGGA	59	NM_012922.2
	GAACGCG	GGTTTCGT		
	AAGAAA	TGT		
Bax	TGACGGC	GCAGCCGA	143	NM_017059.2
	AACTTCA	TCTCGAAG		
	ACTGGG	GAA		
Bcl-2	GGATCCA	ATGCACCC	141	NM_016993.1
	GGATAAC	AGAGTGAT		
	GGAGGC	GCAG		
β actina	CACCAAC	CAGCCTGG	188	NM_031144
	TGGGACG	ATGGCTAC		
	ATATGGA	GTACAT		

7.11 Análisis estadístico

En este trabajo la madre fue utilizada como réplica biológica. Las crías de dichas madres derivadas de las distintas camadas fueron las que se compararon estadísticamente, no las madres. Se obtuvieron 10 camadas, con 2 machos por camada, obteniendo así 10 machos por cada grupo dietético (2 machos de cada una de las 5 camadas). En cuanto al número de células de Sertoli y espermatogonias son variables de tipo ordinal y discreto, y son grandes por lo que estas variables las tratamos como variables continuas. Todos los datos fueron verificados que presentaran una distribución normal. Para cada variable dependiente, las diferencias entre grupo Control y Sobrenutrido se compararon mediante pruebas t de Student para dos muestras, con el análisis de PROC TTEST y análisis estadístico de ANOVA para SAS (SAS, v. 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.). El nivel de significación fue $P < 0,05$. Para el peso vivo se realizó medidas repetidas en el tiempo, y se analizó con el GLM (modelo lineal generalizado). Todos los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (S.E.M.). Se analizaron las diferencias entre el grupo Control y el grupo Sobrenutrido en los siguientes parámetros fisiológicos: peso al nacer, edad a la pubertad, peso a la pubertad, peso adulto a los 160 días de edad, concentración de androstenediona y testosterona; morfométricos testiculares: peso de los testículos, peso relativo de los testículos, índice gonadosomático, diámetro de túbulos seminíferos, número de célula de Sertoli por corte transversal de túbulo seminífero, número de espermatogonias Ki-67 positivas por corte transversal de túbulo seminífero; inmunexpresión de proteínas testiculares: área inmunomarcada (%) para ETV5, GDNF, IGF-I, caspasa-3, Bax, Bcl-2; expresión génica testicular (ARNm) de caspasa-3, Bax y Bcl-2.

8. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de las crías de ratas machos adultas cuyas madres fueron alimentadas con una dieta hipercalórica durante la gestación y lactancia se describen a continuación.

En primer lugar, se realizó el análisis estadístico de las diferentes variables estudiadas que se muestran organizadas según los siguientes ítems:

1. Parámetros fisiológicos
2. Parámetros morfológicos y morfométricos testiculares
3. Inmunolocalización e inmunoexpresión de los factores de transcripción y crecimiento testiculares
4. Inmunolocalización e inmunoexpresión de proteínas apoptóticas testiculares
5. Expresión de genes apoptóticostesticulares

8.1 Parámetros fisiológicos

Peso corporal al nacimiento, peso corporal y edad a la pubertad, peso corporal adulto

Con respecto al peso corporal al nacimiento se observó que fue menor en los animales que pertenecían al grupo Sobrenutrido en comparación con los animales del grupo Control ($P=0,01$) (Figura 11 a).

Asimismo, para la variable peso corporal a la pubertad se observó que fue menor en los animales del grupo Sobrenutrido con respecto a los animales del grupo Control ($P=0,007$) (Figura 11a).

Sin embargo, la variable peso corporal adulto, fue mayor en los animales a los 160 días de vida del grupo Sobrenutrido frente al grupo de animales Control ($P=0,001$).

En cuanto a la edad de inicio de la pubertad, esta se dio antes en el tiempo en los animales del grupo Sobrenutrido en comparación con los animales del grupo Control ($P=0,008$) (Figura 11b).

Medición de hormonas: androstenediona y testosterona

Con relación a las variables hormonales, androstenediona y testosterona no se registraron diferencias entre el grupo de crías cuyas madres recibieron una dieta hipercalórica con respecto al grupo de crías cuyas madres recibieron una dieta control ($P=0,471$; $P=0,590$) respectivamente (Figura 11 c, d).

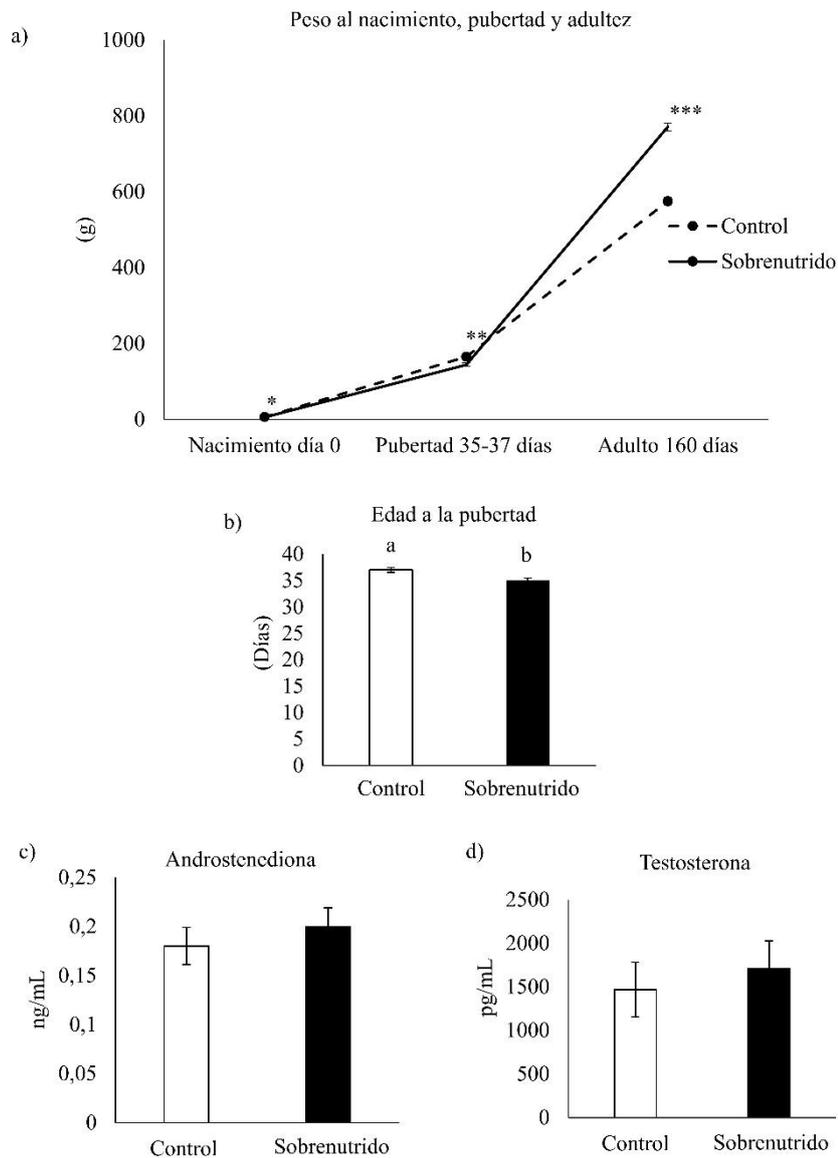


Figura 11. Parámetros fisiológicos de ratas adultas cuyas madres recibieron una dieta hipercalórica (grupo Sobrenutrido) durante la gestación y la lactancia en comparación con el grupo de dieta estándar (grupo Control). a) peso corporal desde el nacimiento, pubertad y a los 160 días de vida. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). b) edad a la pubertad, c) concentración de androstenediona, d) concentración de testosterona. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

8.2 Parámetros morfológicos y morfométricos testiculares

Por lo que corresponde al grupo de animales Control se observó una estructura normal del parénquima testicular, con la presencia de túbulos seminíferos y tejido intersticial característico. Sin embargo, en los túbulos seminíferos de los animales del grupo Sobrenutrido algunas imágenes histológicas muestran alteraciones en sus características morfológicas.

Peso testicular, peso testicular relativo e índice gonadosomático

Para la variable peso testicular no se registraron diferencias entre los animales del grupo Sobrenutrido frente al grupo de animales Control ($P=0,47$) (Figura 12 a). Mientras que para el peso relativo de los testículos y para el índice gonadosomático si hubo diferencias, donde los valores fueron menores para los animales del grupo Sobrenutrido frente al grupo de animales Control ($P= 0,008$; $P=0,008$) respectivamente (Figura 12 b, c).

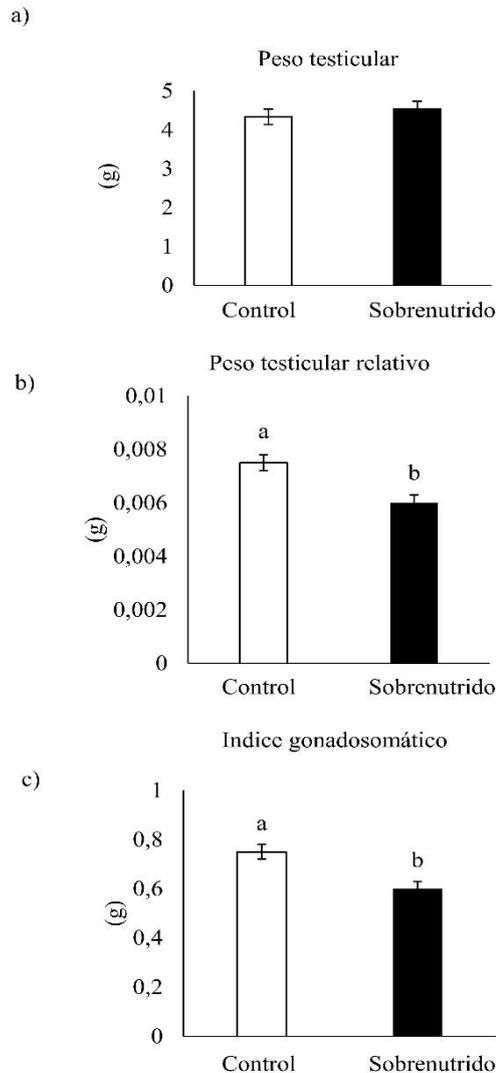


Figura 12. Parámetros morfométricos testiculares de ratas adultas cuyas madres recibieron durante la gestación y lactancia una dieta hipercalórica (grupo Sobrenutrido) en comparación con el grupo de dieta estandar (grupo Control). a) peso testicular a los 160 días de vida. b) peso testicular relativo. c) índice gonadosomático. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Diámetro de túbulos seminíferos

En cuanto al diámetro de los túbulos seminíferos, este fue mayor en los animales del grupo Sobrenutrido con respecto a los animales del grupo Control ($P=0,030$) (Figura 13 A1-3).

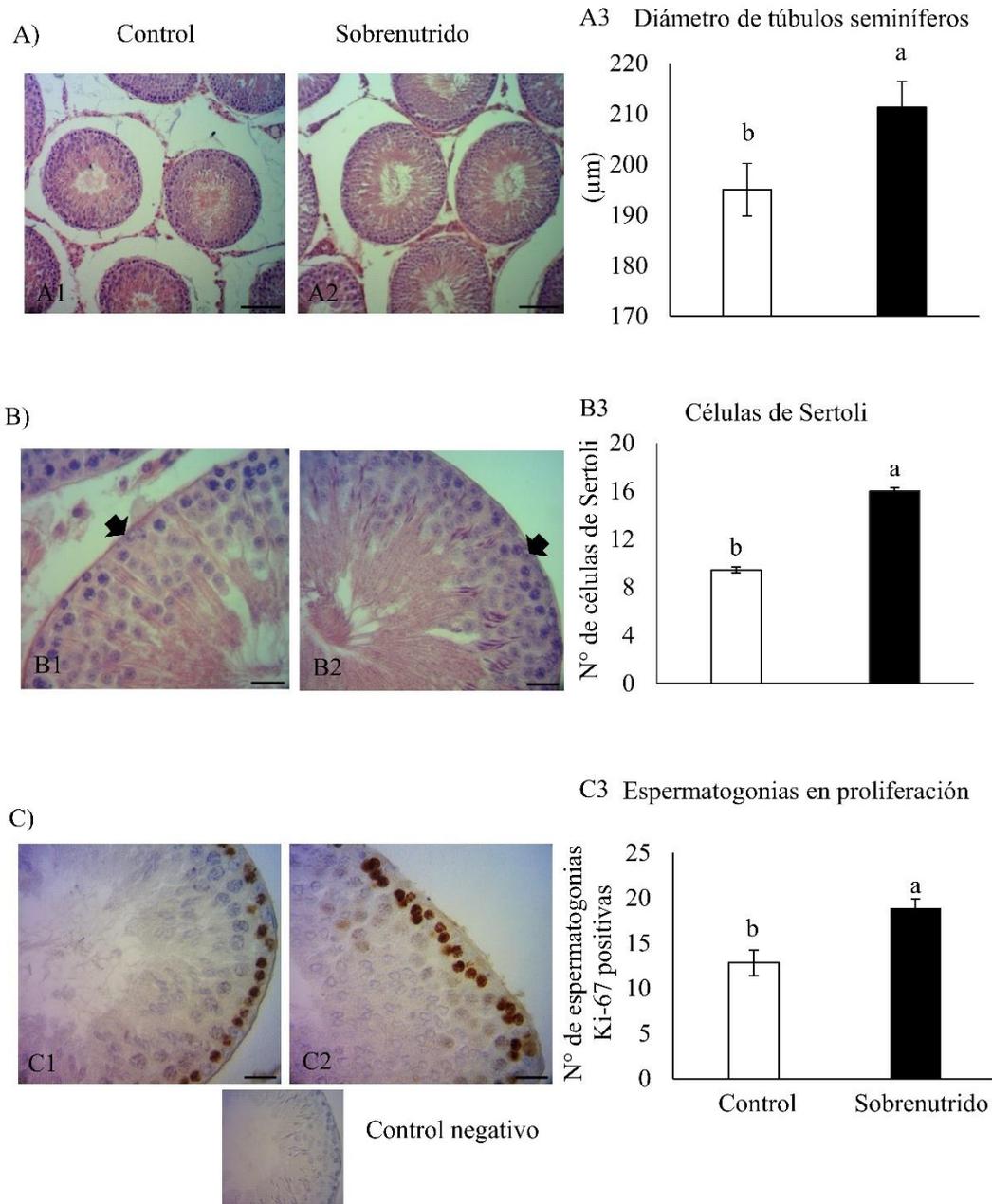


Figura 13. Histología testicular de ratas adultas cuyas madres recibieron durante la gestación y lactancia una dieta hipercalórica (grupo Sobrenutrido) en comparación con el grupo de dieta estandar (grupo Control). A1: imagen de túbulos seminíferos para el grupo Control. A2: imagen de túbulos seminíferos para el grupo Sobrenutrido donde se observa mayor diámetro tubular que en grupo Control. Magnificación 100x; barra de escala 100 μm. A3: Diámetro de túbulos seminíferos (μm). B1-B2: imagen de túbulos seminíferos, Célula de Sertoli (flecha) para el grupo Control y Sobrenutrido. Magnificación 600x; barra de escala 10 μm. B3: Número de células de Sertoli. C1: Inmunolocalización de Ki-67 en espermatogonias para el grupo Control. C2: Inmunolocalización más intensa de Ki-67 en espermatogonias para el grupo Sobrenutrido. Magnificación 100x; barra de escala 20 μm. C3: Número de espermatogonias en proliferación. Control negativo: para la técnica de inmunohistoquímica. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Número de células de Sertoli por corte transversal de túbulo seminífero

Acerca del número de células de Sertoli, la misma fue mayor en el grupo de animales Sobrenutrido comparado con el grupo de animales Control (P= 0,0001) (Figura 13 B1-3).

Número de espermatogonias en proliferación por corte transversal de túbulo seminífero

Por otra parte, la variable número de espermatogonias positivas para el marcador Ki-67 en los túbulos seminíferos de las crías adultas, fue mayor en el grupo de animales Sobrenutrido con respecto al grupo de animales Control (P=0,0006) (Figura 13 C1-3).

Imunolocalización de los factores de transcripción, crecimiento y proteínas apoptóticas testiculares

Tabla 4. Inmunolocalización de los factores de transcripción ETV5 y GDNF, del factor de crecimiento IGF-I, de las proteínas apoptóticas, caspasa-3, Bax y Bcl-2 y del marcador de proliferación celular Ki-67 en el testículo de las crías adultas cuyas madres fueron alimentadas con una dieta hipercalórica durante la gestación y lactancia.

Proteína	Localización					
	Intersticio		Túbulo seminífero			
	Leydig	Sertoli	Gonias	Citos	Tidas redondas	Tidas alargadas
ETV5	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma marcación leve	Citoplasma	Acrosoma intensa marcación	Marcación leve
GDNF	Citoplasma	Citoplasma-moderada marcación	Citoplasma intensa marcación	Citoplasma intensa marcación	Marcación leve	Marcación leve
IGF-I	Citoplasma	Citoplasma-intensa marcación	Citoplasma marcación leve			Marcación leve
Caspasa-3				Citoplasma marcación leve	Acrosoma Intensa marcación	Intensa marcación
Bax		Citoplasma	Citoplasma marcación leve	Citoplasma marcación leve	Marcación leve	Marcación leve
Bcl-2		Citoplasma			Acrosoma intensa marcación	Intensa marcación
Ki-67			Nuclear			

8.3 Inmunoexpresión de proteínas testiculares: factores de transcripción y de crecimiento

ETV5

En consideración al factor de transcripción ETV5, el mismo se localizó en el citoplasma de las espermatogonias, espermatocitos, en la región del acrosoma de las espermátidas redondas y

en las espermatidas alargadas. Asimismo, se observó inmunolocalización en el citoplasma de las células de Sertoli y células de Leydig (Tabla 4). Se destaca la inmunoexpresión en la región del acrosoma de las espermatidas redondas (Figura 14 A1-4).

En cuanto a la cuantificación del porcentaje del área inmunomarcada para el factor de transcripción ETV5 observamos que fue mayor en el grupo de animales Sobrenutrido frente al grupo de animales Control ($P= 0,0001$) (Figura 14 A5).

GDNF

En cuanto a la inmunoexpresión del factor de transcripción GDNF, este se localizó a nivel de las células de la línea germinal en el citoplasma de espermatogonias, espermatoцитos, espermatidas redondas y alargadas. De la misma manera se observó en el citoplasma de las células de Sertoli y células de Leydig (Tabla 4). Se pone de manifiesto una intensa marcación a nivel del citoplasma de espermatogonias y espermatoцитos (Figura 14 B1-4).

Por otra parte, el porcentaje del área inmunomarcada para el factor de transcripción GDNF fue menor en el grupo de animales Sobrenutrido frente al grupo Control ($P= 0,0001$) (Figura 14 B5).

IGF-I

En relación a la inmunoexpresión del factor de crecimiento IGF-I, el mismo se localizó en el citoplasma de espermatogonias, en espermatidas alargadas, y en el citoplasma de las células de Sertoli y células de Leydig (Tabla 4). Se pone en evidencia con mayor inmunoexpresión el citoplasma de las células de Sertoli (Figura 14 C 1-4).

Con relación al porcentaje del área inmunomarcada para el factor de crecimiento IGF-I, fue menor en el grupo de animales Sobrenutrido en comparación con el grupo de animales Control ($P= 0,01$) (Figura 14 C5).

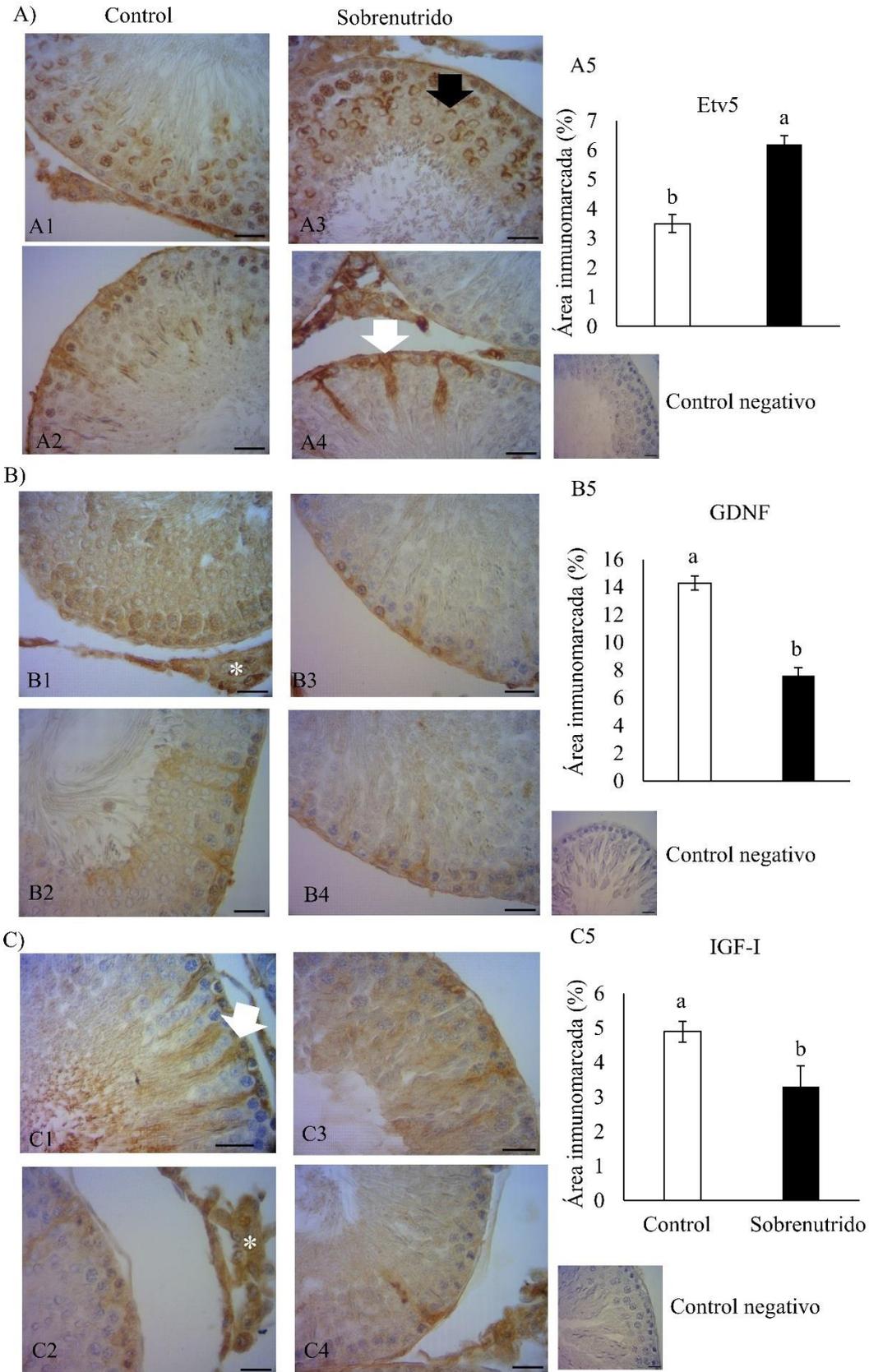


Figura 14. Inmunolocalización e inmunoexpresión de los factores de transcripción y crecimiento en el testículo de ratas cuyas madres fueron alimentadas durante la gestación y

lactancia con una dieta hipercalórica (Sobrenutrido) y una dieta estandar (Control). Inmunolocalización de ETV5, A1-2 grupo Control. A3-4 Grupo Sobrenutrido. Inmunomarcación más evidente en grupo Sobrenutrido en región del acrosoma en espermátidas redondas (flechas negras) y células de Sertoli (flechas blancas). A5: Inmunoexpresión de ETV5, porcentaje de área inmunomarcada (%). Inmunolocalización de GDNF, B1-2 grupo Control. B3-4 grupo Sobrenutrido. Inmunomarcación evidente en espermátides alargadas y células de Leydig (asterisco) con menor intensidad en Sobrenutrido. B5: Inmunoexpresión de GDNF, porcentaje de área inmunomarcada (%). Inmunolocalización de IGF-I, C1-2 grupo Control. C3-4 grupo Sobrenutrido. Inmunomarcación más evidente en el grupo Control en células de Leydig (asterisco) y en células de Sertoli (flecha blanca). C5: Inmunoexpresión de IGF-I, porcentaje de área inmunomarcada (%). Magnificación 100x; barra de escala 20 μ m. Control negativo: para la técnica de inmunohistoquímica. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

8.4 Inmunolocalización e inmunoexpresión de proteínas apoptóticas testiculares

Caspasa-3

Acerca de la inmunolocalización de la proteína apoptótica caspasa-3 activa, la misma se observó en el citoplasma de espermátocitos, espermátidas redondas y alargadas (Tabla 4). Se destaca la inmunoexpresión de la caspasa-3 en el acrosoma y citoplasma de espermátidas redondas y alargadas (Figura 15 A1-4).

Paralelamente, el porcentaje del área inmunomarcada para la proteína caspasa-3 fue mayor en el grupo de animales Sobrenutrido en comparación con el grupo de animales Control ($P = 0,001$) (Figura 15 A5).

Bax

En consideración a la inmunoexpresión de la proteína Bax, la misma se localizó en el citoplasma de espermátogonias, espermátocitos, espermátidas redondas y alargadas. Asimismo, se localizó a nivel del citoplasma de las células de Sertoli (Tabla 4) (Figura 15 B1-4).

Sin embargo, no se registraron diferencias en el porcentaje del área inmunomarcada para la proteína Bax entre el grupo de animales Sobrenutridos y el grupo de animales Control ($P = 0,96$) (Figura 15 B5).

Bcl-2

En cuanto a la proteína Bcl-2, esta se observó a nivel del acrosoma de las espermátidas redondas, espermátidas alargadas. Asimismo, como en el citoplasma de las células de Sertoli (Tabla 4). Se pone en manifiesto una intensa inmunoexpresión de la proteína en el acrosoma de espermátidas redondas y alargadas (Figura 15 C1-4).

Mientras que el porcentaje del área inmunomarcada para Bcl-2 fue mayor en el grupo de animales Sobrenutrido frente al grupo de animales Control ($P = 0,0001$) (Figura 15 C5).

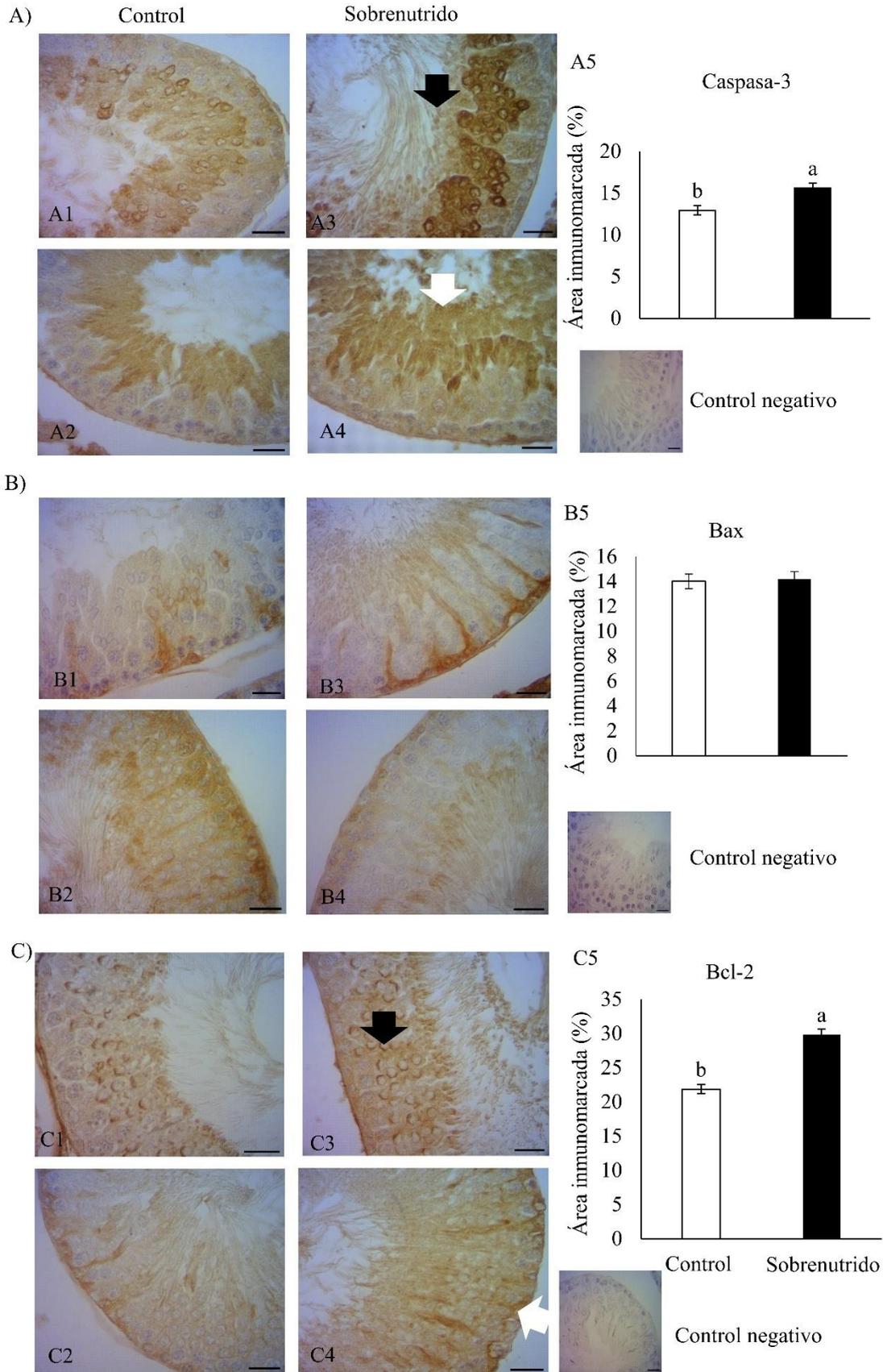


Figura 15. Inmunolocalización e inmunoexpresión de las proteínas apoptóticas en el testículo de ratas cuyas madres fueron alimentadas durante la gestación y lactancia con una

dieta hipercalórica (Sobrenutrido) y una dieta estandar (Control). Inmunolocalización de caspasa-3, A1-2 grupo Control. A3-4 Grupo Sobrenutrido. Inmunomarcación más evidente en grupo Sobrenutrido en espermátidas redondas (flecha negra) y alargadas (flecha blanca) y espermatozoides. A5: Inmunoexpresión de caspasa-3, porcentaje de área inmunomarcada (%). Inmunolocalización de Bax, B1-2 grupo Control. B3-4 grupo Sobrenutrido. Inmunomarcación evidente en espermátogonias y células de Sertoli. B5: Inmunoexpresión de Bax, porcentaje de área inmunomarcada (%). Inmunolocalización de Bcl-2, C1-2 grupo Control. C3-4 grupo Sobrenutrido. Inmunomarcación más evidente en el grupo Sobrenutrido en región del acrosoma en espermátidas redondas (flecha negra) y en células de Sertoli (flecha blanca). C5: Inmunoexpresión de Bcl-2, porcentaje de área inmunomarcada (%). Magnificación 100x; barra de escala 20 μ m. Control negativo: para la técnica de inmunohistoquímica. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

8.5 Expresión de los transcriptos ARNm de caspasa-3, Bax y Bcl-2

Con referencia a los niveles de expresión de ARNm de genes testiculares para las proteínas caspasa-3 y Bax, los mismos no difirieron entre los animales del grupo Sobrenutrido y los del grupo Control ($P = 0,4$; $P = 0,26$) respetivamente (Figura 16 A y B).

La expresión del transcripto ARNm del gen que codifica para Bcl-2 fue menor en el grupo Sobrenutrido frente al grupo Control ($P < 0,01$) (Figura 16 C).

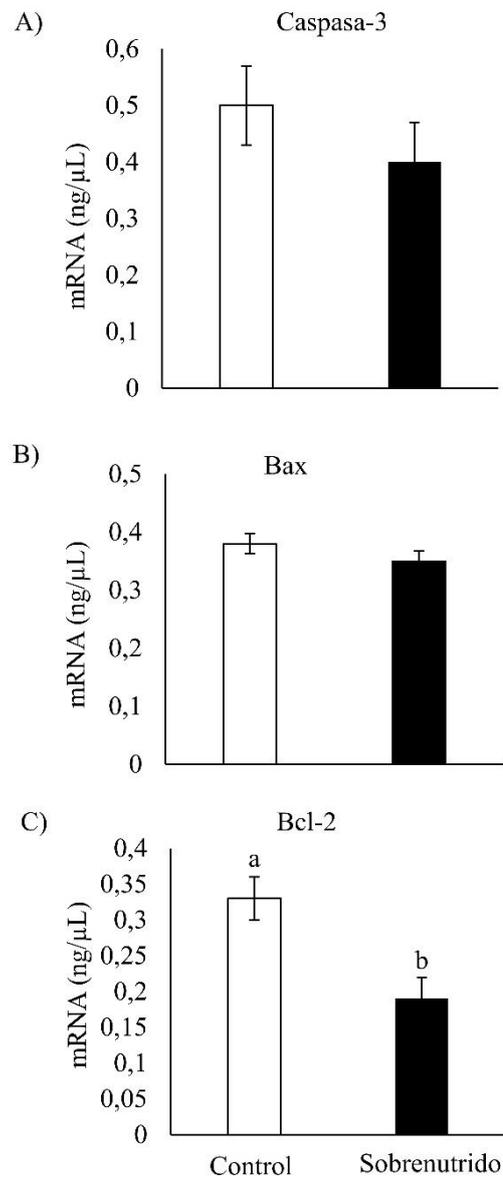


Figura 16. Efecto en el testículo de ratas cuyas madres fueron alimentadas durante la gestación y lactancia con una dieta hipercalórica (Sobrenutrido) y una dieta estandar (Control) en los niveles relativos de ARNm para caspasa-3, Bax y Bcl-2. A) Niveles relativos de ARNm para caspasa-3. B) Niveles relativos de ARNm para Bax. C) Niveles relativos de ARNm para Bcl-2. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

9. DISCUSIÓN

El presente trabajo aportó al conocimiento de los efectos de la dieta materna hipercalórica durante la gestación y lactancia en el testículo de las crías machos adultos, a nivel morfológico, histológico, de las proteínas vinculadas a la proliferación y apoptosis, con consecuentes cambios en la espermatogénesis. En la (Figura 17) se detallan los cambios observados en el presente trabajo.

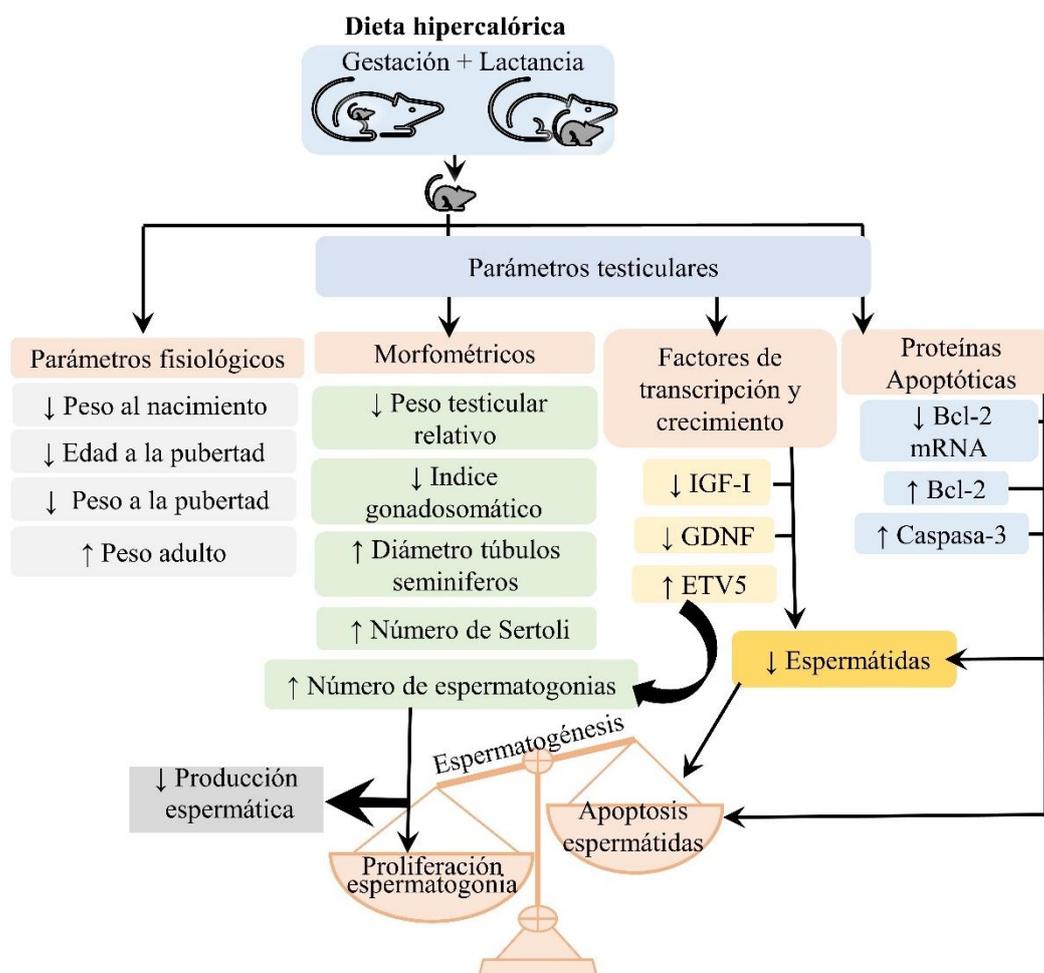


Figura 17. Resumen esquemático de los efectos de la dieta materna hipercalórica sobre los testículos en las crías adultas. Efectos en su crecimiento y parámetros morfológicos, además de factores que afectan la proliferación y apoptosis de células germinales; y las consecuencias para la regulación de la espermatogénesis por parte de las células de Sertoli. Esencialmente, una dieta materna hipercalórica durante la gestación y lactancia conduce a un desequilibrio entre la proliferación y la apoptosis en las células germinales, lo que afecta la cantidad de espermatogonias producidas, con efectos secundarios en la espermiogénesis y la fertilidad.

9.1 Efecto rebote de la sobrenutrición materna en el peso de las crías en la vida adulta

La dieta materna hipercalórica durante el período de gestación y lactancia tuvo consecuencias importantes en las crías machos a los 160 días de vida en los parámetros fisiológicos. Se observó un 13% menos de peso al nacimiento y un 14% menos de peso en la pubertad en las crías de

madres sobrenutridas, en cuanto al peso corporal en el animal adulto este aumentó un 26%, en la descendencia de madres sobrenutridas. Por lo tanto, esto evidencia un efecto rebote del peso corporal en el animal a los 160 días de vida.

Por otro lado, se observaron resultados similares en modelos de subnutrición materna en las crías machos con disminución de la edad y el peso a la pubertad, sin embargo, difiere en cuanto al peso corporal adulto que disminuyó en la subnutrición materna (Pedrana et al. 2020).

Los datos obtenidos en el presente trabajo coinciden con estudios previos en ratas en el que las madres recibieron una dieta alta en grasas durante la gestación y donde las crías machos presentaron una disminución del peso corporal al nacimiento de un 11% (Christante et al. 2013). Efectos similares se observaron en las crías machos de ratas a las que se les administró una dieta de “cafetería” durante el período de gestación y lactancia, con efectos significativos sobre el peso corporal de la descendencia en la edad temprana, observándose que dichas crías macho tenían una disminución del peso al nacimiento de un 7%. Y en cuanto al peso corporal de las crías según Tajaddini et al. (2022) este parámetro estuvo aumentado a los 98 días de vida en un 6%, datos similares a los recabados por nuestro trabajo. Asimismo, otros estudios realizados en modelos de ratas cuyas madres fueron alimentadas con una dieta alta en grasas durante la gestación y lactancia, sus crías machos evidenciaron un aumento en el peso corporal a los 168 días de vida (Desai et al. 2014). De la misma manera, estudios previos evidenciaron un aumento del peso corporal del 26% en las crías de ratas que se alimentaron con una dieta hipercalórica a los 100 días de vida, en comparación con las crías cuyas madres recibieron una dieta control, lo que coincide con nuestros resultados del presente estudio (Navya& Yajurvedi 2017).

Por otra parte, en estudios de obesidad materna en ratas, se observó que en las crías macho de ratas el índice HOMA-IR (índice de resistencia a la insulina) estaba aumentado, desarrollando los animales una obesidad hipertrófica con adipocitos más grandes (Rodríguez et al. 2023).

A su vez, según lo expresado por (Kolb et al. 2018) en un estudio en ratones, se sabe que la hiperinsulinemia provoca un aumento del peso corporal debido a su propia actividad fisiológica, promoviendo la lipogénesis e inhibiendo la lipólisis. Por lo tanto, el aumento del peso corporal adulto en las crías de madres sobrenutridas en el presente trabajo puede deberse a los niveles de insulina elevados.

9.2 Efecto de la sobrenutrición materna en el incremento del factor ETV5 y el peso corporal adulto

En nuestro trabajo en ratas cuyas madres fueron alimentadas con una dieta hipercalórica en gestación y lactancia, observamos un aumento del factor de transcripción ETV5 a nivel testicular y un aumento del peso corporal adulto en las crías a los 160 días de vida.

Asimismo, en estudios de subnutrición materna, se observó que el factor de transcripción ETV5 aumento en el testículo de las crías adultas al igual que en nuestro trabajo en que utilizamos una dieta materna hipercalórica (Pedrana et al. 2021).

Según estudios en modelos de obesidad en ratones, a los que se les administró una dieta rica en grasas y azúcares, se observó que a partir de las 4 semanas de vida aumentó el factor de transcripción ETV5, a nivel del hígado. Estos datos sugieren que el ETV5 en el hígado está asociado con la esteatosis hepática, y su nivel podría alterarse con la sobrenutrición a largo plazo por un mecanismo postraduccional (Mao et al. 2021).

Por otra parte, en estudios en ratones knockout para ETV5^{-/-} se observó que eran delgados, y presentaban una desregulación de la salida de insulina por parte de las células β pancreáticas, resultando en una disminución de la obesidad inducida por la dieta e intolerancia a la glucosa. Asimismo, el ETV5 pancreático es importante en la regulación del equilibrio energético y el metabolismo, siendo un gen asociado a la obesidad (Wei et al. 2023).

Por lo tanto, en el presente trabajo el aumento de ETV5 refleja un aumento del peso corporal de los animales a los 160 días de vida, debido a la modificación en el metabolismo y acumulación de lípidos en el organismo.

9.3 Efecto de la sobrenutrición materna en el inicio temprano de la pubertad y el peso corporal a la pubertad

En nuestro trabajo en ratas cuyas madres fueron alimentadas con una dieta hipercalórica en gestación y lactancia, observamos que la edad a la pubertad y el peso a la pubertad fue menor en crías machos de madres sobrenutridas respecto a los animales del grupo control.

Según estudios de Rodríguez-González et al. (2023) realizado en crías de ratas a los 110 días de vida, cuyas madres fueron sobrenutridas, se observó un aumento de los niveles de leptina. Mientras que otros autores observaron la presencia de receptores de leptina en las células de Leydig, es de esta manera que la leptina participa en la regulación de la reproducción, siendo la leptina la señal más temprana de comienzo de la pubertad. De esta manera, involucrando interacciones paracrinas y/o endocrinas a nivel del eje hipotálamo- hipófisis-gonadal con efectos sinérgicos como ser: aumento de los esteroides sexuales, hormona del crecimiento, IGF-I, e insulina (Moschos et al. 2002; Soliman et al. 2014).

9.4 Efecto de la sobrenutrición materna en el inicio temprano de la pubertad y el peso corporal adulto

En nuestro trabajo la edad a la pubertad fue menor en crías machos de madres sobrenutridas en gestación y lactancia respecto a los animales del grupo control. Estudios realizados por Soliman et al. (2014) hacen mención que, tanto la desnutrición como una nutrición rica en grasas durante la etapa de gestación adelantan el inicio de la pubertad en crías de ratas machos y hembras. De la misma manera, lo comprobó Hounsgaard et al. (2014) realizando estudios en humanos y observando que los hijos de madres obesas tenían un inicio de la pubertad adelantado o temprano en el tiempo. Por otra parte, estudios de Soliman et al. (2014) en ratas cuyas madres fueron sobrenutridas establecen que la pubertad desencadena un crecimiento acelerado, con un aumento de las necesidades nutricionales. Mientras que la sobrenutrición materna durante el desarrollo temprano de las crías, se relaciona con el inicio anticipado de la pubertad, con obesidad y con alteraciones metabólicas en el animal adulto (Sloboda et al. 2009).

Demostrando así, el efecto que tiene la dieta prenatal materna sobre el desarrollo de las crías en la etapa de la pubertad. Es de esta manera, que podemos decir que en nuestro estudio el inicio temprano de la pubertad se observó por influencia de una dieta rica en grasas.

9.5 Efecto de la sobrenutrición materna en el detrimento del peso testicular realtivo en función del aumento del peso corporal

En nuestro trabajo, en cuanto a los efectos de la sobrenutrición materna en gestación y la lactancia en las crías de ratas machos adultas se observaron alteraciones en la histomorfometría testicular, evidenciándose una disminución del peso testicular relativo y del índice gonadosomático. En cambio, para la variable peso testicular en los animales a los 160 días de vida, no hubo diferencias entre grupos.

Por su parte, esto fue observado por Campos-Silva et al. (2018) en un estudio en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica en cuyas crías de 120 días de vida no varió su peso testicular. De la misma manera, Sertorio et al. (2022) observaron en un estudio en ratas cuyos padres fueron alimentados con una dieta rica en grasas y azúcar, que las crías machos de 90 días de vida no tuvieron variaciones en el peso testicular.

A pesar de que no se registraron alteraciones en el parámetro peso testicular si se observaron variaciones en el peso testicular relativo, coincidiendo con Bautista et al. (2017) que realizó un estudio en ratas a las cuales les administró una dieta hipercalórica durante la gestación y lactancia y cuyas crías machos de 110 días de vida presentaron una disminución del peso testicular relativo. En cambio, no sucedió lo mismo con el parámetro índice gonadosomático el cual aumentó según Campos-Silva et al. (2018) en comparación con nuestros datos.

Por lo tanto, podemos inferir que la sobrenutrición materna durante la gestación y la lactancia tuvo un efecto negativo sobre el peso testicular en función del aumento del peso corporal en el animal adulto a los 160 días de vida. Siendo la disminución del peso testicular relativo debido a una disminución del factor IGF-I (un promotor del desarrollo testicular).

9.6 Sobrenutrición materna y el aumento del diámetro de los túbulos seminíferos

Con relación a los cambios morfológicos en el testículo por efecto de una dieta materna hipercalórica durante la gestación y la lactancia en las crías machos adultas, observamos un aumento del diámetro de los túbulos seminíferos. En estudios previos, en modelos de subnutrición materna en las crías machos, difiere con nuestros datos en cuanto al diámetro de los túbulos seminíferos que disminuyó en subnutrición materna (Pedrana et al. 2020).

Nuestros datos coinciden con lo observado por Campos-Silva et al. (2018) y Reame et al. (2014) quienes administraron una dieta materna hipercalórica a ratas durante la gestación y lactancia y observaron en sus crías machos a los 120 y 84 días de vida respectivamente un aumento de los diámetros de los túbulos seminíferos. En nuestro estudio, consideramos que el aumento del diámetro de los túbulos seminíferos en el testículo, se explica por el aumento de las células de Sertoli y por el aumento del número de espermatogonias en proliferación.

Por otro lado, (Rani et al. 2016) explica el aumento del diámetro de los túbulos seminíferos en ratas sobrenutridas en la etapa prenatal en las que los niveles altos de colesterol que se aportan a través de la dieta, aumentan la peroxidación de lípidos que compromete la integridad celular. Esto provocaría el desprendimiento de las células del epitelio seminífero, y por lo tanto el aumento y permanencia de restos celulares en la luz del túbulo, lo que genera un aumento del diámetro de los túbulos seminíferos.

9.7 Sobrenutrición materna en el aumento del número de células de Sertoli y espermatogonias en proliferación

La dieta materna hipercalórica durante el período de gestación y lactancia aumento el número de células de Sertoli y el número de espermatogonias en proliferación en las crías machos adultas en nuestro trabajo. En estudios previos, se observaron resultados similares en modelos de subnutrición materna en las crías machos con aumento del número de células de Sertoli y de espermatogonias (Pedrana et al. 2020).

Por otra parte, otros autores informan que, en ratas las dietas altas en grasas, afectan el desarrollo sexual de las crías machos reduciendo el número células de Sertoli y el de espermatogonias (Galarza et al. 2019). Estos resultados se explican por la regulación autócrina y parácrina de los factores de transcripción producidos por las células de Sertoli y que regulan a las espermatogonias en proliferación.

9.8 Sobrenutrición materna y su efecto en las espermatogonias en las crías adultas.

Factor de transcripción ETV5 y la autorrenovación de células madre espermatogonias

En nuestro trabajo, fue observado un aumento del número de espermatogonias en proliferación en las crías adultas de ratas cuyas madres fueron sobrenutridas en gestación y lactancia. Asimismo, obtuvimos un aumento del factor de transcripción ETV5 a nivel testicular.

Estudios previos de otros autores demuestran que el factor ETV5 producido por las células de Sertoli cumple un rol muy importante en el mantenimiento y la autorrenovación de las células madre espermatogonias (Morrow et al. 2007), induciendo la expresión de genes como son el Lhx1 y Bcl6b esenciales para el proceso de autorrenovación de las espermatogonias (Eo et al. 2012). Además, el ETV5 favorece la producción de ligando 9 de quimiocina para la quimioatracción de las células germinales (Tyagi et al. 2009) manteniendo el vínculo entre las células germinales y las células de Sertoli para su desarrollo. Por lo tanto, podemos decir que lo observado en nuestro estudio, en cuanto al aumento del factor ETV5, favorece el aumento del número de espermatogonias en proliferación a nivel del tejido testicular.

Factor de transcripción GDNF y la autorrenovación de células madre espermatogonias

Nuestros estudios de sobrenutrición materna durante la gestación y la lactancia, mostraron una disminución del factor GDNF y un aumento del número de espermatogonias en proliferación en las crías de ratas a los 160 días de vida. En estudios sobre subnutrición materna se observó efectos similares para la expresión de GDNF con respecto a las dietas maternas hipercalóricas en los testículos de las crías adultas, obteniendo una disminución de la expresión de dicho factor para ambos trabajos (Pedrana et al. 2021).

Estudios previos de otros autores observaron una disminución del factor GDNF en el testículo, en un modelo experimental en ratas, a las que se les indujo diabetes (inyección de estreptozotocina) para dañar las células beta del páncreas durante 20, 45 y 60 días. Y se observó que a medida que el animal va creciendo, la disminución de GDNF es mayor. Lo que provocaría una inhibición de la autorrenovación de las células madre espermatogonias (Azarni et al. 2020).

Por otra parte, estudios in vitro de Fouchécourt et al. (2006) demostraron a nivel testicular en el ratón, que la alteración de un alelo de GDNF, provoca una disminución de la reserva de las células madre espermatogonias y que por el contrario el aumento de GDNF lleva a un aumento de las espermatogonias indiferenciadas, poniendo de manifiesto la acción de regulación parácrina con la que cuenta dicho factor para la autorrenovación, diferenciación y/o supervivencia de las espermatogonias. La disminución de GDNF puede deberse a la acción de un regulador denominando NOTCH. Este se dirige a un par de represores transcripcionales, y regulan directamente a la baja la expresión de GDNF al unirse al promotor Gdnf, antagonizando así los efectos de FSH/AMPC. De la misma manera, las células madre/progenitoras testiculares están activando la señalización NOTCH en células de Sertoli in vivo e in vitro a través del ligando NOTCH JAG1 en su superficie, lo que indica que estas células pueden asegurar su propia homeostasis a través de la regulación de retroalimentación negativa (Garcia et al. 2017). Por lo tanto, en nuestro trabajo el balance general entre ETV5 y GDNF, estaría a favor de ETV5.

Factor de crecimiento IGF-I y la proliferación de las células madres espermatogonias

En nuestro estudio observamos una disminución del factor IGF-I y un aumento del número de espermatogonias en el testículo de las crías de ratas adultas cuyas madres fueron alimentadas con una dieta hipercalórica. En estudios previos de subnutrición hubo un aumento del IGF-I, lo que muestra efectos opuestos en células testiculares con el presente estudio, donde la IGF-I disminuye (Pedrana et al. 2020).

Varios autores tienen evidencia de una relación entre el factor IGF-I y la proliferación de las células madres espermatogonias, como mencionan Park et al. (2018) en un estudio en cerdos, en el que el tratamiento con IGF-I mejoró la proliferación de las células madres espermatogonias y de las células de Sertoli en cultivos celulares. Asimismo, Binsila et al. (2020) proponen que la incorporación de IGF-I en un cultivo de células germinales en ovinos favorece la proliferación de células madres espermatogonias. Contrariamente a nuestros resultados, lo que sucede con el factor IGF-I y la proliferación de las espermatogonias, observamos una disminución de la inmunexpresión del factor IGF-I y un aumento en el número de espermatogonias en proliferación. Es de esta manera que podemos encontrar una explicación a nuestros resultados, por los estudios realizados por Pitetti et al (2013) donde observaron que, cuando se inactiva el receptor de insulina (INSR), e IGF-IRo los dos, en las células germinales, el desarrollo de las células germinales y la espermatogénesis no se veían alteradas. Es por eso que podemos explicar que los efectos del IGF-I podrían ser indirectos, a través de otras células testiculares, como células peritubulares, espermatoцитos y células de Leydig (Hu et al. 2010).

9.9 Sobrenutrición materna y su efecto en la apoptosis testicular en las crías adultas

Sobrenutrición materna y apoptosis en células germinales por disminución de IGF-I

Los datos obtenidos en nuestro trabajo, con respecto al factor IGF-I, muestran que disminuye en las crías de ratas adultas de madres que recibieron una dieta hipercalórica durante la gestación y lactancia. En este sentido, es que vimos que otros autores como Ozkurkcugil et al. (2004) hacían referencia al factor IGF-I y la apoptosis, expresando que existe un efecto

antiapoptótico por parte del factor de crecimiento IGF-I en las células testiculares de ratas, más precisamente en las células germinales. La forma que dicho factor tiene para actuar a este nivel es mediante el bloqueo en la liberación del citocromo c a nivel mitocondrial, que es esencial para dirigir la activación secuencial de diferentes caspasas y por ende culminar en el proceso de apoptosis. De esta manera es que podemos decir que nuestros datos coinciden con esta teoría, ya que observamos una disminución de IGF-I, con un aumento de las proteínas apoptóticas como es la caspasa-3 activa.

Sobrenutrición materna y apoptosis en espermátidas por caspasa-3

Nuestros resultados mostraron un aumento de la inmunexpresión de caspasa-3 y una localización a nivel de espermátidas redondas y alargadas en los testículos de las crías a los 160 días de edad, cuyas madres fueron sobrenutridas durante la gestación y lactancia. Estudios previos, referidos a la subnutrición materna, han determinado que la inmunexpresión de la caspasa-3 aumenta en los testículos de las crías macho adultas (Pedrana et al. 2021).

En este sentido, en ratas macho adultas, cuyas madres recibieron una dieta hipercalórica durante la gestación y la lactancia, el número de espermátidas redondas y alargadas disminuyó a los 100 días de vida de las crías macho (Navya & Yajurvedi 2017). Asimismo, se observó una disminución del recuento de espermatozoides en las crías macho a los 90 días de vida cuyos padres fueron alimentados con una dieta rica en grasas y azúcar durante la gestación y lactancia (Sertorio et al. 2022). Todos estos estudios indican que la obesidad materna programa a la descendencia determinando la probabilidad de desarrollar una mala calidad y función espermática y una condición de subfertilidad a largo plazo (Meneghini et al. 2022).

Nuestros resultados con respecto al aumento de la proteína caspasa-3 activa, y su localización observada principalmente a nivel de espermátidas redondas y alargadas, sugieren un aumento de la probabilidad de desarrollar apoptosis, y por lo tanto una reducción en la producción de espermatozoides.

Sobrenutrición materna y efecto sobre caspasa -3 y Bcl-2

En nuestro trabajo, observamos un aumento de la inmunexpresión de la proteína Bcl-2 en los testículos de las crías de rata a los 160 días de edad, cuyas madres recibieron una dieta hipercalórica durante la gestación y la lactancia. Sin embargo, no hubo efectos para la proteína Bax en dichas crías.

En anteriores estudios, sobre subnutrición materna, se ha determinado que aumenta la inmunexpresión de Bcl-2 en los testículos de las crías macho adultas, mientras que Bax no presenta diferencias (Pedrana et al. 2021).

Estudios de otros autores como Furuchi et al. (1996) en ratones transgénicos, también observaron un aumento de Bcl-2 en células germinales testiculares. Tal como mencionan estudios previos en el balance entre caspasa-3 proapoptótica y Bcl-2 antiapoptótica está a favor de la apoptosis, ya que la activación de la caspasa-3 se considera un punto sin retorno en el proceso apoptótico (Gongping 2023).

10. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN GENERAL

La sobrenutrición materna con dietas altas en grasas y proteínas durante la gestación y la lactancia modifica la expresión de los factores de transcripción, de crecimiento, apoptóticos y de proliferación celular en el testículo de las crías ratas adultas que regulan la espermatogénesis de la progenie en la vida adulta.

CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

Se determinaron algunos de los mecanismos subyacentes que median los cambios producidos por la sobrenutrición materna en las crías tales como, el aumento del factor de transcripción ETV5 que promueve la proliferación de espermatogonias y el aumento de la proteína Bcl-2 antiapoptótica en los testículos de ratas adultas. Por otra parte, la sobrenutrición materna aumentó la proteína caspasa-3 en las espermátidas lo que sugiere la apoptosis de dichas células en el proceso de espermiogénesis. Por lo tanto, las dietas hipercalóricas maternas alteraron el equilibrio entre la apoptosis y la proliferación celular en el testículo de las crías a los 160 días de vida.

Asimismo, este tipo de dieta materna hipercalórica con un exceso de grasas y proteínas también afectó el factor de crecimiento testicular IGF-I producido por las células de Sertoli que regula la espermatogénesis en la descendencia.

Perspectivas a futuro: sobrenutrición y epigenética

Se espera a futuro analizar los mecanismos epigenéticos que intervienen durante el desarrollo fetal y posnatal por sobrenutrición y sus efectos sobre la reproducción en el macho. El análisis de las modificaciones epigenéticas contribuirá a comprender la regulación de procesos como la apoptosis, la proliferación y diferenciación celular que afectan el desarrollo testicular y por ende la espermatogénesis.

11. REFERENCIAS

- Ainge H, Thompson C, Ozanne S, Rooney K. (2011). A systematic review on animal models of maternal high fat feeding and offspring glycaemic control. *IntJ Obes* 35: 325-335.
- Alves M, Jesus T, Sousa M, Goldberg E, Silva B, Oliveira P. (2016). Male fertility and obesity: are ghrelin, leptin and glucagon-like peptide-1 pharmacologically relevant? *Curr Pharm Des* 22(7):783-791.
- Auharek S, de França L. (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.
- Azarniad R, Razi M, Hasanzadeh S, Malekinejad H. (2020). Experimental diabetes negatively affects the spermatogonial stem cells' self-renewal by suppressing GDNF network interactions. *Andrologia* 52(9) e13710.
- Azzwali A, Azab A. (2019). Apoptosis: Insight into Stages, Extrinsic and Intrinsic Pathways. *Clin Med* 7: 80-82.
- Basain J, Valdéz C, Miyar E, Chirino M, Álvarez M. (2014). Proceso de programación fetal como mecanismo de producción de la obesidad en la vida extrauterina. *Medisan* 18: 1452-1459.
- Barone R. (2001). Anatomie comparée des mammifères domestiques. Splanchnologie II Appareil uro-génital Foetus et ses annexes Péritoine et topographie abdominale. Ed Vigot, Lyon. Tome 4, Chapitre II, 83-139.
- Bastías-Pérez M, Serra D, Herrero L. (2020). Dietary options for rodents in the study of obesity. *Nutrients* 12: 1-18.
- Bautista C, Rodríguez G, Morales A, Lomas C, Cruz F, Reyes L, Zambrano E. (2017). Maternal obesity in the rat impairs male offspring aging of the testicular antioxidant defense system. *Reprod Fertil Dev* 29(10):1950-1957.
- Bhushan S, Aslani F, Zhang Z, Sebastian T, Elsässer H, Klug J. (2016). Isolation of sertoli cells and peritubular cells from rat testes. *J Vis Exp* 1-12.
- Binsila B, Selvaraju S, Ghosh S, Ramya L, Arangasamy A, Ranjithkumaran R, Bhatta R. (2020). EGF, GDNF, and IGF-1 influence the proliferation and stemness of ovine spermatogonial stem cells in vitro. *J Assist Reprod Genet.* 37 (10):2615-2630.
- Bishop M, Walton A. (1960). Spermatogenesis and the Structure of Mammalian Spermatozoa. In: Parkes, AS. Volume: Part 2 of Marshall's Physiology of Reproduction, 3^a. ed. London, 1-129.

- Boender A, Rozen A, Adan R. (2012). Nutritional State Affects the Expression of the Obesity-Associated Genes *Etv5*, *Faim2*, *Fto*, and *Negr1*. *Obesity* 20 (12) 18–23.
- Braydich-Stolle L, Kostereva N, Dymb M, Hofmann M. (2007). Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Dev Biol* 304 (1) 34-45.
- Budak Ö. (2021). Histological investigation of the protective effect of metformin on testis and sperm parameters in obese rats with type 2 diabetes mellitus. *J. Surg. Med.* 5: 954-959.
- Cagnol S, Mansour A, Van Obberghen-Schilling E, Chambard J. (2011). Raf-1 activation prevents caspase 9 processing downstream of apoptosome formation. *J Signal Transduct* 834948.
- Cailleau J, Vermeire S, Verhoeven G. (1990). Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol.* 69:1 79-89.
- Campos-Silva P, Costa W, Sampaio F, Gregorio B. (2018). Prenatal and/or postnatal high-fat diet alters testicular parameters in adult Wistar albino rats. *HistolHistopathol* 33: 407-416.
- Catalano P, Ehrenberg H. (2006). The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *BJOG* 113 (10): 1126-1133.
- Cervený C, König H, Liebich H. (2011). Órganos genitales masculinos. En: König H.E, Liebich H.G. *Anatomía de los Animales Domésticos. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 2ªEd. Tomo 2. Cap 10. 119-134.
- Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H, Zhao G, Arber S, Kurpios N, Murphy T, Cheng A, Hassell J, Chandrashekar V, Hofmann M C, Hess R, Murphy K. (2005). ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* 436: 1030-1034.
- Chen H, Wang Y, Ge R, Zirkin B. (2017). Leydig cell stem cells: identification, proliferation and differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 445: 65-73.
- Chesney K, Chang C, Bryda E. (2020). Using Vaginal Impedance Measurement to Identify Proestrus in Rats Given Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) Agonist. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 59 (3):282-287.
- Chojnacka K, Zarzycka M, Mruk D. (2016). Biology of the Sertoli cell in the fetal, pubertal, and adult mammalian testis. *Results Probl Cell Differ* 58: 225-251.
- Christante C, Taboga S, Pinto-Fochi M, Góes R. (2013). Maternal obesity disturbs the postnatal development of gonocytes in the rat without impairment of testis structure at prepubertal age. *Reproduction* 146: 549-558.

- Coghe F, Fanni D, Gerosa C, Ravarino A, Mureddu M, Cerrone G, Coni P, Pichiri G, Congiu T, Piras M, Cau F, Aimola V, Balestrieri A, Lai E, Manchia M, Scano A, Orrù G, La Nasa G, Van Eyken P, Saba L, Scartozzi M, Castagnola M, Faa G. (2022). The role of fetal programming in human carcinogenesis - May the Barker hypothesis explain interindividual variability in susceptibility to cancer insurgence and progression? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 26 (10):3585-3592.
- Cooke S, Hess A, Simon L, Schlessner N, Carnes K, Tyagi G, Hofmann C, Murphy M. (2006). The transcription factor Ets-Related Molecule (ERM) is essential for spermatogonial stem cell maintenance and self-renewal. *Anim Reprod* 3 (2) 98-107.
- Dadhich R, Real F, Zurita F, Barrionuevo F, Burgos M, Jiménez R. (2010). Role of apoptosis and cell proliferation in the testicular dynamics of seasonal breeding mammals: A study in the Iberian mole, *Talpa occidentalis*. *Biol Reprod* 83: 83-91.
- Dyce K, Sack W, Wensing C. (2012). *Anatomía veterinaria*. 4^{ed}. Ed Manual Moderno, México, 184-186.
- De Rooij D, Russell L. (2000). All you wanted to know about dilapidations but were afraid to ask. *J Androl* 21, 776-798.
- Desai M, Jellyman J, Han G, Beall M, Lane RH, Ross M. (2014). Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 211 (3) 237 e1-237.e13.
- Dodd J, Turnbull D, McPhee A, Deussen A, Grivell R, Yelland L, Crowther C, Wittert G, Owens J, Robinson J, Crowther C, Wittert G, Owens J, Robinson J. (2014). Antenatal lifestyle advice for women who are overweight or obese: LIMIT randomised trial. *BMJ* 348: g1285.
- Dovmark T, Kvist P, Mølck A, Hvid H. (2022). Quantitative Assessment of Epithelial Proliferation in Rat Mammary Gland Using Artificial Intelligence Independent of Choice of Proliferation Marker. *J Histochem Cytochem* 70 (3):237-250.
- El-Wakf A, El-Habibi E, Ali D, Abd El-Ghany E, Elmougy R. (2020). Marjoram and sage oils protect against testicular apoptosis, suppressed Ki-67 expression and cell cycle arrest as a therapy for male infertility in the obese rats. *J. Food Biochem.* 44: 1-11.
- Eo J, Song H, Lim H. (2012). ETV5, a transcription factor with versatile functions in male reproduction. *Clin Exp Reprod Med* 39: 41-45.
- Escott G, de Castro A, Jacobus A, Loss E. (2014). Insulin and IGF-I actions on IGF-I receptor in seminiferous tubules from immature rats. *Biochim Biophys Acta – Biomembr* 1838(5):1332-1337.

- Fawcett, D, Bloom W. (1995). Tratado de histología: Bloom-Fawcett. 12a ed., 2a reimp. Madrid, Interamericana McGraw-Hill.1044p.
- Fesik S, Shi Y. (2001). Structural biology. Controlling the caspases. *Science* 294: 1477-1478.
- Figueiredo A, França L, Hess R, 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-derive neurotropic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis. *J Endocrinol*190: 59-71.
- 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: 1703-9.
- Galarza R, Rhon-Calderón E, Bizzozero M, Meneghini M, Cortez A, Lux-Lantos V, Faletti A. (2019). Impact of maternal overweight on the sexual maturity of male offspring in rats. *J Nutr Biochem* 71, 27-34.
- Galluzzi L, López-Soto A, Kumar S, Kroemer G. (2016). Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity* 44: 221-231.
- García-Morales S, Gómez-Merino F C, Trejo-Téllez L I, Herrera-Cabrera E B. (2013).Transcription factors involved in molecular responses of plants to osmotic stress. *Rev Fitotec Mex* 36: 105-115.
- Garcia T, Parekh P, Gandhi P, Sinha K, Hofmann MC. (2017). The NOTCH Ligand JAG1 Regulates GDNF Expression in Sertoli Cells. *Stem Cells Dev.* 15;26 (8):585-598.
- Ge R, Hardy M. (1998). Variation in the end products of androgen biosynthesis and metabolism during postnatal differentiation of rat leydig cells. *Endocrinology*139: 3787-3795.
- Genovese P, Núñez M, Pombo C, BielliA. (2010).Undernutritionduringfoetaland post natallifeaffectstesticularstructureandreducesthenumberof Sertoli cellsintheadultrat.Reprod.Domest.Anim. 45:233-236.
- Gilbert R, Dalla Serra M, Froelich C, Wallace M, Anderluh G. (2014). Membrane pore formation at protein-lipid interfaces. *Trends Biochem Sci* 39(11):510-6.
- Gluckman P, Hanson M, Buklijas T. (2010). A conceptual framework for the developmental origins of health and disease. *J Dev Orig Health Dis.* (1):6-18.
- Gongping S. (2023) Death and survival from executioner caspase activation *Seminars in Cell Developmental Biology.* 156: 66-73.

- Griffeth R, Bianda V, Nef S. (2014). The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic Clin Androl* 24: 1-10.
- Gutierrez-Aguilar R, Thompson A, Marchand N, Dumont P, Woods SC, Launoit Y, Seeley RJ, Ulrich-Lai R. (2015). The obesity-associated transcription factor ETV5 modulates circulating glucocorticoids. *Physiol Behav* 150: 38-42.
- Hoffman D, Powell T, Barrett E, Hardy D. (2021). Developmental Origins of Metabolic Diseases. *Physiol Rev* 101: 739-795.
- Houngaard M, Hakonsen L, Vested A, Thulstrup A, Olsen J, Bonde J, Nohr E, Ramlau-Hansen H. (2014). Maternal pre-pregnancy body mass index and pubertal development among sons. *Andrology* 2:198-204.
- Howe G, Sloboda D, Kamal T, Vickers M. (2009). Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* 587:4 905-915.
- Howe G, Sloboda D, Vickers M. (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.
- Howe G, Sloboda D, Reynolds C, Vickers M. (2013). Timing of Maternal Exposure to a High Fat Diet and Development of Obesity and Hyperinsulinemia in Male Rat Offspring: Same Metabolic Phenotype, Different Developmental Pathways? *J Nutr Metab* 1-11.
- Hussar P, Žuravskaja M, Kärner M. (2013). Apoptosis regulator BCL-2. *Pap Anthropol* XXII, 63-67.
- Hussar P. (2022). Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3. *Encyclopedia* 2, 1624-1636.
- Hu G, Lin H, Chen G, Chen B, Lian Q, Hardy D, Zirkin B, Ge R. (2010) Deletion of the Igf1 gene: suppressive effects on adult Leydig cell development. *J Androl.* 31(4):379-87.
- Jacobs S, Teixeira D, Guilherme C, da Rocha C, Aranda B, Reis A, de Souza M, Franci C, Sanvitto G. (2014). The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring. *Physiol Behav* 129: 280-286.
- Jazwiec P, Sloboda D. (2019). Nutritional adversity, sex and reproduction: 30 years of DOHaD and what have we learned? *J Endocrinol* 242(1): T51-T68.
- Justulin L, Zambrano E, Ong T, Ozanne S. (2023). Editorial: Early Life Epigenetic Programming of Health and Disease through DOHaD Perspective. *Front Cell Dev Biol* 11:1139283.

- Kerr J, Loveland K, O'Bryan M, Krester D. (2006). Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. En: Neill J.D. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction Elsevier, San Diego, 3rd Ed Vol 1, Cap 18pp 827–947.
- Kwon E, Kim Y. (2017). What Is Fetal Programming a lifetime health is under the control of in utero health. *Obstet Gynecol Sci.* 60(6):506-19.
- Lagos-Cabré R, Moreno R. (2008). Mitotic, but not meiotic, oriented cell divisions in rat spermatogenesis. *Reproduction* 135: 471-478.
- Leblond C, Clermont Y. (1952). Definition of the stages of the cycles of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci* 55: (4), 548-573.
- Lewis E, Barnett J, Freshwater L, Hoberman A, Christian M. (2002). Sexual maturation data for Crl sprague-dawley rats: Criteria and confounding factors. *Drug Chem Toxicol* 25: 437-458.
- Liebich H. (2019). Male reproductive system (organa genitalia masculina) En: Liebich H. G. *Veterinary Histology of Domestic Mammals and Birds.* Ed. Publishing, Germany. 5th ed. Cap 13, pp277-301.
- Liu Z, Zheng X, Li S, Yang Z, Hu L. (2003). Germ cell apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax following testicular torsion/detorsion in rats. *Zhonghua Nan Ke Xue* 9(1):40-2, 68.
- Lourenço B, Guimarães-Teixeira C, Flores B, Miranda-Gonçalves V, Guimarães R, Cantante M, Lopes P, Braga I, Maurício J, Henrique J, Lobo J. (2022). Ki67 and LSD1 Expression in Testicular Germ Cell Tumors Is Not Associated with Patient Outcome: Investigation Using a Digital Pathology Algorithm *Life (Basel)* 10;12(2):264.
- Malley B. (2009). *Anatomía Fisiología clínica de animales exóticos. Estructura y función de mamíferos, aves, reptiles y anfibios.* Ed. Servet. Zaragoza. pp 275-276.
- Maynard R, Downes N. (2019). *Anatomy and Histology of the Laboratory rat in Toxicology and Biomedical Research.* Ed. Elsevier Academic Press. Chennai. pp 207-214.
- Mao J, Pennington K, Talton O, Schulz, L, Sutovsky M, Yan L, Sutovsky P. (2018). In Utero and Postnatal Exposure to High Fat, High Sucrose Diet Suppressed Testis Apoptosis and Reduced Sperm Count. *Sci Rep* 8(1).
- Mao Z, Feng M, Li Z, Zhou M, Xu L, Pan K, Wang S, Su W, Zhang W. (2021). ETV5 Regulates Hepatic Fatty Acid Metabolism Through PPAR Signaling Pathway. *Diabetes* 70(1):214-226.

- Maki C, 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. *Human Reprod* 26(6): 1480-1491.
- McCoski S, Bradbery A, Marques S, Posbergh C, Sanford C. (2021). Maternal Nutrition and Developmental Programming of Male Progeny. *Animals*11 (8), 2216.
- McMullen S, Mostyn A. (2009). Animal models for the study of the developmental origins of health and disease. *Proc Nutr Soc*68: 306-320.
- Meachem S, McLachlan R, De Kretser D, Robertson D, Wreford N. (1996). Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. *Biol Reprod* 54: 36-44.
- Mejia-Montilla J, Reyna-Villasmil N, Reyna-Villasmil E. (2020). Programación fetal y modificaciones epigenéticas relacionadas al folato. *Rev Peru Ginecol y Obstet* 66: 41- 46.
- Megías M, Molist P, Pombal M. (2023). Atlas de histología vegetal y animal. <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>. Consultado: (16-6-2023).
- Meneghini M, Galarza R, Flores Quiroga J, Faletti A. (2022).Diet-induced maternal obesity and overnutrition cause a decrease in the sperm quality of the offspring. *J Nutr Biochem* 103:108966.
- Metsälä J, Stach-Lempinen B, Gissler M, Eriksson J, Koivusalo S. (2006). Risk of Pregnancy Complications in Relation to Maternal Prepregnancy Body Mass Index: Population-Based Study from Finland. *Paediatr Perinat Epidemiol* 30: 28-37.
- Mitchell A, Briquez P, Hubbell J, Cochran J. (2016). Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomater.* 30: 1-12.
- Moschos S, Chan J, Fertility C. (2002). Revista de Revistas Leptina y reproducción. *Rev. Chile Obs. y Ginecológica.* 67: 167–169.
- Moore A, Morris I. (1993). 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* 138: 107-14.
- Morrow C, Hostetler C, Griswold M, Hofmann M, Murphy K, Cooke P, Hess R. (2007).ETV5 is required for continuous spermatogenesis in adult mice and may mediate blood–testes barrier function and testicular immune privilege. *Ann N Y Acad Sci* 1120: 144.

- Navya H, Yajurvedi H. (2017). Obesity causes weight increases in prepubertal and pubertal male offspring and is related to changes in spermatogenesis and sperm production in rats. *Reprod Fertil Dev*29: 815-823.
- Nicholas L, Nagao M, Kusinski L, Fernandez-Twinn D, Eliasson L, Ozanne S. (2020). Exposure to maternal obesity programs sex differences in pancreatic islets of the offspring in mice. *Diabetologia* 63: 324-337.
- Noden D, DeLahunta A. (1990). *Embriología de los animales domésticos: mecanismos de desarrollo y malformaciones*. 1a. ed. Zaragoza, Acribia. pp 353-374.
- Oatley J, Reeves J, McLean D. (2004). Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during in vitro culture. *Biol Reprod*71: 942-7.
- Oatley J, Avarbock M, Brinster R. (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 Bio Chem* 282:25842-25851.
- Opray N, Grivell R, Deussen A, Dodd J. (2015). Directed preconception health programs and interventions for improving pregnancy outcomes for women who are overweight or obese. *Cochrane Database Syst. Rev* 7, Cd010932.
- Ozkurkcugil C, Yardimoglu M, Dalcik H, Erdogan S, Gokalp A. (2004). Effect of insulin-like growth factor-1 on apoptosis of rat testicular germ cells induced by testicular torsion. *BJU Int.* 93: 1094-1097.
- Park H, Lee W, Chai S, Woo J, Chung H, Park J, Song H, Hong K. (2018). Expression of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 and Regulation of the Insulin-like Growth Factor-I Axis in Pig Testis. *Biotechnol Bioproc Engineering* 23: 278-285.
- Pedrana G, Viotti M, Souza E, Sloboda D, Martin G, Cavestany D, Ortega H. (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:(5), 795-802.
- Pedrana G, Viotti H, Lombide P, Cavestany D, Martin G, Vickers M, 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*11:473-483.
- Pedrana G, Larrañaga C, Diaz A, Viotti H, Lombide P, Cavestany D, Vickers M, Martin G, Sloboda D. (2021). 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. *Reprod Fertil Dev* 33(7):484-496.

- Peña-Blanco A, García-Sáez A. (2018). Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J.* 285(3):416-431.
- Pitetti J, Calvel P, Zimmermann C, Conne B, Papaioannou M, Aubry F, Cederroth C, Urner F, Fumel B, Crausaz M, Docquier M, Herrera P, Pralong F, Germond M, Guillou F, Jégou B, Nef S. (2013). 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.
- Poreba E, Durzynska J. (2020). Nuclear localization and actions of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) system components: Transcriptional regulation and DNA damage response. *Mutat Res Rev Mutat Res* 784:108307.
- Ramos S, Lee J, Peuler J. (2001). An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle. *J Appl Physiol* 1985: 91(2), 667-670.
- Rani V, Deep G, Singh R, Palle K, Yadav U. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci* 148: 183-193.
- Reame V, Pytlowanciv E, Ribeiro D, Pissolato T, Taboga S, Góes R, Pinto-Fochi M. (2014). Obesogenic environment by excess of dietary fats in different phases of development reduces spermatid efficiency of wistar rats at adulthood: Correlations with metabolic status. *Biol Reprod* (91): 1-10.
- Ren X, Zhao M, Lash B, Martino M, Julier Z. (2020). Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. *Front Bioeng Biotechnol* 7: 1-9.
- Rodrigo N, Saad S, Pollock C, Glastras S. (2022). Diet Modification before or during Pregnancy on Maternal and Foetal Outcomes in Rodent Models of Maternal Obesity. *Nutrients* 14: 1-13.
- Rodríguez-González G, Vega C, Boeck L, Vázquez M, Bautista C, Reyes-Castro L, Saldaña O, Lovera D, Nathanielsz P, Zambrano E. (2015). Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. *Int J Obes* 39(4):549-556.
- Rodríguez-González G, De Los Santos S, Méndez-Sánchez D, Reyes-Castro L, Ibáñez C, Canto P, Zambrano E. (2022). High-Fat Diet Consumption by Male Rat Offspring of Obese Mothers Exacerbates Adipose Tissue Hypertrophy and Metabolic Alterations in Adult Life. *Br. J. Nutr.* 783-792.
- Rouiller-Fabre V, Lecref L, Gautier C, Saez J M, Habert R. (1998). Expression and effect of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology* 139: 2926-34.

- Ruager-Martin R, Hyde M, Modi N. (2010). Maternal obesity and infant outcomes. *Early Hum Dev* 86: 715-722.
- Russell L, Franca L, Hess R, Cooke P. (1995). Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. *Tissue Cell* 27:105-128.
- Russell L, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer S, Knudson C. (2002). Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol Reprod* 66(4):950-8.
- Ryu B, Kubota H, Avarbock M, Brinster R. (2005). Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci* 102(40):14302-7.
- Şanlı E, Kabaran S. (2019). Maternal Obesity, Maternal Overnutrition and Fetal Programming: Effects of Epigenetic Mechanisms on the Development of Metabolic Disorders *Curr Genomics* 20: 419-427.
- Schlessner H, Simon L, Hofmann M, Murphy K, Murphy T, Hess R, Cooke P. (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(3):483-489.
- Scholzen T, Gerdes J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-322.
- Sertorio M, César H, de Souza E, Mennitti L, Santamarina A, De Souza Mesquita L, Jucá A, Casagrande B, Estadella D, Aguiar O, Pisani L. (2022). Parental High-Fat High-Sugar Diet Intake Programming Inflammatory and Oxidative Parameters of Reproductive Health in Male Offspring. *Front Cell Dev Biol* 10: 1-13.
- Setchell B, Breed W. (2006). Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract. En: Neill J.D. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction Elsevier, San Diego, 3rd Ed. Vol 1, Cap 17, pp771-825.
- Shan L, Phillips D, Bardin C, Hardy M. (1993). Differential regulation of steroidogenic enzymes during differentiation optimizes testosterone production by adult rat Leydig cells. *Endocrinology* 133: 2277-2283.
- Shrestha A, Prowak M, Berlandi-Short V M, Garay J, Ramalingam L. (2021). Maternal Obesity: A Focus on Maternal Interventions to Improve Health of Offspring. *Front Cardiovasc Med* 8: 1-18.
- Simon L, Ekman G, Tyagi G, Hess R, Murphy K, Cooke P. (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(14):3090-3099.

- Simon L, Ekman G, Garcia T, Carnes K, Zhang Z, Murphy T, Murphy K, Hess R, Cooke P, Hofmann M. (2010). ETV5 regulates sertoli cell chemokines involved in mouse stem/progenitor spermatogonia maintenance. *Stem Cells* 28: 1882-1892.
- Smith T, Sloboda D, Saffery R, Joo E, Vickers M. (2014). Maternal nutritional history modulates the hepatic IGF-IGFBP axis in adult male rat offspring. *Endocrine* 46: 70-82.
- Soder O, Bang P, Wahab A, Parvinen M (1992). Insulin like growth factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic acid synthesis during rat spermatogenesis *Endocrinology* 131: 2344-2350.
- Soliman A, De Sanctis V, Elalaily R. (2014) Nutrition and pubertal development. *Indian J Endocrinol Metab.* 18(Suppl 1):S39-47.
- Spinnler K, Köhn F, 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(9):2181-2187.
- Staub C, Johnson L. (2018). Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal* 12(s1):s27-s35.
- Stirrat L, Reynolds R. (2014). Effects of maternal obesity on early and long-term outcomes for offspring. *Res Reports Neonatol* 4: 43-53.
- 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(1):29-39.
- Tajaddini A, Kendig M, Prates K, Westbrook F, Morris M. (2022). Male Rat Offspring Are More Impacted by Maternal Obesity Induced by Cafeteria Diet Than Females-Additive Effect of Postweaning. *Diet Int J Mol Sci* 23 (3) 1442.
- Tyagi G, Carnes K, Morrow C, Kostereva N, Ekman G, Meling D, Hostetler C, Griswold M, Murphy K, Hess R, Hofmann M, Cooke P. (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(2):258-266.
- Urbani A, Prosdocimi E, Carrer A, Checchetto V, Szabó I. (2021). Mitochondrial ion channels of the inner membrane and their regulation in cell death signaling. *Front Cell Dev Biol* 8: 620081.
- Vanhees K, Vonhögen I, Van Schooten F, Godschalk R. (2014). You are what you eat, and so are your children: The impact of micronutrients on the epigenetic programming of offspring. *Cell Mol Life Sci* 71: 271-285.

- Vickers M, Clayton Z, Yap C, Sloboda D. (2011). Maternal fructose intake during pregnancy and lactation alters placental growth and leads to sex-specific changes in fetal and neonatal endocrine function. *Endocrinology* 152(4) 1378-1387.
- Villalpando I, Lira E, Medina G, Garcia-Garcia E, and Echeverria O. (2008). Insulin-like growth factor 1 is expressed in mouse developing testis and regulates somatic cell proliferation. *Exp Biol Med* 233: 419-26.
- WHO. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. (2000) Report of a WHO Consultation; World Health Organization Technical Report Series; WHO: Geneva, Switzerland 894: 1-253.
- Wang G, Shaughnessy P, Chubb C, Robaire B, Hardy M, Council T, York N. (2003). Effects of Insulin-Like Growth Factor I on Steroidogenic Enzyme Expression Levels in Mouse Leydig Cells. *Endocrinology* 144: 5058-5064.
- Wang Z, Figueiredo C, Oudot, C, Vieira H, Brenner C. (2017). Mitochondrion: A common organelle for distinct cell deaths? *Int. Rev. Cell Mol Biol* 331: 245-287.
- Wang G, Bartell T, Wang X. (2018). Preconception and Prenatal Factors and Metabolic Risk. En: Halfon N. Forrest C. Lerner R. Faustman E. *Handbook of Life Course Health Development*. Springer International Publishing. Cham pp 47- 59.
- Waraky A, Lin Y, Warsito D, Haglund F, Aleem E, Larsson O, Wang X. (2017). Nuclear insulin-like growth factor 1 receptor phosphorylates proliferating cell nuclear antigen and rescues stalled replication forks after DNA damage. *J Biol Chem* 292:18227–18239.
- Wei Y, Han S, Wen J, Liao J, Liang J, Yu J, Chen X, Xiang S, Huang Z, Zhang B. (2023). E26 transformation-specific transcription variant 5 in development and cancer: modification, regulation and function. *J Biomed Sci* 30: 1-22.
- Weller M, Fortes M, Marcondes M, Rotta P, Gionbeli T, Valadares Filho S, Campos M, Silva F, Silva W, Moore S, Guimarães S. (2016). Effect of maternal nutrition and days of gestation on pituitary gland and gonadal gene expression in cattle. *J Dairy Sci*.99: 3056 -3071.
- Williams L, Seki Y, Vuguin P, Charron M. (2014). Animal models of in utero exposure to a high fat diet: A review. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1842(3):507-519.
- Wrobel K, Bergmann M. (2006). Male Reproductive System. En: Dellmann's textbook of veterinary histology. Jo Ann Eurell, Brian L. Frappier Blackwell Publishing Professional, Iowa. 6ta ed. Cap. 12, pp 233-255.

- Yang Y, Han C. (2010). GDNF stimulates the proliferation of cultured mouse immature Sertoli cells via its receptor subunit NCAM and ERK1/2 signaling pathway. *BMC Cell Biol* 11(1):78.
- Ye L, Li X, Li L, Chen H, Ge R. (2017). Insights into the Development of the Adult Leydig Cell Lineage from Stem Leydig Cells *Front Physiol* 8: 430.
- Yllera M, Lombardero M, Camiña M. (2020). Anatomía y fisiología de los animales de laboratorio. Roedores y lagomorfos. Monografías do Ibader - Serie Pecuaria. Ibader. Universidad de Santiago de Compostela. Lugo. 64pp. ISSN: 1988-8341.
- Yoon M, Bergerand T, Roser J 2011 Localization of Insulin Like Growth Factor I(IGF I) and IGF I Receptor(IGF IR) in Equine Testes *Reprod Dom Anim*. 46: 221-228.
- Yoshimura S, Yamaguchi H, Konno K, Ohsawa N, Noguchi S, Chisaka A. (2005). Observation of preputial separation is a useful tool for evaluating endocrine active chemicals. *J Toxicol Pathol* 18: 141-157.
- Youle R, Strasser A. (2008). The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 47-59.
- Zhao W, Wang H, Liu J, Tan P, Luo X, Zhu S, Chen X, Zhou B. (2018). Positive PCNA and Ki-67 expression in the testis correlates with spermatogenesis dysfunction in fluoride-treated rats. *Biol Trace Elem Res* 186: 489-497.
- Zambrano E, Guzmán C, Rodríguez-González G, Durand-Carbajal M, Nathanielsz P. (2014). Fetal programming of sexual development and reproductive function. *Mol Cell Endocrinol* 382(1):538-549.
- Zambrano E, Nathanielsz P, Rodríguez-González G. (2021). Developmental Programming and Ageing of Male Reproductive Function. *Eur J Clin Invest* 51(10):1-13.
- Zamora J, Otárola I, Brenes O. (2005). La apoptosis y su relación con diversos nutrientes. *Rev Chil Nutr* 32: n.3 178-190.