



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IMPACTO DE LA OBESIDAD MATERNA DE LA RATA EN EL
PROCESO DE ENVEJECIMIENTO TESTICULAR DE SU CRÍA
MACHO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

PALMA DANIELA LOVERA FLORES

MÉXICO, D.F.

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
VOCAL: EUCLIDES AVILA CHÁVEZ
SECRETARIO: GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA
1er. SUPLENTE: ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS
2do. SUPLENTE: CAROLINA GUZMÁN ARRIAGA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

ASESOR DEL TEMA: _____
DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

SUPERVISOR TÉCNICO: _____
DRA. CLAUDIA JANET BAUTISTA CARBAJAL

SUSTENTANTE: _____
PALMA DANIELA LOVERA FLORES

INDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
1.	Obesidad.....	2
2.	Daños al sistema reproductivo por el envejecimiento y la obesidad.....	3
3.	Obesidad, envejecimiento y su relación con el estrés oxidante.....	9
4.	Programación del desarrollo.....	16
5.	Obesidad materna y daños en la función reproductiva: estudios epidemiológicos.....	19
6.	Exceso de nutrición materna sobre: modelos animales.....	20
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
IV.	HIPÓTESIS.....	23
V.	OBJETIVOS.....	24
VI.	METODOLOGÍA.....	25
1.	Animales experimentales: modelo biológico.....	25
2.	Diseño experimental.....	25
3.	Dieta experimental.....	26
4.	Obtención de muestras biológicas.....	27
5.	Tinción de Hematoxilina – Eosina.....	28
6.	Medición del área del túbulo seminífero.....	29
7.	Cuantificación de espermatogonias y espermatocitos.....	29
8.	IHC de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx-1/2 y 5, GPx-4) y marcador de especies reactivas de nitrógeno (NT).....	30
9.	Análisis estadístico.....	31
VII.	RESULTADOS.....	32
1.	Peso corporal y del testículo de crías a los 110d, 450d y 650d.....	32
2.	Grasa gonadal de crías a los 110d, 450d y 650d.....	33

3. Área del túbulo seminífero de crías a los 110d, 450d y 650d.....	34
4. Conteo celular de espermatogonias y espermatocitos de crías a los 110d, 450d y 650d.....	35
5. IHC de SOD-1 y microfotografías representativas de túbulos seminíferos de crías a los 110d, 450d y 650d	37
6. IHC de GPx-1/2 y 5 y microfotografías representativas de túbulos seminíferos de crías a los 110d, 450d y 650d.....	38
7. IHC de GPx-4 y microfotografías representativas de túbulos seminíferos de crías a los 110d, 450d y 650d.....	39
8. IHC de CAT y microfotografías de túbulos seminíferos de crías a los 110d, 450d y 650d.....	40
9. IHC de NT y microfotografías representativas de túbulos seminíferos de crías a 110d, 450d y 650d.....	41
VIII. DISCUSIÓN.....	42
IX. CONCLUSIÓN.....	51
X. BIBLIOGRAFÍA.....	52
1. APENDICE	
1.A. Procedimiento para la elaboración de dietas experimentales.....	59

I. RESUMEN

Antecedentes: la Organización Mundial de la Salud denomina a la obesidad como “la epidemia del siglo XXI y en México, afecta a la población en general por lo que se han implementado programas de salud que tienen como objetivo crear conciencia. La hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad propone que los cambios en el ambiente intrauterino afectan al individuo en desarrollo, sin embargo, poco se sabe de los efectos de la programación negativa, producto del consumo de una dieta materna alta en grasas, relacionada con la función reproductiva. La obesidad materna se ha asociado con un aumento del estrés oxidante caracterizado por un desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres y los sistemas antioxidantes (proceso normal durante el metabolismo celular), que dé lugar a presentar problemas en la fertilidad masculina, acentuándose más durante el envejecimiento. **Objetivo:** estudiar los efectos de la obesidad materna de la rata sobre la función reproductiva de las crías macho durante su envejecimiento. **Métodos:** Se emplearon ratas hembra de la cepa Wistar alimentadas con dietas control (C= 5% grasa vegetal- 4 kcal/g) y alta en grasa (OM= 20% grasa animal - 5 kcal/g) durante su crecimiento (21-120 días), en gestación y lactancia. Los descendientes machos de ambos grupos (C y OM) se destetaron a los 21 días (d) y se alimentaron con dieta C durante todo el experimento. A los 110d, 450d y 650d se registró el peso corporal, testicular y gonadal (n= 5 ratas/grupo/edad). El testículo derecho se fijó e incluyó en parafina y posteriormente se realizó el estudio morfométrico de cortes transversales por la técnica de hematoxilina y eosina para determinar área (μm^2) del túbulo seminífero, además de realizar el conteo celular de espermatogonias y espermatocitos. Por último se utilizó el método de inmunohistoquímica para conocer el porcentaje de área de las enzimas antioxidantes SOD-1, CAT, GPx-1,2 y 5, GPx-4 y el marcador de especies reactivas de nitrógeno NT en testículo. **Resultados:** El peso corporal del grupo OM fue mayor que el grupo C a 450d y 650d. Con respecto al peso del testículo no hubo diferencias significativas, sin embargo, el grupo OM presenta mayor grasa gonadal en comparación con C a los 110d y 450d. El área del túbulo seminífero, así como, el número de espermatogonias disminuye en el grupo OM en comparación con el grupo C a las diferentes edades de estudio. En relación a los espermatocitos disminuyen en número en el grupo OM comparado con C a 110d y 650d. En cuanto al porcentaje de área inmunoteñida de las enzimas antioxidantes, en SOD-1 observamos en el grupo OM menor área de inmunotinción a 110d y mayor a 450d y 650d con respecto a C. GPx-1,2 y 5 presentó mayor porcentaje de área inmunoteñida en el grupo OM a 110d comparado con C. GPx-4 presentó menor expresión a 450d en el grupo OM con respecto al C, y a 650d se incrementó en OM comparado con C. En relación a CAT y NT en el grupo OM presentan mayor porcentaje de área teñida respecto al grupo C a los diferentes días del estudio. **Conclusión:** El presente trabajo demostró que la obesidad materna afecta la función reproductiva de los descendientes y se acentúa conforme a la edad, lo cual podría dar pauta a proponer nuevos estudios que se focalicen sobre los efectos de la calidad de la dieta materna y los procesos de establecimiento, maduración y desarrollo del eje reproductivo masculino y su relación con el envejecimiento.

II. INTRODUCCIÓN

1. Obesidad.

La obesidad es el principal factor de riesgo modificable, es una enfermedad sistémica, crónica y multicausal (Barrera, Rodríguez et al. 2013). Se caracteriza principalmente por un desequilibrio energético debido a la disminución en el gasto de energía respecto a la ingesta calórica. Además existen causas subyacentes, como la disminución de la actividad física producto del estilo de vida sedentario, la automatización de las actividades laborales y los modernos medios de transporte (Rivera Dommarco, Hernández Ávila et al. 2012)

El aumento de obesidad en México se encuentra entre los más documentados en el plano mundial. La prevalencia combinada de sobrepeso u obesidad ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) es mayor en las mujeres (73.0%) que en los hombres (69.4%), así mismo la incidencia de obesidad ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) es más alta en el sexo femenino que en el masculino. De 1988 a 2012, el sobrepeso en mujeres de 20 a 49 años de edad se incrementó de 25 a 35.3% y la obesidad de 9.5 a 35.2% (Gutierrez, Rivera-Dommarco et al. 2012), razón por la cual la atención a la mujer obesa en edad fértil trae nuevos retos para los especialistas encargados de garantizar la salud de la población ya que es un estado de alto riesgo no sólo para la madre en el momento del embarazo (Cnattingius, Villamor et al. 2013, Minsart, Buekens et al. 2013, Tenenbaum-Gavish and Hod 2013) sino también para su descendencia.

El concepto de la programación del desarrollo actualmente conocido como la hipótesis del desarrollo de la salud y la enfermedad (DoHAD) ha sido bien aceptado gracias a la recopilación de estudios tanto epidemiológicos como con animales de experimentación que han manipulado factores específicos como: cambios en la dieta con reducción moderada y severa de la ingesta de calorías: dietas bajas en proteínas, dietas altas en grasas entre otros procedimientos.

Varios modelos animales se utilizan para estudiar los efectos del exceso de nutrición durante la gestación y el periodo posnatal temprano en las crías en desarrollo, para poder controlar los factores ambientales que constantemente cambian durante los estudios epidemiológicos humanos. Dentro del tema de la obesidad materna, actualmente el modelo más utilizado es el de las madres alimentadas con dietas ricas en grasas (HFD por sus siglas en inglés high fat diet – fed mothers) (Rivera Dommarco, Hernández Ávila et al. 2012). De acuerdo con Taylor and Poston (2007) los descendientes de madres alimentadas con una

dieta alta en grasa durante el embarazo y la lactancia, en la vida adulta presentan alteraciones fisiológicas, metabólicas, cognitivas entre otras, lo anterior es independiente de la dieta posdestete. Sin embargo, es probable que esta exposición materna a una dieta alta en grasa contribuya significativamente en la descendencia a padecer alteraciones en la función reproductiva (Connor, Vickers et al. 2012).

La evidencia científica señala una fuerte asociación entre la obesidad y los trastornos reproductivos, y actualmente pocos son los estudios acerca de la mala nutrición de la madre y de sus efectos sobre la fertilidad de la descendencia (Zambrano, Guzman et al. 2014). No obstante la investigación en animales de experimentación, ha comprobado que en hembras descendientes de ratas alimentadas con una dieta alta en grasas durante la gestación y lactancia presentan una temprana maduración sexual y fase de proestro prolongada (Sloboda, Howie et al. 2009, Connor, Vickers et al. 2012).

Esta información nos permite establecer que en el caso de los machos la obesidad materna, también podría afectar a diferentes aspectos de la salud reproductiva, como son la diferenciación celular de espermatogonias y espermatocitos en el testículo, cambios morfométricos del túbulo seminífero y la expresión de enzimas antioxidantes que garantizan que las funciones espermáticas de este órgano no se vean afectadas por el estrés oxidativo (Aitken and Roman 2008), el cual en determinados contextos se ha asociado con la obesidad. Sin embargo, el envejecimiento también juega un papel importante en la aparición tardía de algunos resultados adversos en la reproducción que probablemente reflejen el agotamiento de la función que fue inicialmente adecuada para mantener la fertilidad (Zambrano, Guzman et al. 2014).

2. Daños al sistema reproductivo por el envejecimiento y la obesidad.

El sistema reproductivo masculino tanto en el humano como en la rata está constituido por dos testículos, sistema de conductos excretores (epidídimo, conducto deferente y eyaculador), las glándulas sexuales anexas (vesícula seminal, próstata y glándulas bulbouretrales) y el pene (**Figura 1.**) (Tresguerres 1999, Ross, Kaye et al. 2006).

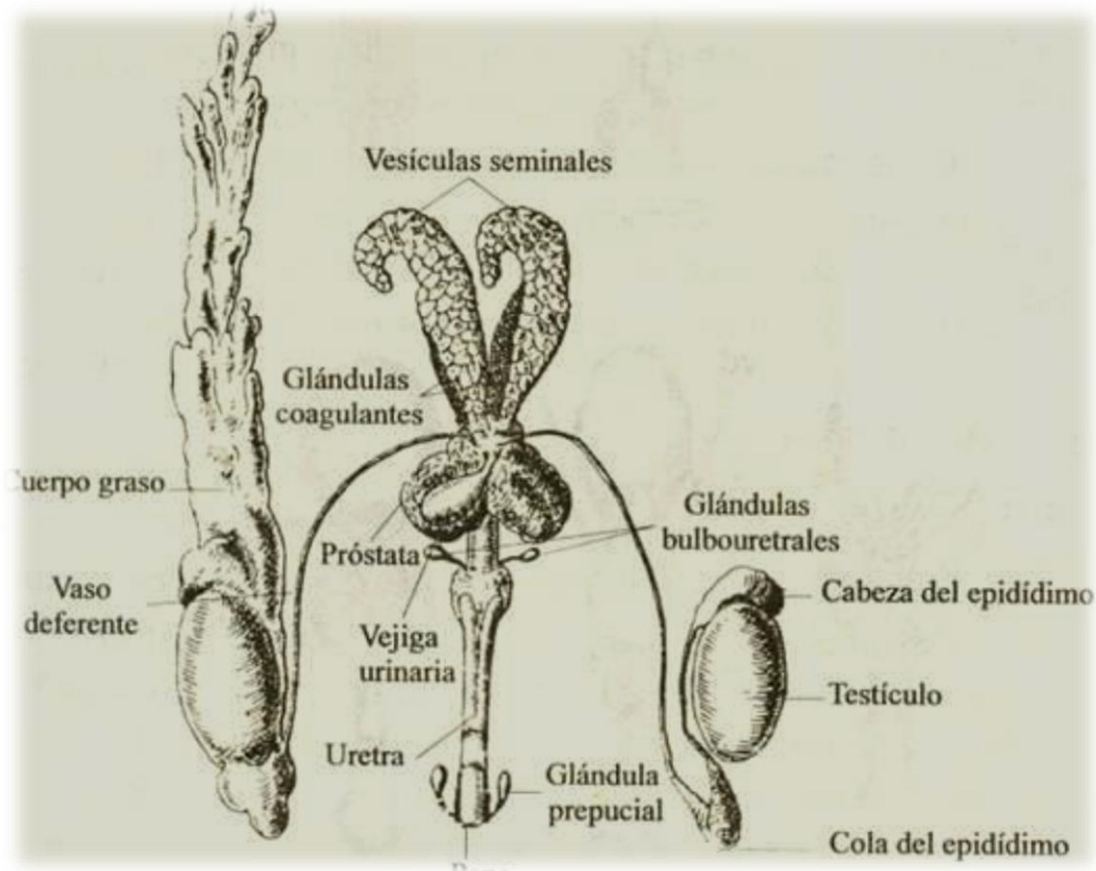


Figura 1. Aparato reproductor masculino de la rata. Modificado de Setchell (1978)

El funcionamiento del aparato reproductor del macho y del testículo son regulados por la interacción de señales hormonales y neurales entre el sistema nervioso central, el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas masculinas (Drucker 2005, Ross, Kaye et al. 2006). Cada testículo está dividido en lobulillos los cuales contienen túbulos seminíferos contorneados, implicados en dos funciones: la producción de espermatozoides (espermatogénesis) y una función endocrina; síntesis de hormonas esteroideas, como progestágenos, andrógenos y estrógenos (esteroidogénesis). Los andrógenos como la testosterona, son esenciales en la producción de células germinales (espermatogonias, espermatoцитos, espermátides y espermatozoides) y en la secreción de las glándulas accesorias (Curtis and Barnes 1996, Ross, Kaye et al. 2006, O'Shaughnessy, Morris et al. 2009). Por lo anterior un insulto a este sistema sobre todo en etapas del desarrollo, puede tener un efecto adverso en aspectos estructurales o funcionales (Makris 2011).

Las alteraciones relacionadas con la exposición del sistema reproductivo a factores ambientales, físicos o químicos, pueden ir desde la gametogénesis alterada, malformaciones de las gónadas y estructuras accesorias, cambios durante el desarrollo normal o senescencia, trastornos de la función reproductiva (por ejemplo, la infertilidad), perturbación del desempeño sexual, mal funcionamiento o patologías del órgano reproductivo, hasta el desarrollo de cáncer (Makris 2011).

En el caso específico del envejecimiento se describe como un proceso que se asocia con la disminución de la función fisiológica, metabólica, reproductiva, así como de los sistemas sensoriales (Ottinger, Abdelnabi et al. 2004). Tanto las mujeres como los hombres experimentan un descenso gradual y progresivo de la función reproductiva a medida que envejecen. La senescencia del sistema reproductivo masculino se caracteriza por la reducción en la secreción de testosterona; alteraciones en la regulación hipotalámica / pituitaria de la función testicular, cambios estructurales en los testículos, el pene y glándulas sexuales accesorias así como perturbaciones en la espermatogénesis, función sexual y la fertilidad (Gruenewald 2004).

La espermatogénesis es un proceso dinámico en el que las células precursoras se dividen y forman una célula de reemplazo, que posteriormente da lugar a una población de espermatogonias, las cuales según sus características nucleares se dividen en tres tipos: espermatogonias tipo A oscuras, que tienen núcleo ovoide con cromatina y finas granulaciones; espermatogonias tipo A claras, que tienen núcleo ovoide con cromatina que se tiñe ligeramente y finas granulaciones; y espermatogonias tipo B, que por lo general tienen núcleo esférico con cromatina condensada (Setchell 1978, Weinbauer and Nieschlag 1993., Ross, Kaye et al. 2006). Las espermatogonias oscuras son células diploides que se dividen por mitosis y generan dos grupos de células, uno que tiene la capacidad de seguir multiplicándose y otro (espermatogonias claras) que inician la meiosis y su diferenciación a espermatozoide. Una característica de la división de las espermatogonias es que las células hijas permanecen unidas a través de un puente citoplasmático. Las conexiones son esenciales para el desarrollo sincrónico. Estas conexiones citoplasmáticas se mantienen intactas hasta los últimos estadios de maduración de las espermátides (Setchell 1978, Weinbauer and Nieschlag 1993., Ross, Kaye et al. 2006). Por otro lado los espermátocitos primarios son producidos por la división mitótica de las espermatogonias tipo B. Los espermátocitos primarios entran en la primera profase de la división meiótica, en la que se

produce el entrecruzamiento de la información genética entre los cromosomas homólogos y después continúan con la meiosis. Las células derivadas de la primera división meiótica son los espermátocitos secundarios. Estas células son más pequeñas que sus progenitores y pasan inmediatamente a la segunda división meiótica y como resultado se producen las espermátides haploides (Setchell 1978, Weinbauer and Nieschlag 1993., Geneser 2000, Ross, Kaye et al. 2006). Estas a su vez se someten a un complejo proceso de diferenciación morfológica y funcional que resulta en la producción de espermatozoides maduros.

De acuerdo a lo anterior existen varias posibilidades de asociación entre las células en desarrollo, lo que se conoce como los estadios del ciclo de la espermatogénesis; en la rata se han estudiado de I a XIV estadios presentes en el desarrollo de la célula espermática (Russell, Alger et al. 1987). Sin embargo no todas las células germinales alcanzan la madurez, y la muerte espontánea, parece ser una característica constante de la espermatogénesis normal en una variedad de especies de mamíferos. En la rata adulta, esta pérdida incurre principalmente durante el desarrollo de las espermatogonias (hasta un 75%) y en menor medida durante las divisiones de maduración de espermátocitos y el desarrollo de la espermátide. Diversos estudios han demostrado que de manera natural y por diversos estímulos reguladores (disminución de gonadotropinas, tratamiento de estradiol, tratamiento de testosterona, aumento de la temperatura testicular, agentes quimioterapéuticos) hay un aumento en la muerte de células germinales (Sinha Hikim, Lue et al. 2003).

Los mecanismos celulares implicados en los cambios estructurales en específico, la atrofia del epitelio seminífero durante el envejecimiento son actualmente objeto de debate, aunque informes recientes sugieren que la apoptosis puede ser el principal mecanismo implicado en la pérdida de células germinales (Geneser 2000, Morales, Pastor et al. 2003), las cuales se organizan en capas concéntricas que se extienden desde la zona basal hasta el lumen del túbulo (Tiba, Yoshida et al. 1993). El trabajo realizado por Morales, Pastor et al. (2003), examinó los cambios en la proliferación y apoptosis en el epitelio seminífero de hámsters sirios *Mesocricetus auratus* de 24 meses y se compararon con hámsters de 6 meses (la proliferación de las células germinales se estudió mediante marcaje de bromodesoxiuridina y la apoptosis se evaluó por microscopía electrónica de transmisión y marcaje *in situ* por la técnica de TUNEL); los animales de 24 meses mostraron una disminución significativa tanto en la proliferación como en el número total de espermatogonias y espermátocitos. El número de células germinales apoptóticas (confirmada

por características morfológicas como la condensación de la cromatina y fragmentación nuclear) por unidad de volumen y por testículo, así como el índice de apoptosis ($24.8 \pm 1.6\%$) fueron significativamente mayores en animales de edad avanzada en comparación con los animales más jóvenes ($30.8 \pm 1.2\%$), por lo que ellos sugieren que la disminución en la proliferación de las espermatogonias y el aumento en la apoptosis constituyen dos mecanismos consecutivos correlacionados con el envejecimiento.

En muchos hombres de edad avanzada, los daños a este sistema se ve agravado por los efectos de enfermedades comórbidas (por ejemplo, obesidad, la diabetes mellitus, insuficiencia renal, y el abuso del alcohol), y medicamentos (por ejemplo, medicamentos psicoactivos y glucocorticoides) que suprimen la concentración de testosterona (Gruenewald 2004). Hasta hace poco, la posible relación entre la obesidad y la reproducción masculina había sido poco explorada (Teerds, de Rooij et al. 2011). De acuerdo con Erdemir, Atilgan et al. (2012) estudios que informan de la relación entre la obesidad y la infertilidad masculina, han propuesto varios mecanismos para explicar esta conexión, uno de ellos es la aromatización de testosterona (**Figura 2**), paso clave en la síntesis de estrógeno, catalizada por el sistema enzimático aromatasa (altamente expresado en el tejido adiposo periférico), que convierte la testosterona en estradiol. Esta conversión periférica puede resultar en la disminución de la concentración de testosterona y el aumento de la concentración de estradiol que puede inhibir la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), LH (Hormona Luteinizante) y FSH (Hormona Folículo Estimulante). Sin embargo la deficiencia de andrógenos encontrados en los hombres que son obesos o tienen síndrome metabólico puede ser una explicación de los problemas con la disfunción eréctil y la espermatogénesis. No obstante, muchas otras hormonas asociadas con la obesidad pueden alterar el potencial reproductivo masculino (Cabler, Agarwal et al. 2010).

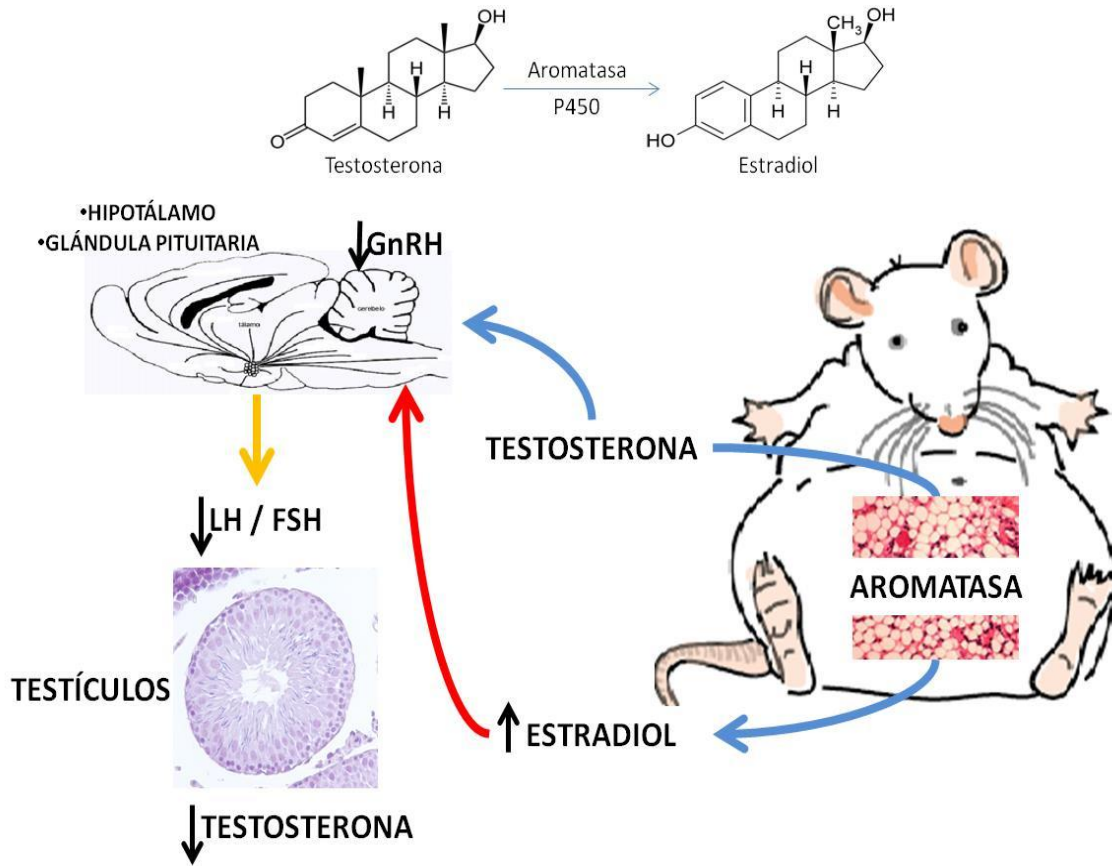


Figura 2. Mecanismo que explica la relación entre la obesidad y la infertilidad masculina.

La revisión efectuada por George and Anderson (2013) acerca de los efectos de la obesidad sobre la función reproductora masculina reporta que en los hombres obesos hay pruebas que sugieren que las tres poblaciones de células testiculares: células de Leydig, células de Sertoli y las células germinales aparecen deterioradas funcionalmente lo que resulta en la disminución del conteo de espermatozoides y su calidad, muestra de ello es lo que se informó por primera vez en una cohorte elaborada para el servicio militar en Dinamarca, reportando reducción en la concentración de espermatozoides y el recuento total de espermatozoides en hombres con sobrepeso. Otra de las revisiones acerca del impacto de la obesidad sobre la fertilidad masculina, la función y composición molecular del semen, realizada por Palmer, Bakos et al. (2012) documenta que hay nuevas pruebas acerca de los efectos negativos de la obesidad masculina sobre el potencial reproductivo que no sólo abarcan la reducción en la calidad del semen, sino que además incluyen modificaciones de la

estructura física y molecular de las células germinales en los testículos y el espermatozoide maduro en última instancia.

Dentro de los estudios llevados a cabo en animales de experimentación (ratas macho Sprague–Dawley) se tiene el realizado por Viguera-Villasenor, Rojas-Castaneda et al. (2011) cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la obesidad en el epitelio germinal en ratas controles y ratas obesas inducidas por una dieta alta en grasas; observaron que el grupo de ratas obesas, presentó un aumento en la concentración de estradiol y una disminución en la concentración de testosterona, además de revelar que no hubo alteraciones estructurales en los túbulos seminíferos, refiriendo que la espermatogénesis no se vio alterada, y a pesar de que no encontraron daño estructural en los testículos, sí informaron una reducción en la concentración espermática, la motilidad y la viabilidad. Por otro lado Wang, Liu et al. (2007) quienes investigaron los efectos de la obesidad inducida por la dieta en el proceso de desarrollo de los testículos en ratas púberes (21 días de edad) reportaron que el grupo que fue alimentado con una dieta alta en grasas incrementó su peso corporal al final de la tercera semana, y que a los 42d fue 26.6% más pesado que el grupo control, también observaron que el nivel de testosterona disminuyó, la concentración de estradiol bajó al final de la tercera, cuarta y quinta semana pero aumentó dramáticamente a los 63d, con diferencias significativas entre los dos grupos; además de lo anterior, reportaron que el examen con microscopio mostró que las células epiteliales de espermatogénesis estaban dispuestas en desorden, además de verse reducido el número de espermatozoides maduros.

La evidencia anteriormente descrita nos sustenta que el envejecimiento como la obesidad altera el eje reproductivo tanto en animales experimentales como en seres humanos (Olivares, Mendez et al. 2010) y varios factores que están alterados pueden explicar este efecto. Sin embargo, la obesidad *per se* también se relaciona con el estrés oxidativo sistémico (como aumento de la producción de radicales libres en el tejido adiposo) (Furukawa, Fujita et al. 2004), por lo que su estudio cobra importancia debido a que si bien la reproducción es necesaria para la permanencia de la especie, es una actividad costosa (Salomon, Hackenhaar et al. 2013).

3. Obesidad, envejecimiento y su relación con el estrés oxidante.

La reproducción es un proceso complejo que garantiza la perpetuidad de las especies así como la transmisión de los caracteres hereditarios. Los animales para llevar a cabo este

proceso, deben conjugar una diversidad de factores que hacen que todos los tejidos y órganos funcionen de manera coordinada e integrada. Esta integración involucra al sistema nervioso central (hipotálamo), la hipófisis anterior y las gónadas (testículos), cuya comunicación se realiza mediante las hormonas (Matheus and López Ortega 2004.).

La interacción hipotálamo-hipófisis es un punto clave que garantiza a nivel testicular la síntesis de la hormona testosterona, responsable de los caracteres sexuales secundarios de los machos, del funcionamiento de las glándulas genitales accesorias y de colaborar en la formación del espermatozoide. Para que ocurra esta síntesis, se requiere que tenga lugar la transformación del colesterol en pregnenolona a nivel mitocondrial, paso por el cual hay producción de radicales libres (especie capaz de existir en general por muy cortos períodos de tiempo, que posee uno o más electrones desapareados) (Matheus and López Ortega 2004.).

La espermatogénesis como ya se mencionó anteriormente es un proceso de diferenciación de las células germinales caracterizado por la modificación estructural de muchos orgánulos, incluyendo las mitocondrias, que desempeñan un papel único. El desarrollo morfológico y funcional de la mitocondria de las células germinales es un reflejo del cambio permanente en el microambiente testicular producido cuando las células germinales se mueven lentamente desde la base del epitelio seminífero al lumen (Meinhardt, Wilhelm et al. 1999).

De acuerdo con Michalakis, Mintziori et al. (2013) diversas referencias sugieren que el aumento del estrés oxidante está relacionado con la obesidad, ellos reportan los siguientes antecedentes: 1) desde hace más de treinta años fue descrita la hipótesis acerca de que la acumulación de tejido graso en la región suprapúbica y el muslo provoca elevadas temperaturas escrotales y que además puede tener efectos perjudiciales sobre la espermatogénesis; 2) también informa que la acumulación de grasa está relacionada con el aumento del estrés oxidante y la peroxidación lipídica; 3) pone como antecedente que las especies reactivas de oxígeno (ROS), causan peroxidación de lípidos, y son extremadamente tóxicas para los espermatozoides humanos, lo que implica un papel importante para el estrés oxidante como causa de infertilidad masculina; 4) refiere que las ROS generadas endógenamente también se han relacionado con un aumento en la fragmentación de DNA del esperma; 5) también documenta que el estrés y la posterior peroxidación de lípidos puede afectar a la membrana plasmática del espermatozoide; por lo

anterior de acuerdo con Michalakis, Mintziori et al. (2013) esto podría conducir a la disminución de la motilidad y la disfunción de la membrana posiblemente al alterar el intercambio iónico de la membrana celular, que es esencial para la motilidad de los espermatozoides, además indica que el índice de fragmentación del DNA se ha encontrado elevado en los hombres obesos lo cual puede reflejar un estado oxidativo anormal en el microentorno y el conducto eferente testicular.

Uno de los estudios que figura en la revisión de Michalakis, Mintziori et al. (2013) es la de Vincent, Innes et al. (2007) quienes proponen que la obesidad puede ser un estado de estrés oxidante crónico, siendo el mecanismo que subyace en el desarrollo de comorbilidades de la obesidad, ellos buscaron artículos publicados entre 1975 y 2006 en Medline donde evaluaron biomarcadores de estrés oxidante en seres humanos con sobrepeso y obesidad; encontrando que la obesidad eleva el estrés oxidante en poblaciones jóvenes, viejos y enfermos, esto de acuerdo a un aumento en la peroxidación de lípidos (malondialdehído, hidroperóxidos, 4-hidroxinonal, isoprostanos, dienos conjugados) o en productos de oxidación del DNA (8-hidroxi-desoxiguanosina); la peroxidación lipídica encontraron que se asocia con el índice de adiposidad y una baja en los sistemas de defensa antioxidante; y puede exacerbarse el estrés oxidante con el ejercicio agudo, la edad avanzada o condiciones clínicas coexistentes y puede ser corregido mediante la mejora de las defensas antioxidantes a través de la cirugía, los agentes farmacológicos, el ejercicio y/o modificación de la dieta; concluyendo que el estrés oxidante está relacionado con la obesidad, pero que es reversible con una o más intervenciones descritas anteriormente.

En relación a los daños al sistema reproductivo respecto al envejecimiento (proceso normal asociado con una alteración progresiva de las respuestas homeostáticas adaptativas del organismo, que provocan cambios en la estructura y función de los diferentes sistemas y además aumenta la vulnerabilidad del individuo al estrés ambiental y a la enfermedad) se han propuesto varios mecanismos moleculares, uno de ellos es el daño oxidante de la célula, en particular, la acumulación de mutaciones en el DNAm, el cual se determina por la tasa de producción de especies reactivas de oxígeno y la degradación inducida por los sistemas de defensa antioxidante (Camougrand and Rigoulet 2001), otro de los mecanismos es el daño acumulativo por ROS generadas durante el metabolismo aeróbico, en este proceso se encuentran implicadas las mitocondrias siendo el blanco principal de los radicales libres (Amaral, Oliveira et al. 2008). Durante el metabolismo oxidante normal, las células convierten

continuamente oxígeno molecular en el anión superóxido ($O_2\bullet^-$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La respiración mitocondrial, que normalmente consume aproximadamente el 90% del oxígeno utilizado por las células, se considera que es la principal fuente de oxígeno reactivo; el $O_2\bullet^-$ es generado por las mitocondrias cuando los electrones son liberados de la cadena de transporte de electrones y se transfieren directamente al oxígeno molecular. En circunstancias en las cuales las ROS se producen más allá de la capacidad de una célula para desintoxicarse, se da como resultado el daño a las proteínas, los lípidos y / o DNA, y se han implicado en un gran número de enfermedades y trastornos, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, cáncer, Isquemia / lesión por reperfusión y el envejecimiento (Chen, Cangello et al. 2001).

La teoría de los radicales libres durante el envejecimiento postula que un desequilibrio entre las ROS, especies reactivas de nitrógeno (RNS) y las defensas antioxidantes resulta importante durante la senescencia (Salomon, Hackenhaar et al. 2013). Por lo anterior y para oponerse a estas especies reactivas, los animales han desarrollado mecanismos de defensa antioxidantes (**Figura 3**). Estos se clasifican de acuerdo a la actividad enzimática, en el grupo de las ROS encontramos: la Superóxido Dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación de $O_2\bullet^-$ en H_2O_2 y oxígeno molecular (O_2), Catalasa (CAT) y Peroxirredoxinas (Prx): que actúan sobre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); la Glutación peroxidasa (GPx): que reacciona con peróxidos en general; la Glutación S-transferasa (GST): la cual está implicada en la detoxificación de xenobióticos como los plaguicidas; (Salomon, Hackenhaar et al. 2013).

SOD: son metaloproteínas que dismutan el radical $O_2\bullet^-$ en H_2O_2 y O_2 . Dependiendo del metal de transición que se encuentra en su sitio activo, las SODs se pueden clasificar en tres tipos: de cobre/zinc (Cu/Zn) SOD o SOD_{EX} que se encuentra principalmente en el citosol de eucariotas, en los cloroplastos y en algunas especies bacterianas; manganeso (Mn) SOD ubicada en las mitocondrias de eucariotas y procariotas y el hierro (Fe) SOD en procariotas. Específicamente, SOD_{EX} se localiza predominantemente en la matriz extracelular (90-99%) de los tejidos, así como en los fluidos extracelulares. En la rata, la expresión y/o actividad de la forma extracelular de Cu/Zn SOD se ha detectado en varios tejidos, como en el epidídimo, cerebro, pulmón, y los testículos. En el testículo de rata, los estudios han demostrado que además de producir SOD citosólica y mitocondrial, las células de Sertoli también son capaces de sintetizar y secretar la forma extracelular, SOD_{EX}. La caracterización estructural de SOD_{EX} se purificó a partir de un medio de células de Sertoli, por el método de HPLC se

reveló que esta molécula es una proteína dimérica de 68 kDa que consta de dos subunidades de 35 (SOD_{EX}- α) y 33 (SOD_{EX}- β) kDa. La presencia de SOD_{EX} en células de Sertoli se verificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, además, múltiples experimentos han utilizando lotes aislados de células germinales de ratas adultas que consisten en gran medida de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas redondas (los espermatozoides fueron retirados mediante dos filtraciones sucesivas a través de lana de vidrio), se reveló que las células germinales expresan sólo alrededor de un tercio de SOD_{EX} cuando se compara con las células de Sertoli. Sin duda, el alto nivel de SOD_{EX} se encuentra en las células de Sertoli, no es de extrañar si se tiene en cuenta el área de superficie relativamente grande que está en constante contacto con las células germinales en todas las etapas de desarrollo. Un bajo nivel de SOD_{EX}, en el testículo, no sólo hace que este órgano sea susceptible al daño inducido por radicales libres, sino que también alteraría las funciones testiculares y daría lugar a la pérdida de la homeostasis (Mruk, Silvestrini et al. 2002).

CAT: es una enzima tetramérica de 240 kDa que ha sido identificada en la mayoría de los tejidos de mamíferos, en los que hay presencia de orgánulos subcelulares llamados peroxisomas. Esta enzima es muy abundante en el hígado, y específicamente cataliza la degradación de H₂O₂ a O₂ y H₂O. En un estudio realizado por Zini and Schlegel (1997) se detectó por *northern blot* e *hibridación in situ* la transcripción de un solo RNAm de 2.5 kb en el testículo, epidídimo, conductos deferentes, próstata y el hígado, utilizando una sonda de DNAC para CAT. Los niveles del transcrito de RNAm de CAT fueron significativamente inferiores en los órganos reproductores masculinos (testículos de ratas control de 60d, de ratas de 10 a 90d y en ratas que fueron sometidas a ligadura del conducto eferente) en comparación con el hígado. Este último hallazgo concuerda con los estudios de proteínas que muestran que en el testículo, la actividad enzimática de catalasa es aproximadamente 5% de la media en el hígado (Peltola, Huhtaniemi et al. 1992).

GPx: Es una enzima dependiente de Selenio (Se), encargada de catalizar el paso de H₂O₂ y lipoperóxido a H₂O o sus respectivos alcoholes, esto utilizando glutatión reducido (GSH), este reacciona con peróxidos y los transforma en H₂O y en alcohol durante este proceso donde el glutatión es oxidado (GSSH), y después pasa a su estado reducido por la glutatión reductasa (GR): $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSH} + \text{H}_2\text{O}$ (Segura-Campos, Chel-Guerrero et al. 2013). De acuerdo con el estudio realizado por Dreher, Schmutzler et al. (1997) donde

evaluaron varias líneas celulares y tejidos que naturalmente son expuestos a estrés oxidativo endógeno o exógeno, se examinó el patrón de transcritos de selenoproteínas tanto en ratas como en humanos. En los testículos de rata se obtuvo una alta expresión de GPx-4 (PHGPx), y una señal muy débil de GPx-1. En el riñón, el bazo, el corazón, hígado y pulmón de rata los niveles de RNAm de GPx-1 son más altos que los de GPx-4; para ambas selenoproteínas se obtuvieron sólo señales débiles en cerebro. Los resultados por Northernblot relativos a la distribución de GPx-1 en tejidos de rata fueron totalmente compatibles con la actividad. Por otro lado ninguno de los tejidos humanos reveló una señal de RNAm para GPx-4, mientras que la transcripción de selenoproteína P estuvo presente en todos los tejidos humanos con mayor abundancia en el corazón, el hígado y el pulmón; tejidos que también mostraron señales fuertes de GPx-1. El hígado en el humano fue el órgano que mostró la expresión de la mayoría de las selenoproteínas, debido a que tiene que hacer frente a ROS producidas durante las reacciones de desintoxicación. Las líneas celulares humanas del sistema mieloide que puedan estar expuestas a estrés oxidativo durante los procesos inflamatorios mostraron distintas señales de GPx-1; las células epiteliales mostraron señales bajas de GPx-1. Niveles similares de RNAm de GPx-1 se mostraron en tejido tiroideo de pacientes sanos, y en células de carcinoma de tiroides. Sus datos confirman la necesidad de obtener información sobre patrones específicos de expresión de selenoproteínas de células y tejidos como criterios de valoración de la cantidad de selenio y la función biológica de la familia de selenoproteínas, ya que el análisis del contenido total de selenio de tejidos o fluidos corporales sólo proporciona información integral sobre el estado de selenio global en individuos.

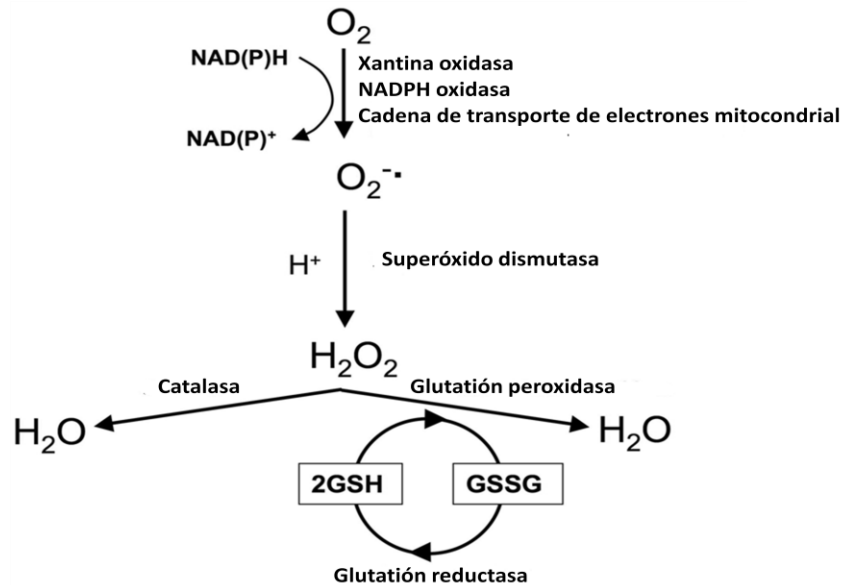


Figura 3. Las principales vías de producción de especies reactivas de oxígeno y el metabolismo. El superóxido puede ser generado por enzimas especializadas, tales como las de xantina o NADPH oxidasas, o como un subproducto del metabolismo celular, en particular la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La superóxido dismutasa convierte entonces la superóxido a peróxido de hidrógeno, que tiene que ser eliminado rápidamente del sistema. Esto se consigue generalmente por la catalasa o peroxidasas, tales como las peroxidasas de glutatión que utilizan glutatión reducido (GSH) como el donador de electrones (Aitken and Roman 2008).

En el caso específico de las **RNS**, el daño mediado por radicales libres a las proteínas resultan en la modificación de residuos de aminoácidos, la reticulación de las cadenas laterales y la fragmentación. La mayoría de las proteínas contienen residuos de tirosina con una abundancia natural de alrededor del 3%. Como consecuencia, la tirosina es a menudo la superficie expuesta en las proteínas y está por lo tanto disponible para la modificación como lo es la nitración, lo que resulta en la formación de 3-nitrotirosina (3-NT). El peroxinitrito (ONOO^-), es un importante agente de nitración *in vivo*. Sin embargo, no es la única fuente de la formación *in vivo* de la 3-NT. El óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO_2), ácido nitroso (HNO_2), cloruro de nitrilo, y ciertas peroxidasas derivadas de células inflamatorias (leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos) pueden mediar en la nitración de tirosina para formar 3-NT. Por lo tanto, es probable que la nitrotirosina no sea sólo una huella del peroxinitrito, sino más generalmente un marcador de estrés nitrativo (Ahsan 2013).

Kondo, Ishikawa et al. (2008) reporta que el óxido nítrico (NO), un radical libre con un papel bien descrito como un mensajero intracelular e intercelular en un número de sistemas

biológicos y que se forma a partir de la L -arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS). Tres isoformas distintas de NOS se han identificado (es decir, NOS neuronal [nNOS], inducible NOS [iNOS], y NOS endotelial [eNOS]). Un aumento en la expresión de la proteína iNOS y la producción de NO se ha observado en modelos animales de torsión testicular, y el inhibidor de iNOS se ha demostrado que protege contra la lesión testicular en la isquemia-reperfusión.

Una evidencia experimental respecto a la presencia de la NT en testículo es el trabajo realizado por (Kim, Byun et al. 2007) quienes examinaron la expresión de las tres isoformas de la NOS en testículos de cerdos. Los estudios de Inmunohistoquímica demostraron que la presencia de nNOS, iNOS y eNOS en células intersticiales, espermatoцитos primarios y espermátidas. Se detectaron inmunorreacciones positivas para eNOS e iNOS en células mioideas peritubulares. Algunas células endoteliales vasculares fueron positivas para nNOS y eNOS. Se detectó la expresión de nitrotirosina en las células intersticiales. Además, el estudio histoquímico reveló que todas las células intersticiales se tiñeron positivamente para la NADPH-diaforasa, aunque algunas espermátidas y las células endoteliales vasculares mostraron actividad enzimática moderada. Estos hallazgos sugieren que tres isoformas de NOS se expresan en el testículo de cerdo y que desempeñan papeles importantes en la biología de las células intersticiales que producen testosterona, así como en la espermatogénesis en los túbulos seminíferos.

4. Programación del desarrollo.

Los factores genéticos y ambientales (mala alimentación en el embarazo, hipoxia fetal intrauterina, los efectos de los xenobióticos y drogas, así como trastornos hormonales) influyen en el fenotipo de un individuo, teniendo mayor injerencia en etapas tempranas del desarrollo (gestación y lactancia), dado que estas fases son vulnerables a cambios negativos o adversos, afectando, la estructura, metabolismo y función de células, tejidos y sistemas del individuo, predisponiéndolo a desarrollar enfermedades en su vida adulta (Nijland, Ford et al. 2008, Seremak-Mrozikiewicz, Barlik et al. 2014), a este proceso se le llama Programación del Desarrollo.

El concepto de la Programación del Desarrollo actualmente conocido como “Hipótesis del los Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad” (DOHaD) ha sido ya comprobado por los estudios realizados con animales de experimentación demostrando los cambios que se generan: 1) restricción nutricional o sobrealimentación durante el embarazo y

la lactancia; 2) restricción del flujo sanguíneo útero placentario; 3) exposición fetal a concentraciones altas de glucocorticoides, y 4) diabetes materna gestacional experimental (Zambrano 2009).

El feto hace adaptaciones de predicción en respuesta a señales intrauterinas, dando lugar a ajustes permanentes en la homeóstasis de órganos y sistemas del cuerpo para ayudar a la supervivencia inmediata y mejorar el éxito ante un ambiente adverso postnatal. Como resultado, estas adaptaciones, conocidas como respuestas adaptativas predictivas (Gluckman, Hanson et al. 2005, Gluckman, Lillycrop et al. 2007), pueden en última instancia ser desventajosas en la vida postnatal, lo que lleva a un aumento del riesgo a desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles en la edad adulta y/o la herencia de los factores de riesgo, promoviendo un ciclo de transmisión de enfermedades a través de generaciones.

Estudios epidemiológicos en humanos han demostrado que la nutrición intrauterina está asociada con la incidencia de ciertas condiciones crónicas en la descendencia a edad adulta (Barker, Bull et al. 1990). El invierno del hambre holandés es ejemplo de un acontecimiento que sirvió como estudio epidemiológico en humanos sobre la programación del desarrollo. De 1944 - 1945 Holanda fue ocupada por los alemanes, y a pesar de la guerra, la nutrición en los Países Bajos había sido en general suficiente hasta octubre de 1944, en donde las autoridades alemanas bloquearon el suministro de alimentos al oeste hasta el 5 de mayo de 1945. Por lo tanto, los individuos que aún estando dentro del útero y expuestos a la hambruna durante esta época, en su infancia fueron bien nutridos, habían experimentado un aumento de peso (Lumey, Stein et al. 2007). Así mismo los estudios de cohorte del invierno del hambre se utilizaron para examinar cómo la desnutrición materna durante ventanas de tiempo específicos afecta el curso posterior de la vida de aquellos descendientes que experimentaron la hambruna en la etapa gestacional.

Aunque los estudios iniciales sobre la hipótesis del fenotipo ahorrador se centraron principalmente en los efectos de la desnutrición materna, como una dieta baja en proteínas o calorías (Barker, Hales et al. 1993, Phillips, Barker et al. 1994, Frankel, Elwood et al. 1996), los estudios recientes han tratado de investigar los efectos de la sobre – nutrición materna. Una dieta alta en grasas es más un reflejo de los malos hábitos alimenticios de la sociedad actual debido al incremento en la ingesta de comida rápida o chatarra, la cual está compuesta de grasas saturadas, aditivos como conservadores, aporte bajo en fibras y vitaminas, entre otros, por lo que la exposición materna puede alterar el desarrollo de

diversos órganos, conllevando a la descendencia a ser más susceptible a enfermedades en la vida adulta. Se ha demostrado que ya que el feto o el recién nacido está experimentando una rápida división celular, los tejidos pueden ser afectados de manera diferente en función del momento de la agresión (Williams, Seki et al. 2014).

Actualmente el alcance del concepto DOHaD, se ha ampliado y da lugar a nuevos objetivos de la programación fetal, en particular aquellos estudios que buscan correlacionar los efectos de la nutrición materna y la función reproductiva (Dupont, Cordier et al. 2012). Entre los primeros estudios a largo plazo, que evaluaron los efectos de la baja nutrición en etapas pre-natal y neonatales, sobre el rendimiento reproductivo de los adultos, se llevaron a cabo en ovejas (Rhind, Elston et al. 1998, Gardner, Ozanne et al. 2009). Desde entonces ha habido informes, relativos a muchas especies, acerca de la reducción en las tasas de ovulación o el número de descendientes provenientes de animales adultos que habían sido desnutridos en etapa fetal [ratón, Meikle and Westberg (2001); oveja, Rae, Kyle et al. (2002); humano, Ibanez, Potau et al. (2002)]. En el estudio realizado por Rodriguez-Gonzalez, Viguera-Villasenor et al. (2012), donde el objetivo fue evaluar los efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo y/o lactancia en la maduración de las células de Sertoli y el desarrollo del epitelio germinal de crías de ratas macho durante el desarrollo sexual masculino postnatal (14d, 21d y 36d). Los autores describieron que al principio del embarazo, las madres fueron alimentadas con una dieta control (C: 20% de caseína) o una dieta restringida isocalórica (R: 10% de caseína), después del nacimiento de las crías, se establecieron cuatro grupos : CC, RR, RC Y CR (la primera letra es la dieta que se dio en el embarazo y la segunda letra la dieta que se dio durante la lactancia); reportando 1) que el peso corporal de las crías macho se mantuvo sin cambios, que en los grupos RR y CR el peso corporal y el peso de los testículos se redujo en todas las edades evaluadas, 2) la restricción proteínica materna retraso el desarrollo del epitelio germinal en todas las edades evaluadas, 3) el receptor de andrógenos se encontró bajo en expresión tanto por western blot e inmunohistoquímica en los tres grupos restringidos (RR, RC y CR); sugiriendo que la restricción proteínica materna durante el embarazo y/o lactancia retrasa la maduración y diferenciación de células germinales y que afecta la organización intratubular, y que probablemente estos cambios sean los responsables de la baja tasa de fecundidad en edades más avanzadas.

No obstante frente a la obesidad pocos han sido los estudios que tratan de demostrar si la sobrenutrición materna también puede afectar a diferentes aspectos de la salud reproductiva de la descendencia en la edad adulta y a su vez asociarlo con el proceso de envejecimiento, lo cual da oportunidad a seguir investigando en el campo de la programación del desarrollo.

5. Obesidad materna y daños en la función reproductiva: estudios epidemiológicos.

Ramlau-Hansen, Nohr et al. (2007) describe que: 1) la grasa es un tejido hormonalmente activo; 2) el sobrepeso y la obesidad están asociados con la fecundidad reducida tanto en mujeres como en hombres; 3) el índice de masa corporal de los hombres se ha asociado con la calidad del semen, así como niveles alterados de las hormonas reproductivas; 4) informan que el sobrepeso materno puede tener un efecto de programación sobre la calidad del semen durante la vida fetal, si un nivel alto de exposición a los estrógenos interfiere con el control hormonal de los órganos fetales masculinos urogenitales.

Hasta el momento nadie ha investigado la asociación entre el índice de masa corporal de la madre y la calidad del semen en los hijos en la edad adulta, para ello Ramlau-Hansen, Nohr et al. (2007) realizó un estudio de seguimiento en la población basado en la asociación entre el tabaquismo materno durante el embarazo y la calidad del semen, en la que encontraron efectos adversos de la exposición prenatal al tabaco en el volumen del semen, la concentración espermática y el recuento total de espermatozoides, y los datos de esta cohorte los utilizaron para examinar la asociación entre el índice de masa corporal materno antes del embarazo, la calidad del semen y los niveles de hormonas reproductivas en la descendencia.

Se seleccionaron 347 hombres de 5109 hijos de mujeres embarazadas de origen danés (1984-1987), para un estudio de seguimiento realizado de febrero de 2005 a enero de 2006. Se analizaron muestras de sangre, las características del semen, hormonas reproductivas y se relacionó con la información disponible de 328 hombres sobre el índice de masa corporal de las madres antes del embarazo (de este grupo 34 eran hijos de madres con bajo peso y 25 hijos de madres con sobrepeso).

La inhibina B disminuyó con el aumento del índice de masa corporal materno y las estimaciones puntuales de la concentración de espermatozoides, el volumen del semen, el

porcentaje de espermatozoides móviles, la testosterona y FSH les han sugerido un estado reproductivo deteriorado en los hijos de madres con sobrepeso, pero ninguna de sus tendencias fueron significativas. Ramlau-Hansen, Nohr et al. (2007) concluyeron de acuerdo a lo anterior que puede haber un efecto en la calidad del semen de los hijos, y que se requiere un estudio más amplio.

6. Exceso de nutrición materna sobre: modelos animales

Los modelos animales incluyendo tanto a la desnutrición como la sobrenutrición en el embarazo y la lactancia proporcionan una valiosa herramienta para estudiar los mecanismos subyacentes de la programación del desarrollo. Roedores y primates no humanos son mamíferos con la embriología similar a la anatomía y la fisiología de los seres humanos. No obstante los estudios con roedores son ventajosos para su estudio debido a razones prácticas y económicas y el efecto de la manipulación de la descendencia se puede ver dentro de poco tiempo (Williams, Seki et al. 2014).

Sloboda, Howie et al. (2009) emplearon un modelo establecido de programación nutricional para evaluar las influencias relativas de nutrición prenatal y postnatal en el crecimiento y la función ovárica en la descendencia femenina. Emplearon ratas wistar, las cuales al inicio del embarazo fueron alimentadas con una dieta baja en calorías, una dieta alta en grasa, o una dieta de control durante el embarazo y/o lactancia, y la descendencia fue alimentada con dieta control o dieta alta en grasa desde el momento del destete hasta la edad adulta, controlaron la edad puberal y las muestras de sangre se obtuvieron en la edad adulta para los análisis endocrinos. En cuanto a la exposición materna a una dieta alta en grasas reportaron que conduce al inicio temprano de la pubertad el cual se ha asociado con niveles altos de progesterona. Algunos antecedentes han mostrado que la dieta alta en grasa materna induce hipometilación de genes testiculares en la primera generación, pero no en la progenie de segunda generación (Dupont, Cordier et al. 2012).

Otro estudio realizado por Cheong, Sadek et al. (2014) evaluó los efectos del exposición materna a una dieta con un alto contenido de grasa (HF), en la población folicular y la expresión génica en los ovarios de hembras adultas en un modelo de ratón; las hembras C57BL/6J fueron alimentadas durante 6 semanas antes de la concepción, durante el embarazo y la lactancia con una dieta alta en grasas o dieta estándar para roedores (C), y la descendencia al destete fue alimentada con HF o C, obteniendo 4 grupos: HF/HF, HF/C,

C/HF, C/C; la exposición prenatal de la madre a una dieta HF dio lugar a la reducción de folículos primordiales, antrales y de Graaf en los ovarios de la descendencia (tanto HF/C y HF/HF), los niveles de expresión de genes implicados en la apoptosis (FoXO3a), el crecimiento folicular y el desarrollo (Gdf9), y la generación de ritmos circadianos (Bmal1) fueron elevados en los ovarios de la descendencia de los grupos HF/C y HF/HF, mientras que la expresión de los genes del reloj circadiano Cry1 y Per1 fue menor en los ovarios del grupo HF/HF; concluyendo que la obesidad materna durante el embarazo tiene consecuencias perjudiciales a largo plazo sobre el crecimiento folicular y el desarrollo de los ovarios en la descendencia en la edad adulta, y sugieren que puede afectar potencialmente su reproducción.

Por otro lado Gonzalez-Bulnes, Astiz et al. (2013) documenta que la evaluación de las características reproductivas (pubertad, fertilidad y prolificidad) en cerdos ibéricos hembras indican que la exposición materna a una deficiencia o exceso de nutrición, se asocia con obesidad juvenil y significativamente al inicio temprano de la pubertad.

Varios modelos animales ya se han utilizado para evaluar el impacto de la obesidad materna inducida por la dieta durante todo el embarazo y período de lactancia, lo que representa una ventana de tiempo crítico para la programación en roedores. En los seres humanos, este período de plasticidad del desarrollo corresponde al tercer trimestre del embarazo y puede expandirse en la vida postnatal (Dahlhoff, Pfister et al. 2014).

El resultado fenotípico de la descendencia tras la exposición materna a una dieta alta en grasas durante el desarrollo varía en función de la especie, la composición de la dieta, el momento y la duración del consumo. Además, factores maternos tales como la obesidad, la intolerancia a la glucosa, la diabetes y la resistencia a la insulina pueden contribuir de manera independiente en el fenotipo observado en la descendencia (Williams, Seki et al. 2014).

Por lo anterior al igual que en las hembras, el sistema reproductor masculino y su sistema endocrino pueden ser muy sensibles a la exposición de una dieta alta en grasas por parte de la madre, que cause efectos adversos en la producción de gametos y el desarrollo normal de la espermatogénesis (da Silveira e Sa Rde, Leite et al. 2003). Sin embargo la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares por los que se ejercen estos efectos sigue siendo limitada.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo de la obesidad tanto en niños como en adultos puede ser resultado, no sólo del sedentarismo, estilos de vida y alimentación, sino también de las condiciones nutricionales y metabólicas de la madre durante los períodos críticos del desarrollo (gestación y lactancia) por ejemplo la malnutrición debido al alto consumo de grasas saturadas puede programar alteraciones fisiológicas, metabólicas y celulares de órganos y tejidos, predisponiendo al feto en crecimiento a padecer enfermedades desde la niñez y en mayor grado, en la vida adulta. El interés en la programación del desarrollo, de los sistemas fisiológicos se ha centrado en el sistema cardiovascular (especialmente la hipertensión) y la predisposición a la disfunción metabólica (principalmente la obesidad y la diabetes), sin embargo uno de los objetivos actuales de la programación fetal es establecer una correlación de los efectos de la nutrición materna y la función reproductiva. Se sabe que el sobrepeso y la obesidad están asociados con problemas de fecundidad, la calidad del semen y la regulación de hormonas reproductivas, no obstante la información acerca de cómo afecta la obesidad materna a la fertilidad de la descendencia tanto de seres humanos como de animales de experimentación es escasa, lo que da pauta a plantear el estudio de cómo influye el consumo de una dieta alta en grasas por parte de la madre durante la gestación y lactancia en la morfología y estructura del túbulo seminífero, así como en el equilibrio de la función antioxidante para regular la producción de los radicales libres en el testículo durante el envejecimiento lo cual no se ha establecido, a fin de tener una mayor comprensión de los mecanismos celulares y moleculares implicados para promover intervenciones que prevengan los efectos nocivos a este sistema.

IV. HIPÓTESIS

- Si la obesidad materna afecta el metabolismo, función y regulación de diversos órganos en la progenie y se sabe que altera en la función reproductiva la secreción adecuada de hormonas masculinas, la calidad del semen y procesos de fecundación y fertilización, probablemente afectará la estructura y morfología del testículo, y procesos de diferenciación celular de espermatogonias y espermatoцитos, así como la regulación de los sistemas antioxidantes en este tejido, lo cual tenga injerencia sobre los procesos de reproducción.
- Los efectos negativos de la exposición materna a una dieta alta en grasas pueden llegar a ser más evidentes durante el envejecimiento de la descendencia, a pesar de que de manera natural existe una disminución progresiva de las funciones orgánicas favoreciendo el desarrollo de enfermedades.

V. OBJETIVOS

- **Objetivo general:**

- Evaluar en la cría macho los efectos de la obesidad materna sobre la estructura celular del testículo, así como el porcentaje de área de las enzimas relacionadas con el sistema de defensa antioxidante, durante el envejecimiento de las ratas a los 110d, 450d y 650d.

- **Objetivos particulares:**

- Evaluar el efecto de la obesidad materna sobre el peso corporal, testicular y gonadal a los 110d, 450d y 650d de la rata macho.
- Determinar si la obesidad materna tiene efectos negativos sobre el área de túbulos seminíferos de testículos de corte transversal de crías de 110d, 450d y 650d.
- Contabilizar el número de espermatogonias y espermatocitos en los túbulos seminíferos a los 110d, 450d y 650d.
- Determinar el porcentaje de área de inmunotinción de enzimas antioxidantes SOD-1, CAT, GPx-1/2 y 5, GPx-4 pertenecientes a la ruta de ROS y NT proveniente de la ruta de RNS en el testículo de las crías de 110d, 450d y 650d.

VI. METODOLOGÍA

1. Animales experimentales: modelo biológico.

Se emplearon ratas hembras (F0) de 21d (recién destetadas), de la especie *Rattus norvegicus* de la cepa *Wistar*, provenientes de la colonia mantenida en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Cabe señalar que todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Investigación en Animales (CINVA) del mismo instituto. Tanto la dieta como el agua de beber se administraron *ad libitum*. Los machos empleados para el apareamiento con las hembras, fueron ratas de fertilidad probada y durante todo el estudio las ratas permanecieron en el área asignada dentro de las instalaciones del bioterio del DIEB, donde fueron mantenidas bajo condiciones controladas de luz/obscuridad [luz de 7 a 19 horas (h)] y de temperatura (22-23°C) y a 75% de humedad respectivamente.

2. Diseño experimental.

Para el desarrollo de este modelo previamente ya establecido las ratas hembras de 21d fueron asignadas dentro de 2 grupos experimentales según su patrón de alimentación, ya sea con dieta alta en grasa (preparada en el laboratorio) o con dieta control (alimento comercial para roedor) a partir del destete, el cual se describe a continuación:

- **Grupo Control (C):** ratas alimentadas con dieta control desde el destete hasta el final de la lactancia de sus crías (n=5)
- **Grupo de Obesidad Materna (OM):** ratas alimentadas con dieta alta en grasa desde el destete hasta el final de la lactancia de sus crías (n=5).

Una vez establecido el patrón de alimentación, se colocaron dos ratas hembras (F0) a los 120d con un macho de fertilidad probada, a fin de que se llevara a cabo el apareamiento, el cual fue comprobado por medio del frotis vaginal cada 24h (a las 8:00 am), durante cinco días. Los frotis fueron teñidos con solución de Lugol (obtenida de la Farmacia del área de Hospitalización del INCMNSZ) y se observaron a 40x con un microscopio de campo claro (Axiostar Plus de Carl Zeiss).

Se obtuvieron crías F1 (para este modelo se propuso estudiar a los machos a diferentes edades quedando una n=5 de crías por grupo), las cuales se asignaron al mismo

grupo al que pertenecieron sus madres F0 durante el experimento, permaneciendo con ella durante la lactancia de los 0d (F1) a los 21d (F1) cuando fueron destetadas y a partir de ese momento se les dio dieta control a cada una, hasta el final del experimento independientemente del grupo al que pertenecieran.

El peso de las crías fue registrado desde el nacimiento 0d (F1) hasta el final del experimento en los días seleccionados: 110d, 450d y 650d. A las diferentes edades de estudio se realizó la eutanasia y se extrajo la grasa gonadal y el testículo derecho, los cuales fueron pesados y a los testículos se les realizaron las determinaciones indicadas en la **Figura 4**.

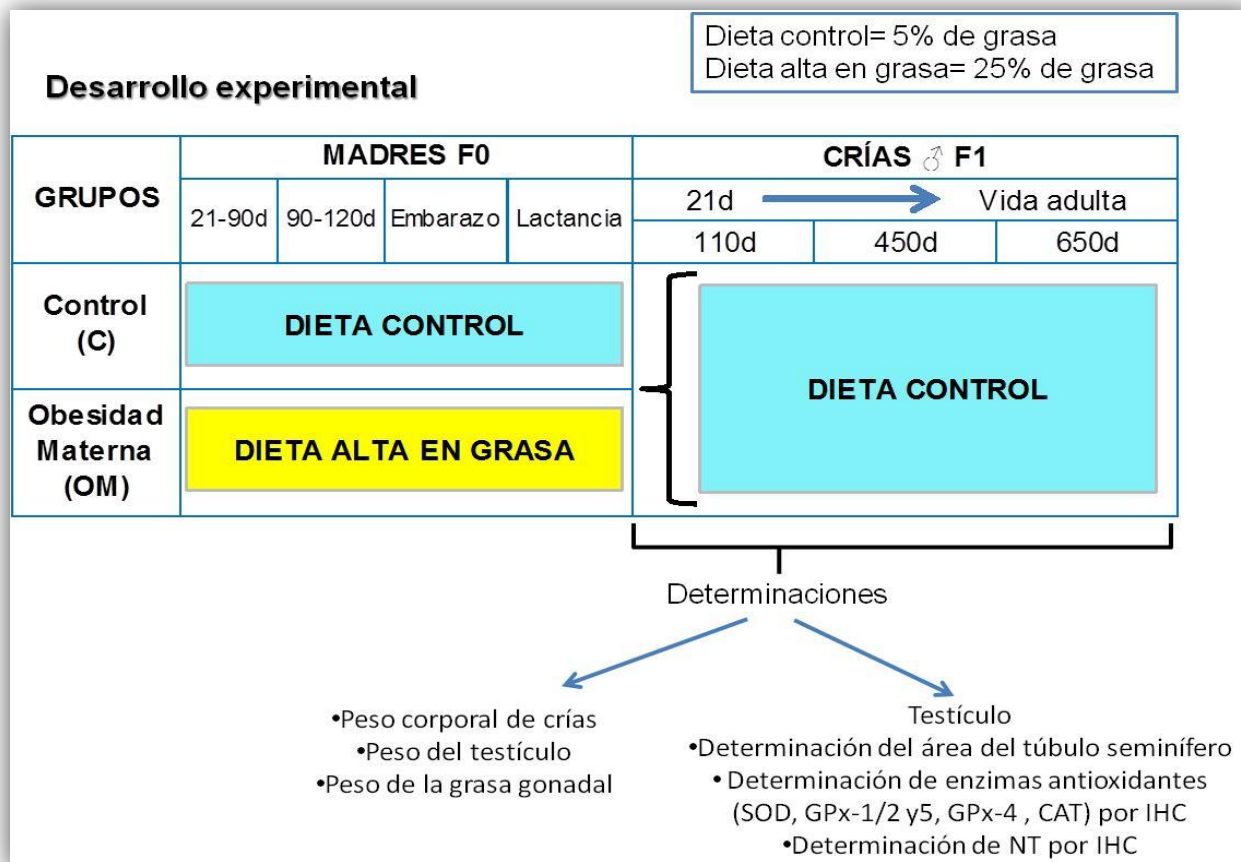


Figura 4. Línea del tiempo en días que muestra la dieta de los grupos experimentales a lo largo del experimento, desde el día cero de gestación hasta los 110, 450 y 650 días de edad de las crías macho. IHC (Inmunohistoquímica)

3. Dieta experimental.

La dieta Control (C) consistió en alimento comercial para roedor 5001 formulada para mantenimiento, crecimiento, reproducción y lactancia de ratas y ratones con 5%_(p/p) de grasa

vegetal y un contenido energético de 4 kcal/g. Mientras tanto la dieta alta en grasa fue elaborada en la planta piloto del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (DCyTA) del INCMNSZ, cuyo contenido de grasa animal fue del 20%_(p/p), y energético de 5 kcal/g (Tabla 1), con una formulación diseñada con base en la recomendación AIN-93 del American Institute of Nutrition, así como en modificaciones hechas a ésta por nuestro equipo de trabajo (Zambrano, Martínez-Samayoa et al. 2010). Los componentes de las dietas fueron pesados según la cantidad requerida, en una balanza (Sartorius® modelo ED6235-CW, peso máximo: 620 g). Para su elaboración se utilizó una mezcladora de paletas Hobart modelo A-200 de 20 L de capacidad, potencia de 1/3HP Y 1425 rpm. El procedimiento de elaboración se describe con mayor detalle en el apéndice A.1.

Tabla 1. Composición nutricional de las dietas.

Nutrimento	Dieta Control (p/p)*	Dieta Alta en Grasa (p/p)**
Proteína	22.0	23.4
Grasa vegetal	5.0	5.0
Manteca de cerdo	-----	20.0
Polisacáridos	31.0	21.05
Azúcares simples	31.0	20.3
Fibra dietética	4.0	5.0
Minerales	6.0	3.5
Vitaminas	1.0	1.0
Contenido energético	4 kcal/g	5 kcal/g

*Datos obtenidos del análisis garantizado de la dieta Purina 5001 por el fabricante.

**Datos calculados a partir de la formulación.

4. Obtención y procesamiento de muestras biológicas

Se obtuvo el peso corporal de 5 crías macho de cada grupo experimental utilizando una balanza analítica ADAM® modelo PGW 1502e, (Cap. Max.= 1500 g, d= 0.01 g), usándola en la función de pesaje de animales. Se sacrificaron por decapitación a los 110d, 450d y 650d de edad; se utilizó una guillotina para roedor (Thomas Scientific®) poniendo a los animales en ayuno de 8 h (06:00-14:00h sólo con acceso libre de agua).

Se extrajo el testículo derecho, se separó la grasa gonadal de las crías a las diferentes edades y se determinó el peso en una balanza analítica BP 310S de Sartorius® (Cap. Max.= 320 g, d= 0.001 g). El testículo fue descapsulado y colocado en para-formaldehído al 4% durante 24 h en un casete (no. cat. M505-6 UNISSETTE SIMPORT®) para fijar las estructuras

celulares. Transcurrido ese tiempo, las muestras fueron lavadas y almacenadas a 4°C con PBS [buffer de fosfatos, 0.05 mM, pH=7.4: fosfato monosódico 0.08%, fosfato disódico 0.625%, cloruro de sodio 0.88% (g/L)], hasta el momento de su procesamiento. Cada testículo fijado (n=5 por grupo), se sometió a un proceso automático de deshidratación mediante histokinette (Sakura® Tissue-Tek II 46406) para su posterior inclusión en parafina (McCormick Scientific®, Standard Paraplast) con un punto de fusión de 56-58°C.

Después de obtener el tejido en un bloque sólido, se realizaron cortes de 5 µm de grosor con un microtomo (American Optical® 820) y fueron colocados en portaobjetos (Corning®) previamente tratados con poli-L-lisina (Sigma), al 10%, proceso en el cual las laminillas se pasaron por alcohol absoluto de 1 a 2 minutos, se eliminó el exceso y se llevaron a un horno de secado a 60°C de 2 a 5 min, posteriormente se colocaron en la solución de poli-L-lisina durante 15 min, se secaron en horno a 60°C durante 10 min para finalmente ser guardadas.

5. Tinción de hematoxilina – eosina.

Los cortes fueron desparafinados en un horno de secado durante 20 min, se realizaron tres lavados con xilol de 10 min cada uno, se rehidrataron en alcohol a concentraciones decrecientes (100%, 95%, 70% y 50%) seguido por un lavado de agua; posteriormente se tiñeron las laminillas con hematoxilina de Harris (Thermo Shandon, catálogo. 6765003) durante 10 min y nuevamente se lavaron con agua para ser transferidas rápidamente por alcohol al 100% antes de ser contra teñidas con solución acuosa de eosina (Sigma Aldrich®, Catálogo. HT110232) por 1 min seguido de esto se lavaron nuevamente con agua, para después ser deshidratadas, las muestras pasaron por otra serie de alcoholes a diferentes concentraciones, esta vez en orden creciente (95% y 100%), y finalmente fueron selladas con entellan (Merck Millipore, catálogo 107960).

Los cortes histológicos teñidos fueron observados al microscopio (Olympus BX51) a objetivos de 10x, 20x y 40x y se tomaron 100 micrografías digitales por grupo, en formato JPEG con una cámara (Olympus DP-72) adaptada al equipo, llevando a cabo la calibración con una regla medidora en la imagen digital, correspondiente a 100 µm, 50 µm y 20 µm pertenecientes a los objetivos de 10x, 20x y 40x respectivamente, mediante un software diseñado para la obtención de imágenes digitales (Olympus DP2-BSW). Se evaluó el nivel de

organización de los túbulos seminíferos, se cuantificó el número de espermatogonias y espermatoцитos por duplicado y a doble ciego, así mismo se midió el área de los túbulos en corte transversal.

6. Medición del área del túbulo seminífero.

La determinación del área del túbulo seminífero se realizó con las laminillas de los cortes de tejido previamente teñidas con hematoxilina - eosina (H&E), se recurrió a la planimetría, siendo el principal método cuantitativo para el estudio de la estructura del tejido. Las micrografías (100 micrografías tomadas a objetivo de 10x, 20 campos aleatorios y uniformes, correspondientes a cada testículo; n=5) se caracterizaron por representar a escala todos los túbulos presentes en una superficie plana, prescindiendo de su relieve y en una proyección horizontal. Para el análisis se utilizó el software de procesamiento de imágenes (AxioVision LE, versión 4.8), delimitando los bordes de cada túbulo entero en la imagen, cuantificándose las áreas en μm^2 , cabe señalar que el número de túbulos transversales que se midieron por rata, por grupo y a las diferentes edades de estudio fueron en promedio 150, además la cuantificación fue realizada por duplicado y a doble ciego.

7. Cuantificación de espermatogonias y espermatoцитos.

El conteo de espermatogonias y espermatoцитos se llevó a cabo con las laminillas de los cortes de tejido previamente teñidas con H&E y un contador digital. Se analizaron las microfotografías (50 microfotografías de 50 túbulos, por grupo a las diferentes edades, tomadas a objetivo de 20x, correspondientes a cada testículo; n=5), teniendo en cuenta que las espermatogonias se caracterizan por tener un núcleo ovoide que contiene gránulos finos de cromatina y dichas células se encuentran en la base del epitelio seminífero, por lo anterior al ser la hematoxilina un colorante básico, dichas estructuras se tiñen en tonos azulados, (Kerr 1992), por lo que de esta manera se identificaron y diferenciaron de los espermatoцитos los cuales son células que surgen de espermatogonias tipo B que durante la fase mitótica de la espermatogénesis se alejan de la membrana basal hacia la parte central del epitelio seminífero y se agrandan, además es importante mencionar que tienen citoplasma acidófilo y núcleo medianamente basófilo, es por lo anterior que resulta posible observarlas teñidas en tonos púrpura y rosa (Kerr 1992).

8. IHC de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx-1/2 y 5, GPx-4) y un marcador de especies reactivas de nitrógeno (NT).

Los cortes de testículos fueron desparafinados y rehidratados. Para la recuperación antigénica se utilizó una solución de citrato de sodio a pH 6, previo calentamiento a ebullición. Se bloqueó la actividad endógena de la peroxidasa con una solución al 1.5% de H₂O₂/metanol durante 10 min, y posteriormente se lavaron con KPBS pH 7.04 [Buffer de fosfatos, pH=7.04: fosfato monobásico de potasio 0.136%, fosfato dibásico de potasio 0.697%, cloruro de sodio 0.9% (g/vol)], durante 5min. Se realizó un bloqueo de 10 min con una solución al 10% de suero normal respectivo.

Los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario diluido en una solución al 0.4% Triton X-100 en KPBS durante toda la noche, utilizando una concentración 1:50. Posteriormente los cortes fueron lavados con KPBS por 5 min. Se incubaron con el anticuerpo secundario a una concentración 1:1000 durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente con KPBS por 5 min. Se incubaron durante 1 h con una solución A/B (Vectastain standard catálogo PK-6100) a una concentración 1:333 en medio 0.4% triton X-100 en KPBS, la solución fue empleada como sistema de detección. Se realizó un nuevo lavado a los cortes con KPBS seguido de uno con acetato de sodio 0.175 M, ambos por 5 min. El cromógeno utilizado fue una solución de sulfato de níquel con 0.02% de diaminobencina en acetato de sodio 0.175 M, adicionando como punto crítico agua oxigenada al 3%, utilizando dicho medio de revelado durante 20 min, después de transcurrido ese tiempo de y con la finalidad de parar la reacción se adicionó acetato de sodio 0.175 M, para después lavar con KPBS por 5 min, posteriormente se deshidrataron los cortes haciéndolos pasar por una serie de alcoholes a diferentes concentraciones, esta vez en orden creciente (95% y 100%), y finalmente se sellaron con entellan (Merck Millipore®, catálogo. 107960).

Anticuerpos:

- SOD-1 (B-1 sc-271014 Santa Cruz Biotechnology), GPx-1/2 (D-12 sc-133152 Santa Cruz Biotechnology) y Nitrotirosina (NT-MAB5404 Millipore®) se incubaron con un anticuerpo anti IgG de ratón (Laboratorios Vector® BA-2000) como anticuerpo secundario y se realizó el bloqueo con suero de caballo(Laboratorios Vector® S-2000)

- Catalasa (H-300 sc-50508 Santa Cruz Biotechnology), se incubo con IgG (H+L) (Laboratorios Vector® BA-1000) como anticuerpo secundario y se realizó el bloqueo con Normal Goat Serum 10% listo para usarse(Invitrogen®, catálogo 50062Z)
- GPx-4 (sc-27529 Santa Cruz Biotechnology), se incubó con un antiuerpo anti IgG de cabra (Laboratorios Vector® BA-5000) como anticuerpo secundario y se realizó el bloqueo con suero de conejo al 10% (KPL®, catálogo MD20878)

En cuanto a las micrografías: las laminillas se observaron y analizaron en microscopio de campo claro y se tomaron 30 fotos de diferentes campos por grupo y edad a objetivo de 40x. El análisis se llevó a cabo con un programa de análisis de imagen (Image J), por lo que se requiere el cambio de color a escala de tonos blanco y negro (Imagen → Type → 8-bit), para ser cuantificada cada una con un ajuste de Threshold o umbral (Imagen → Ajustar → Threshold), el cual determina la presencia del anticuerpo únicamente mediante el porcentaje de área ocupada por el mismo descartando las regiones en donde no estuviera presente y evitando que se generara un falso positivo.

Posterior a este análisis las laminillas fueron colocadas en xilol durante 72 h para eliminar completamente el entellan del cubreobjetos. Transcurrido este tiempo se colocaron las laminillas en el colorante verde de metilo (Sigma catálogo M-6776) durante 10 min. Consecutivamente se realizaron dos lavados con agua, y se procedió a llevar a cabo otros dos lavados pero ahora por alcohol del 95% y de forma muy rápida. Se procedió a pasar las laminillas por alcohol al 100% dos veces y finalmente se deshidrataron los cortes con xilol (3 veces, durante 10 min), para sellarse con entellan.

9. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados por ANOVA de 1 vía y para los posteriores análisis de comparación entre grupos. El análisis estadístico se realizó usando el software Sigma Stat, versión 3.1 y las gráficas se hicieron en Sigma Plot, versión 12.0. Para cada edad se utilizó una n de 5 machos por grupo experimental. Se usó un nivel de significancia de 0.05. Los resultados están expresados como la media \pm EE.

VII. RESULTADOS

1. Peso corporal y del testículo de crías a los 110d, 450d y 650d.

Al analizar el peso corporal de las crías, en la misma dieta a las diferentes edades, en el grupo C es menor a 110d y mayor a 450d y 650d sin cambios entre estas dos edades, mientras que el grupo OM se incrementó con respecto a la edad. La exposición materna a una dieta alta en grasas provoca mayor ganancia de peso corporal con respecto al C a 450d y 650d (**Figura 5A**). No obstante el peso del testículo no es diferente entre grupos y edades (**Figura 5B**).

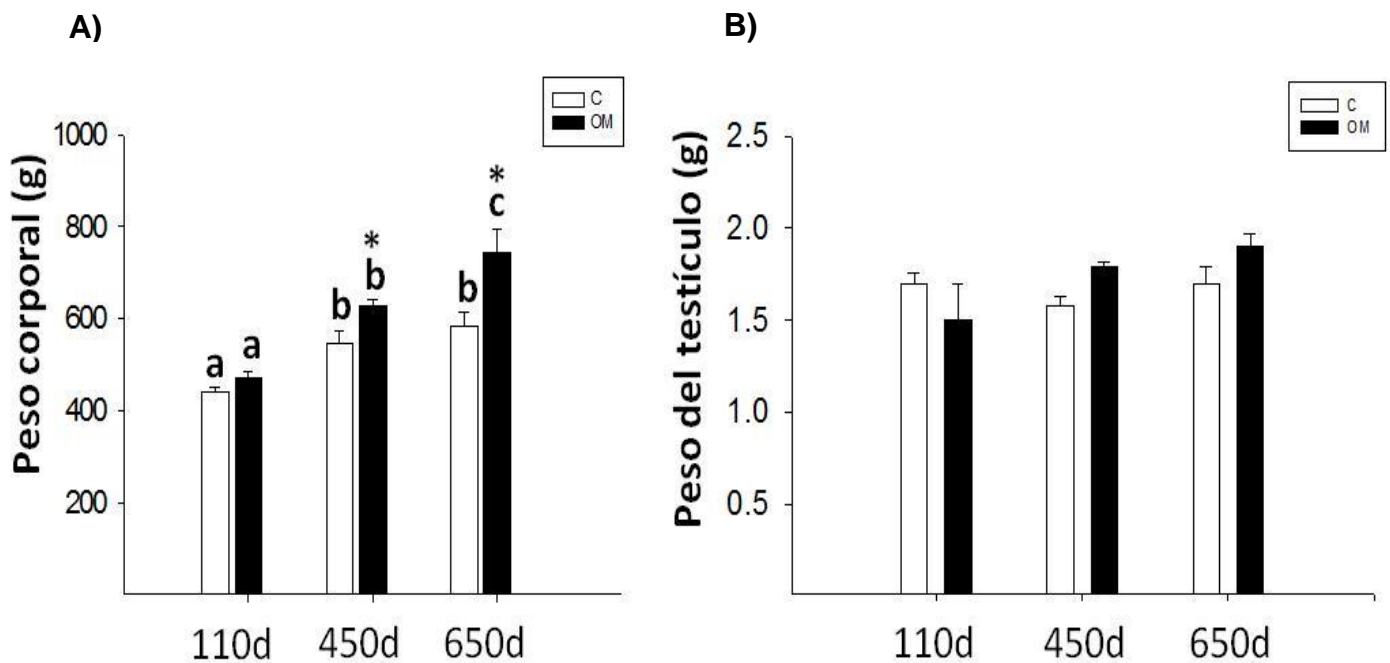


Figura 5. A) Peso corporal de las crías macho en (g), **B)** Peso del testículo en (g) a edades de 110d, 450d y 650d. Los datos se muestra como la media \pm EE, n = 5. (*)= denotan diferencia significativa entre los grupos C vs OM. Misma dieta a diferentes edades que no comparten la misma letra son estadísticamente diferentes, $p < 0.05$. Grupos experimentales: C (crías de madres alimentadas con dieta control) y OM (crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa).

2. Grasa gonadal de crías a los 110d, 450d y 650d.

Al analizar la grasa gonadal de las crías, en la misma dieta a las diferentes edades, en el grupo C es menor a 110d en comparación a 450d y 650d, y en el grupo OM es mayor a 110d y 450d. La exposición materna a una dieta alta en grasas provoca que la grasa gonadal en el grupo OM sea mayor en comparación con el grupo C a 110d y 450d (**Figura 6**).

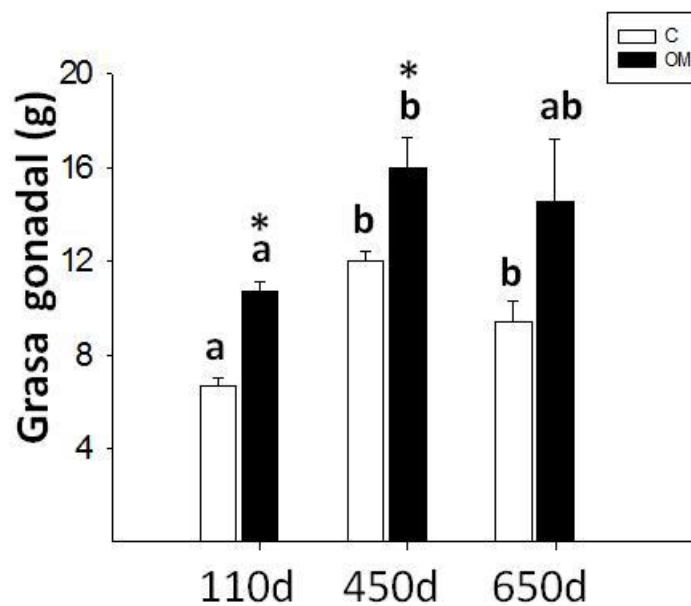


Figura 6. Grasa gonadal de las crías macho en (g) a edades de 110d, 450d y 650d. Los datos se muestra como la media \pm EE, $n = 5$. (*) = denotan diferencia significativa entre los grupos C vs OM. Misma dieta a diferentes edades que no comparten la misma letra son estadísticamente diferentes, $p < 0.05$. Grupos experimentales: C (crías de madres alimentadas con dieta control) y OM (crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa).

3. Área del túbulo seminífero de crías a los 110d, 450d y 650d.

Al analizar el área del túbulo seminífero, en la misma dieta a las diferentes edades, no presenta diferencias estadísticas. No obstante la exposición materna a una dieta alta en grasas genera que el área del túbulo seminífero de las crías sea menor con respecto al grupo C en todas las edades de estudio (**Figura 7A y 7B**).

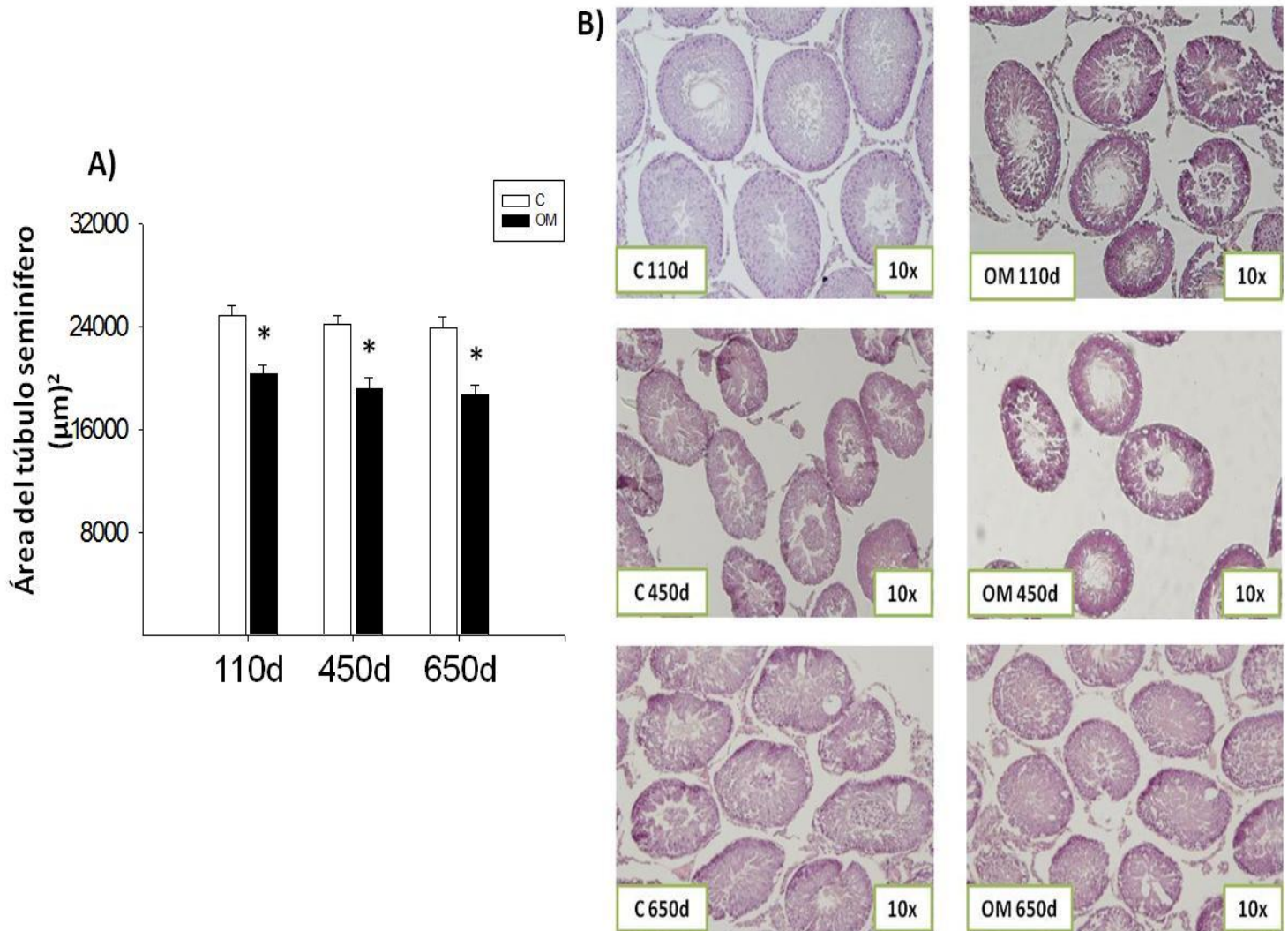


Figura 7. A) Área del túbulo seminífero (μm^2) a las diferentes edades de estudio. **B)** Microfotografías representativas de túbulos seminíferos, tomadas en microscopio de campo claro con aumento de 10x a 110d, 450d y 650d. Los datos se muestran como la media \pm EE, $n = 5$. (*)= denotan diferencias significativas: entre los grupos C vs OM, $p < 0,05$. Grupos experimentales: C (crías de madres alimentadas con dieta control) y OM (crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa).

4. Conteo celular de espermatogonias y espermatocitos de crías a los 110d, 450d y 650d.

Las espermatogonias ubicadas a lo largo de la lámina basal del túbulo seminífero (**Figura 8C**) al analizar la misma dieta a las diferentes edades de estudio ambos grupos muestran mayor número de células a los 110d, disminuyendo a 450d y 650d sin cambios entre estas dos edades. Sin embargo la exposición materna a una dieta alta en grasas provoca que haya menor número de espermatogonias en comparación con el grupo C a 110d, 450d y 650d (**Figura 8A**).

En relación al número de espermatocitos que son células que surgen de espermatogonias tipo B y que pierden el contacto con la membrana basal de los túbulos seminíferos (**Figura 8D**), en el estudio por edades observamos que en el grupo C hay mayor número a los 110d y que hay una disminución en el grupo OM a los 650d. No obstante la exposición materna a una dieta alta en grasas provoca que haya menor número de espermatocitos comparado con el grupo C a 110d y 650d. (**Figura 8B**).

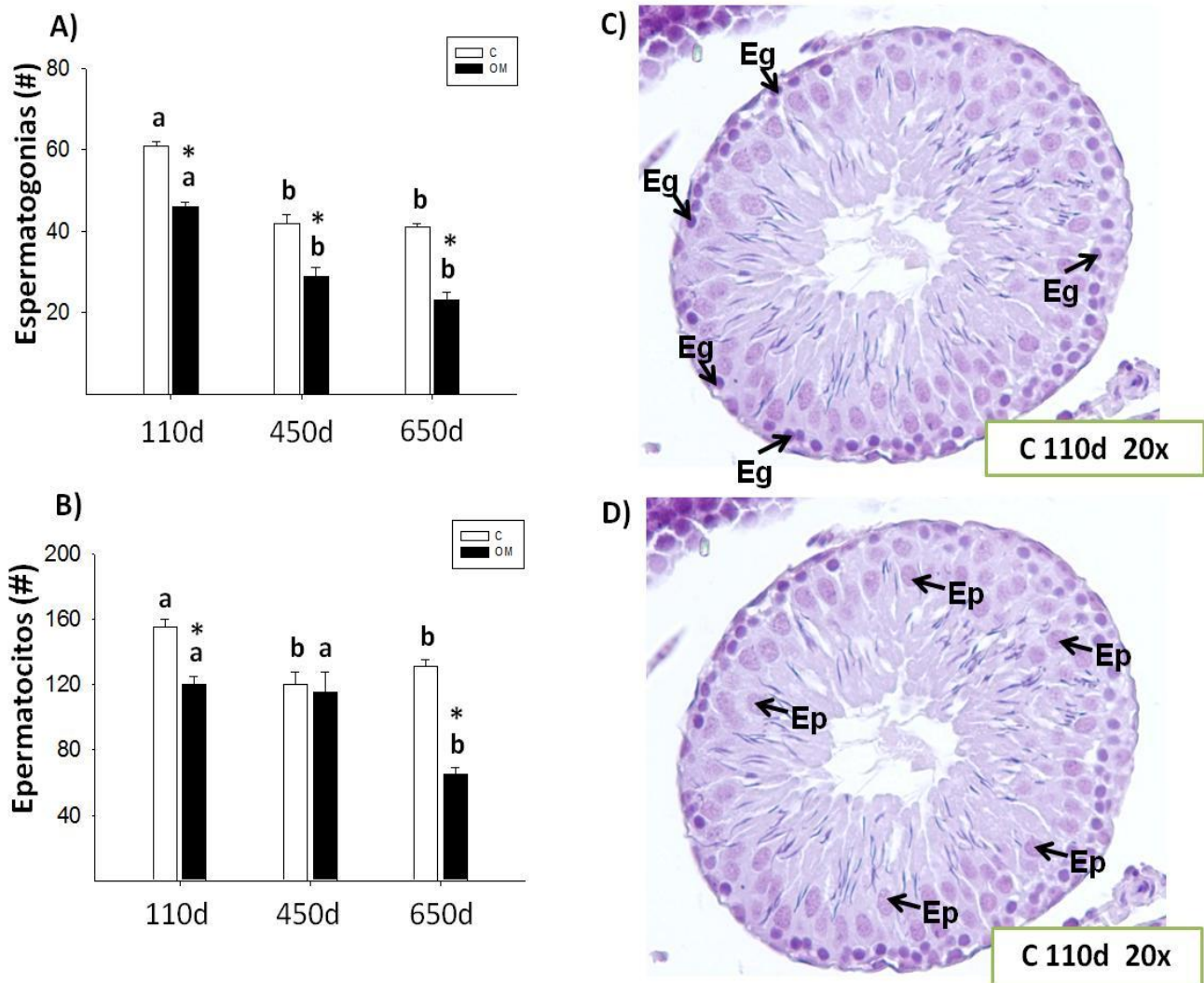


Figura 8. A) Número de espermatogonias a 110d, 450d y 650d. **B)** Número de espermatocitos a 110d, 450d y 650 d. **C)** Microfotografía representativa de túbulo seminífero, que muestra la identificación de espermatogonias (Eg), grupo C a 110d a objetivo de 20x. **D)** Microfotografía representativa de túbulo seminífero, que muestra la identificación de espermatocitos (Ep), grupo C a 110d a objetivo de 20x. Los datos se muestran como la media \pm EE, n = 5. (*)= denotan diferencias significativas: entre los grupos C vs OM. Misma dieta a diferentes edades que no comparten letra son estadísticamente diferentes, $p < 0,05$.. Grupos experimentales: C (crías de madres alimentadas con dieta control) y OM (crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa).

5. IHC de SOD-1 y microfotografías representativas de túbulos seminíferos de crías a los 110d, 450d y 650d.

El análisis por Inmunohistoquímica de SOD (**Figura 9A**) en la misma dieta a las diferentes edades, observamos que el grupo C tiene mayor porcentaje de área de inmunotinción sólo a 110d, disminuyendo a 450d y 650d sin cambios entre estas dos edades, mientras que en el grupo OM es mayor a 450d y menor a 110d y 650d. Sin embargo la exposición de una dieta materna alta en grasas genera una disminución en el porcentaje de inmunotinción a 110d y aumentando a 450d y 650d en comparación con el C. Por lo anterior se muestran microfotografías representativas (**Figura 9B**).

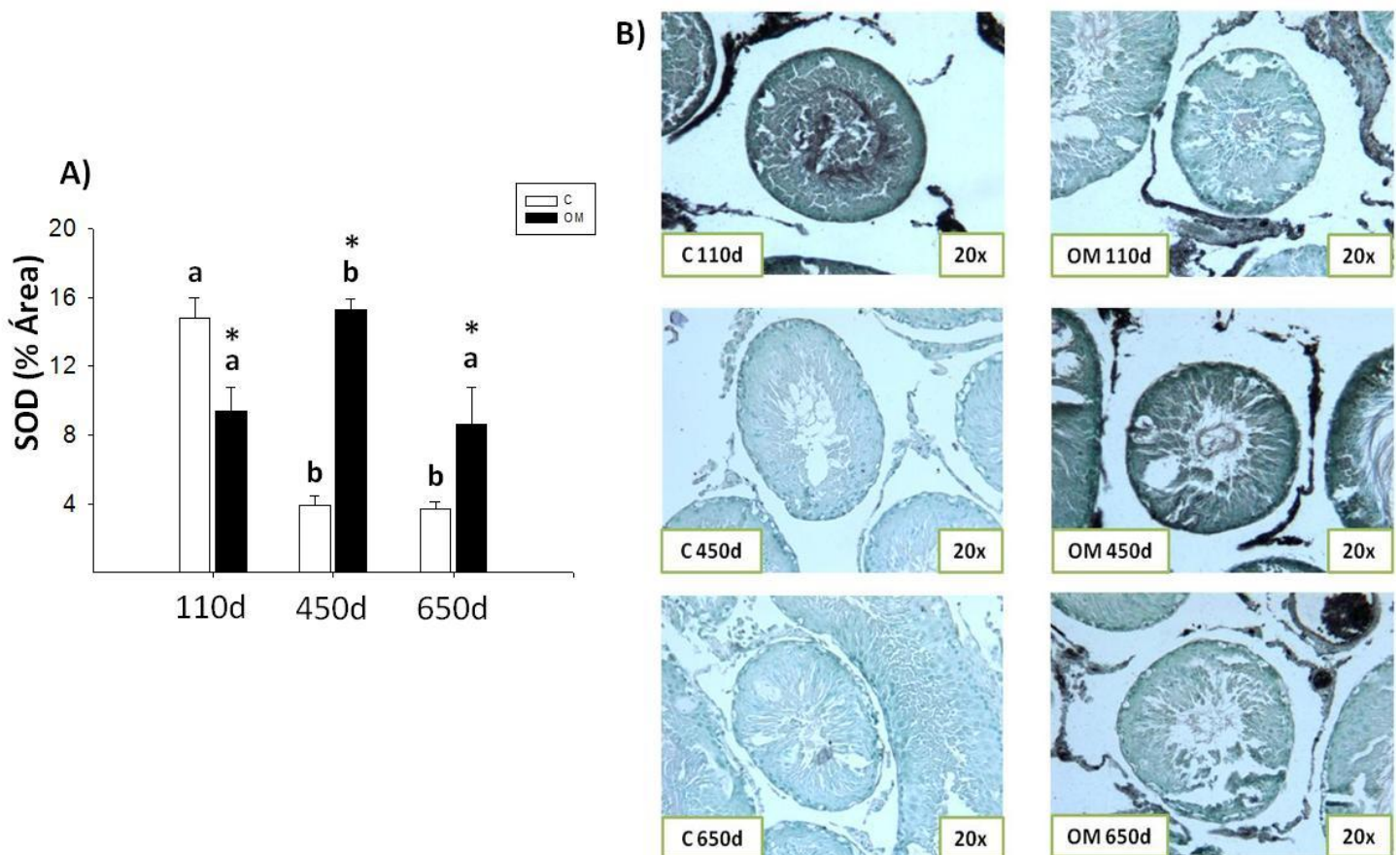


Figura 9. A) SOD-1 en testículos por IHC. **B)** Microfotografías de túbulos seminíferos que muestran la expresión de SOD-1 por IHC, tomadas en microscopio de campo claro con aumento de 20x. Los datos se muestran como la media \pm EE, $n = 5$. (*)= denotan diferencias significativas: entre los grupos C vs OM. Misma dieta a diferentes edades que no comparten letra son estadísticamente diferentes, $p < 0,05$. Grupos experimentales: C (crías de madres alimentadas con dieta control) y OM (crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa).

6. IHC de GPx-1/2 y 5 y microfotografías representativas de túbulos seminíferos de crías a los 110d, 450d y 650d.

El análisis de Inmunohistoquímica para GPx -1/2 y 5 (**Figura 10A**), en la misma dieta a las diferentes edades, observamos que disminuye el área de inmunotinción en el grupo C a los 650d, siendo mayor a 110d y 450d sin cambios entre estas dos edades, mientras que en grupo OM se reduce con respecto a la edad. No obstante la exposición de una dieta materna alta en grasas genera que el porcentaje de área de inmunotinción a 110d sea mayor en OM con respecto a C. Por lo anterior se muestran microfotografías representativas (**Figura 10B**).

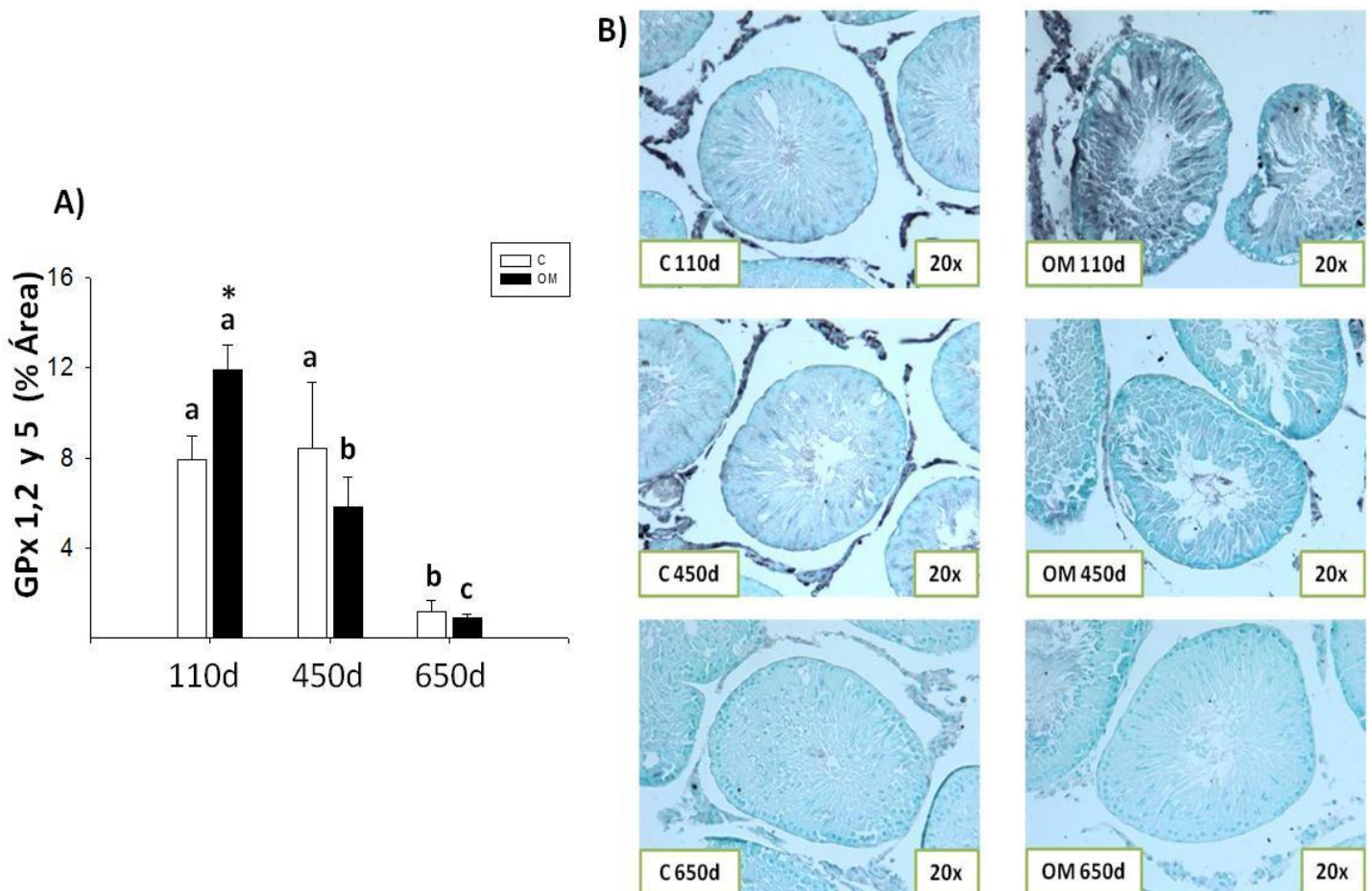


Figura 10. A) GPx-1/2 en testículos por IHC. **B)** Microfotografías de túbulos seminíferos que muestran la expresión de GPx-1/2 y 5 por IHC, tomadas en microscopio de campo claro con aumento de 20x. Los datos se muestran como la media \pm EE, $n = 5$. (*)= denotan diferencias significativas: entre los grupos C vs OM. Misma dieta a diferentes edades que no comparten letra son estadísticamente diferentes, $p < 0,05$. Grupos experimentales: C (crías de madres alimentadas con dieta control) y OM (crías de madres alimentadas con dieta alta en grasas).

7. IHC de GPx-4 y microfotografías representativas de túbulos seminíferos de crías a los 110d, 450d y 650d.

El análisis de Inmunohistoquímica para GPx-4 (**Figura 11A**), en la misma dieta a las diferentes edades, observamos que el porcentaje de área inmunoteñida en el grupo C es menor a 650d y se incrementa a 110d y 450d sin cambios entre estas dos edades, y en el grupo OM es menor a 650d respecto a 110d. Sin embargo la exposición materna a una dieta alta en grasas genera que el porcentaje de área de inmunotinción a 450d sea menor en OM con respecto a C, y a 650d la expresión se incremente en OM comparado con el C. Por lo anterior se muestran microfotografías representativas (**Figura 11 B**).

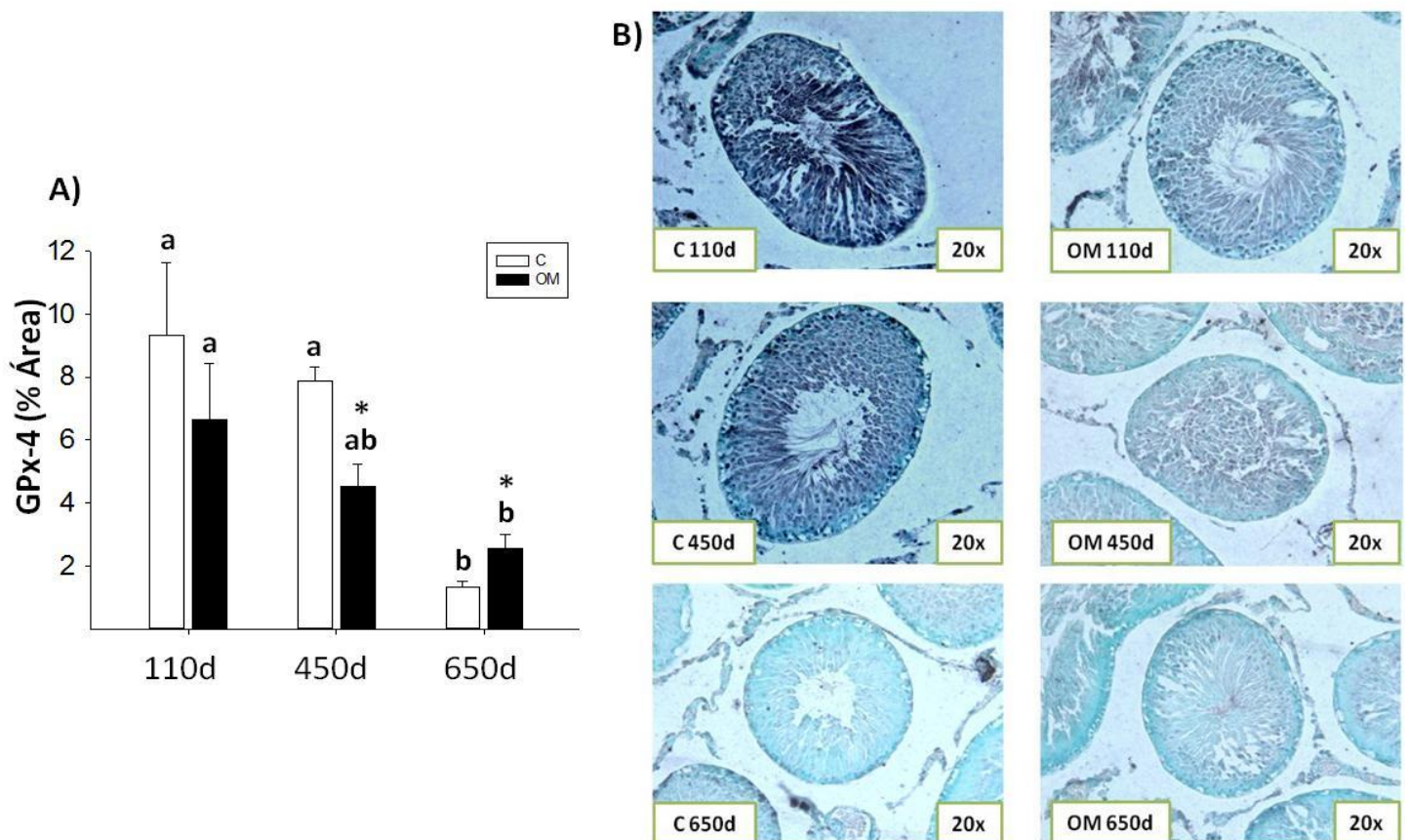


Figura 11. A) GPx-4 en testículos por IHC. **B)** Microfotografías de túbulos seminíferos que muestran la expresión de GPx-4 por IHC, tomadas en microscopio de campo claro con aumento de 20x. Los datos se muestran como la media \pm EE, n = 5. (*)= denotan diferencias significativas: entre los grupos C vs OM. Misma dieta a diferentes edades que no comparten letra son estadísticamente diferentes, p < 0,05. Grupos experimentales: C (crías de madres alimentadas con dieta control) y OM (crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa).

8. IHC de CAT y microfotografías representativas de túbulos seminíferos de crías a los 110d, 450d y 650d.

El análisis de Inmunohistoquímica para CAT (**Figura 12A**), en la misma dieta a las diferentes edades, tanto C y OM tienen mayor expresión a 450d comparada con 110d y 650d. No obstante la exposición materna a una dieta alta en grasas genera un incremento en el área de inmunotinción con respecto al grupo C a 110d, 450d y 650d. Por lo anterior se muestran microfotografías representativas (**Figura 12B**).

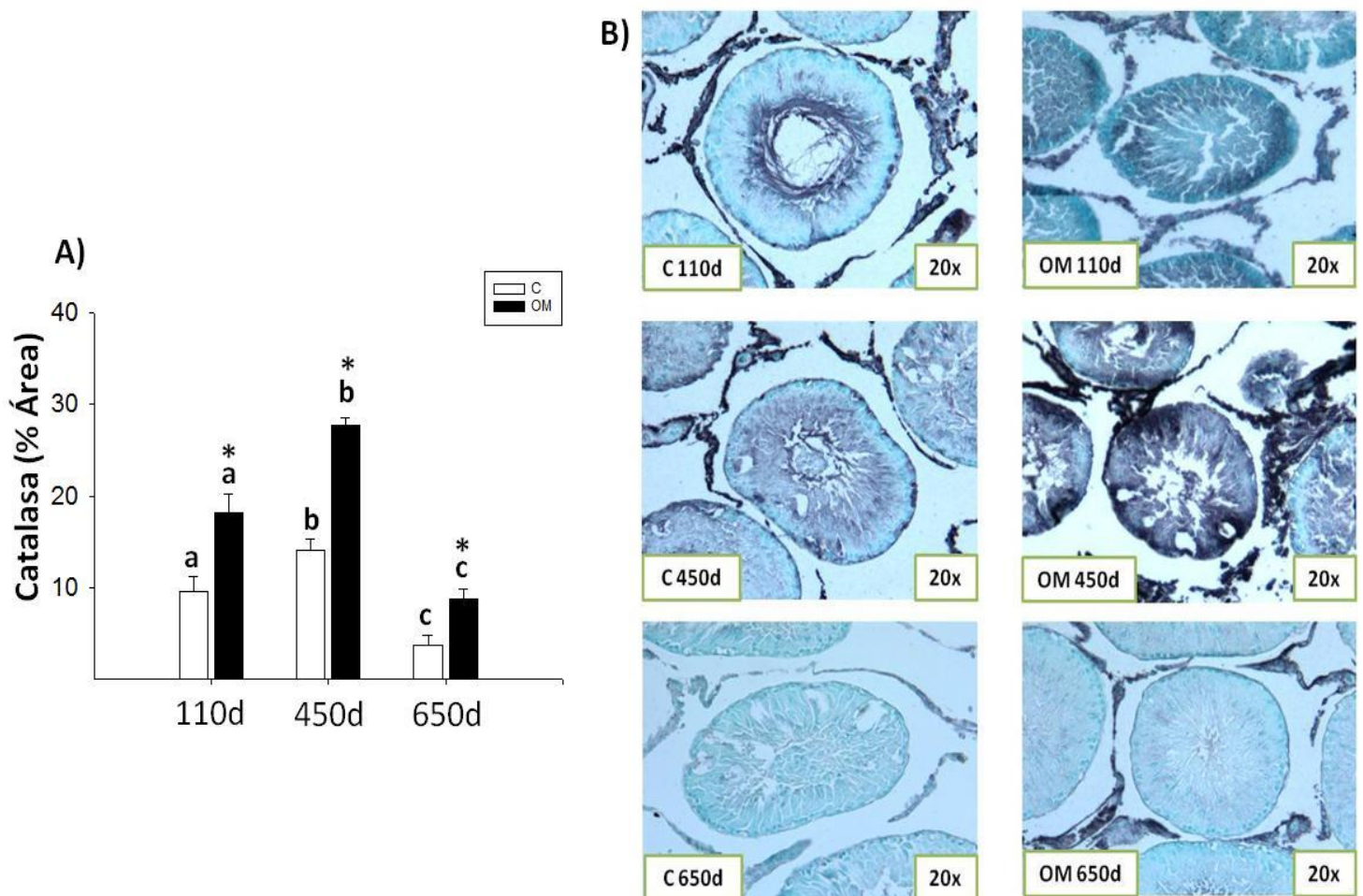


Figura 12. A) CAT en testículos por IHC. **B)** Microfotografías de túbulos seminíferos que muestran la expresión de CAT por IHC, tomadas en microscopio de campo claro con aumento de 20x. Los datos se muestran como la media \pm EE, n = 5. (*)= denotan diferencias significativas: entre los grupos C vs OM. Mismo dieta a diferentes edades que no comparten letra son estadísticamente diferentes, p < 0,05. Grupos experimentales: C (crías de madres alimentadas con dieta control) y OM (crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa).

9. IHC de NT y microfotografías representativas de túbulos seminíferos de crías a los 110d, 450d y 650d.

El porcentaje de área inmunoteñida de NT (**Figura 13A**), en la misma dieta a las diferentes edades, tanto C y OM no presentan diferencias estadísticas. Sin embargo la exposición materna a una dieta alta en grasas genera una mayor expresión con respecto al grupo C a 110d, 450 y 650d. Por lo anterior se muestran microfotografías representativas (**Figura 13B**).

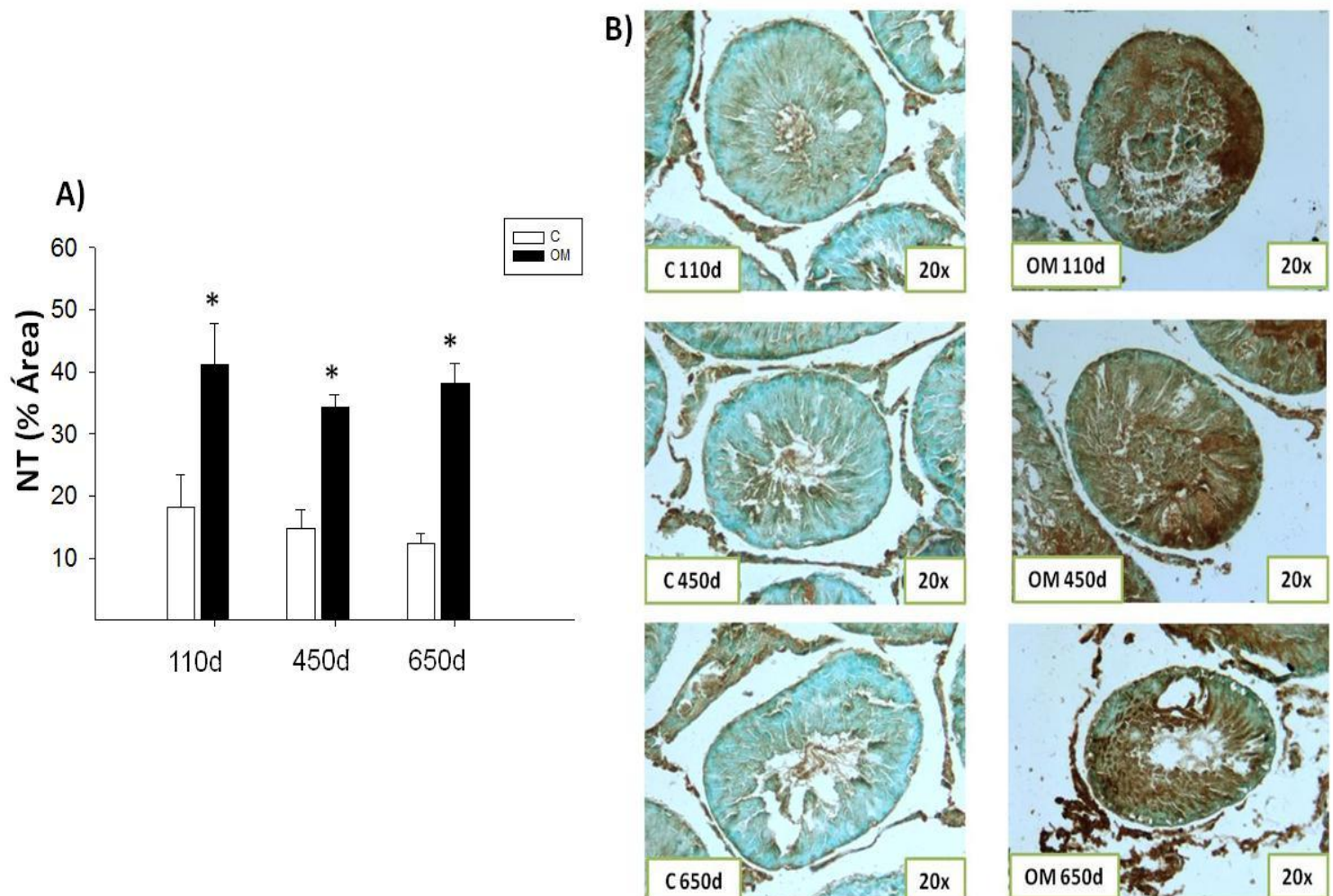


Figura 13. A) Nitrotirosina en testículos por IHC. **B)** Microfotografías de túbulos seminíferos que muestran la expresión de Nitrotirosina por IHC, tomadas en microscopio de campo claro con aumento de 20x. Los datos se muestran como la media \pm EE, $n = 5$. (*)= denotan diferencias significativas: entre los grupos C vs OM, $p < 0,05$. Grupos experimentales: C (crías de madres alimentadas con dieta control) y OM (crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa).

VIII. DISCUSIÓN

La prevalencia de la obesidad y sobrepeso, ha alcanzado proporciones epidémicas y esto representa un problema de salud global especialmente para las mujeres en edad reproductiva. Es importante mencionar que en estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo han informado que las madres expuestas a una dieta alta en grasas presentaron un aumento en la concentración de la insulina, la glucosa, HOMA (evaluación del modelo homeostático; técnica para el diagnóstico preciso de la resistencia a la insulina), la leptina, triacilglicéridos, colesterol, grasa retroperitoneal, y también que su hígado mostró una mayor concentración de MDA (malondialdehído; especie reactiva que se produce de forma natural y es un marcador de estrés oxidativo) y ROS, así como un incremento en la actividad de SOD y GPx (Rodríguez-Gonzalez, Vega et al. 2014). Está establecido que la programación del desarrollo describe el proceso en el que un estímulo ambiental, incluyendo la malnutrición (consumo de una dieta alta en grasas), durante los períodos críticos del desarrollo (gestación y lactancia) puede programar alteraciones en la organogénesis, afectando la función y el metabolismo de la descendencia predisponiéndola a que en la vida adulta padezca obesidad así como trastornos relacionados con el síndrome metabólico y función reproductiva (Zambrano 2009, Segovia, Vickers et al. 2014).

De acuerdo con lo anterior se han realizado diversos estudios en roedores, ovejas y primates acerca del impacto de la obesidad materna sobre las consecuencias en el fenotipo de la vida postnatal y adulta de la descendencia. Nuestro grupo de trabajo ha informado que los descendientes de madres obesas presentan un aumento del peso corporal, grasa, índice de adiposidad, triacilglicéridos en suero, leptina, insulina, así como el índice de resistencia a la insulina. Además, se demostró que esto ocurre incluso cuando las crías del grupo OM son alimentadas con dieta C= 5% grasa vegetal- 4 Kcal/g (Rodríguez-Gonzalez, Vega et al. 2014). En la mayoría de los reportes, se ha informado que el exceso de nutrición materna conduce a un aumento en el peso corporal de la descendencia (Zhang, Rattanatrav et al. 2011). En el presente trabajo observamos este mismo efecto donde descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasas tuvieron incremento del peso corporal a 450d y 650d en comparación con el grupo C. No obstante en un estudio realizado en ratas Wistar por Buckley, Keseru et al. (2005) donde el objetivo fue investigar cómo una dieta materna con un alto contenido en Omega-6 puede programar a la cría en la regulación y

función de la insulina, la composición corporal y el metabolismo de los lípidos, reportan que ni el peso al nacimiento de la crías del grupo Omega-6, ni su peso corporal a los 3 meses de edad (90d) fue significativamente diferente (dato que se reprodujo en nuestro grupo de trabajo), por lo que es importante aclarar que dependiendo del tipo de grasa que ingiere la madre durante la gestación y lactancia, es el efecto que sufrirá la progenie en el metabolismo, por ejemplo, un aumento en la proporción de grasa corporal en la región abdominal, la cual no sólo se asocia con anomalías metabólicas sino que trae como consecuencia una disminución en la concentración de testosterona la cual se hace más pronunciada con el envejecimiento. Ya se ha mencionado que la producción de testosterona depende de la función normal del eje hipotálamo-hipófisis-gónada y que la obesidad disminuye la concentración de LH. Nuestro grupo de trabajo ya ha reportado en este modelo que tanto la concentración de testosterona y LH en suero se reducen en las crías del grupo OM, sin embargo, esta disminución es más pronunciada a medida que envejecen. Esto puede ser debido a un fallo testicular primario y/o secundario o bien a los daños causados por el estrés oxidante resultante del desequilibrio entre la producción de ROS y las enzimas antioxidantes responsables de su eliminación (Rodriguez-Gonzalez, Vega et al. 2014).

Ahora bien los mecanismos a nivel celular por los que la obesidad materna puede afectar diferentes aspectos de la salud reproductiva de las crías aún no están claros, específicamente en la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Un estudio en ratas macho Wistar en edad prepuberal (de 0.5 a 14.5d), realizado por Christante, Taboga et al. (2013) en el cual plantearon cómo la obesidad materna pudiera afectar el desarrollo de los testículos y la diferenciación de gonocitos, describieron que las madres de estas crías fueron previamente alimentadas durante 15 semanas con una dieta alta en grasas (20% de grasa saturada); ellos demostraron que los descendientes de estas madres presentaron disminución hasta en un 50% en el peso del testículo a los 4.5d, pero no hubo alteración en la histología del mismo al nacimiento, en comparación con su grupo C (descendientes de madres que recibieron dieta murina con un 4% de lípidos). No obstante reportan que el grupo MO presentó cambios en la migración de los gonocitos desde el centro hacia la periferia de los túbulos seminíferos, evento que durante el desarrollo neonatal es crucial para el ciclo celular, la reanudación de la mitosis y la diferenciación de éstos en espermatogonias, por lo que sugieren que el desarrollo testicular se puede ver afectado durante el periodo fetal, dando lugar a la reprogramación del desarrollo de los órganos y las consecuencias para la

vida adulta. En nuestro modelo observamos que el impacto de la obesidad materna tiene efectos en las crías macho durante el envejecimiento de las crías macho (110d, 450d y 650d) no hubo diferencias estadísticas en el peso del testículo (g). Sin embargo, la grasa gonadal (g) en el grupo OM fue mayor en comparación con el grupo C a 110d y 450d. Al analizar la misma dieta a las diferentes edades de estudio, la grasa gonadal del grupo OM fue mayor a 110d y 450d sin cambios en 650d, y en el grupo C sólo hubo diferencias a 110d sin cambios a 450d y 650d, datos que nos permitieron establecer este estudio para determinar los daños a nivel fisiológico y estructural del testículo, estos datos demuestran la consistencia del modelo. Lo anterior es importante ya que de acuerdo con Viguera-Villasenor, Rojas-Castaneda et al. (2011) se ha reportado que en pacientes obesos una gran cantidad de grasa se deposita en el escroto y esto puede causar estrés oxidativo y oxidar lípidos, aminoácidos y carbohidratos, así como daños al DNA, alterando la calidad de los espermatozoides.

De acuerdo con Noorafshan (2014) los factores ambientales como la obesidad materna puede alterar los parámetros histológicos (morfometría y celularidad) de los órganos reproductivos. Se tiene reportado que cuando se toman secciones sagitales, longitudinales y transversales de los testículos se pueden visualizar los túbulos seminíferos (McConnell, Westen et al. 1992), que constituyen el 80 % de la masa testicular (Liu, Chang et al. 2009). En nuestro estudio observamos que el área del túbulo seminífero en el grupo OM fue menor con respecto al grupo C a las diferentes edades. Cabe mencionar que Gaytan, Lucena et al. (1986), Mills, Mills et al. (1977) reportaron que durante el desarrollo de la rata aumenta el diámetro de los túbulos seminíferos y se reduce comúnmente cuando hay trastornos testiculares, es importante mencionar que a partir de esta medición se calcula el área y cobra relevancia su estudio ya que de acuerdo con Retana-Marquez, Viguera-Villasenor et al. (2014) probablemente los defectos morfológicos en estas determinaciones pueden ser la causa de menor fecundidad en los hombres, principalmente en aquellos con baja concentración de espermatozoides. No obstante de acuerdo con Morales, Horn et al. (2004) los cambios estructurales de los túbulos seminíferos relacionados con la edad incluyen cambios morfológicos, pérdida de epitelio seminífero, y abundancia de lisosomas y lípidos en las células de Sertoli, y en el presente trabajo se acentúan estas alteraciones en las crías macho del grupo OM tras la exposición materna a una dieta alta en grasas. Además, estudios morfológicos cuantitativos realizados en hombres adultos reportan una disminución

en el volumen, diámetro y longitud de los túbulos seminíferos, Johnson, Petty et al. (1986), Paniagua, Nistal et al. (1987).

Ahora bien esta reportado tanto en humanos como en animales de experimentación que el envejecimiento genera alteraciones en el epitelio seminífero, en nuestro trabajo observamos en ambos grupos (C y OM) vacuolización y discontinuidad epitelial; lo cual está asociado a dilataciones del espacio extracelular formadas por la exfoliación prematura de las células germinales (Tramer, Micali et al. 2002, Perheentupa and Huhtaniemi 2009). Estos antecedentes son de apoyo para establecer que la obesidad materna genera daños en la estructura celular y que con el envejecimiento testicular éstos se acentúan. Dentro del túbulo seminífero como anteriormente se había dicho ocurren los procesos de diferenciación y maduración de los espermatozoides; las células iniciales en esta vía son las espermatogonias, que dan lugar a los espermatocitos primarios por mitosis, se dividen meióticamente en dos espermatocitos secundarios, y finalmente llevan al desarrollo de los espermatozoides (Shen, Wu et al. 2014), dicho esto nosotros observamos que el número de espermatogonias disminuyó en la descendencia del grupo OM en comparación con el grupo C a 110d, 450d y 650d, y con respecto al mismo grupo a las diferentes edades las ratas de ambos grupos presentaron menor número de dichas células sin cambios a 450d y 650d. En relación a los espermatocitos, su número disminuyó en los descendientes del grupo OM en comparación con el C a 110d y 650d, en relación al estudio por edades estas células disminuyeron en el grupo OM a los 650d, no obstante en el grupo C permaneció sin cambios a 450d y 650d. Lo anterior nos sugiere que el grupo de obesidad materna presenta mayor exfoliación de células germinales así como desarreglo del epitelio seminífero lo que pudiera retrasar la diferenciación de la espermátide y sería una posible causa de la reducción observada en la concentración de espermatozoides. Los espermatozoides son especialmente susceptibles a los ROS, ya que carecen de las enzimas antioxidantes citoplasmáticas y tienen altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana. Como ya se mencionó anteriormente el estrés oxidativo en el espermatozoide puede aumentar el daño del DNA y la apoptosis y afectar la calidad del semen; el último puede ser utilizado como un índice de la fertilidad. En este contexto el grupo de trabajo ya ha reportado que las crías del grupo OM habían presentado una disminución en la calidad del semen y la fertilidad (Rodríguez-Gonzalez, Vega et al. 2014).

La espermatogénesis es un proceso replicativo que implica altas tasas de consumo de oxígeno mitocondrial por el epitelio germinal. Sin embargo la mala vascularización de los testículos significa que la concentración de oxígeno en este tejido es baja, por lo cual es vulnerable al estrés oxidante (Aitken and Roman 2008). El sistema antioxidante del testículo está conformado por varias enzimas antioxidantes, entre las cuales SOD es la primera línea de defensa (Conceicao, Franco et al. 2013). Es importante resaltar que el testículo contiene las isoformas SOD citosólica (Cu/Zn), mitocondrial (Fe/Mn) y extracelular (SOD-Ex) que es producida tanto por células de Sertoli como en las células germinales (Aitken and Roman 2008). De acuerdo con el análisis de Inmunohistoquímica (IHC) realizados por Oberley, Oberley et al. (1990) y Nonogaki, Noda et al. (1992), tanto en humanos como en hámster sirios adultos, se ha demostrado que SOD-1 se expresa predominantemente en espermatogonias y espermatozoides. Nuestro estudio analizó la expresión de SOD-1 la cual corresponde a la isoforma citosólica obteniendo menor porcentaje de inmunotinción en el grupo OM en comparación con el grupo C a 110d, incrementándose este porcentaje a los 450d y 650d, esto sugiere una asociación con el envejecimiento y la obesidad materna y que de acuerdo con Peltola, Huhtaniemi et al. (1996) también pudiera relacionarse con el incremento en el estrés oxidante conllevando a que se vea alterada la diferenciación de las células germinales, y generando daños en proteínas y lípidos implicados en el proceso de esteroidogénesis en el testículo; no obstante, en el análisis del mismo grupo a las diferentes edades observamos que el porcentaje de área inmunoteñida en el grupo OM fue mayor a 450d comparada con 110d y 650d, por el contrario el grupo C a los 110d presentó mayor porcentaje de área, el cual disminuyó, permaneciendo sin cambios a 450d y 650d. Los resultados obtenidos en el grupo C concuerda con lo obtenido por autores como Peltola, Huhtaniemi et al. (1992) y Salomon, Hackenhaar et al. (2013), quienes han reportado en ratas datos acerca de la actividad de SOD en el testículo ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) afirmando que con el envejecimiento esta decae.

Otro de los componentes enzimáticos del sistema de defensa es GPx, en los testículos de rata, se encuentran predominantemente las isoformas GPx-1 o citosólica, GPx-4 o Glutación peroxidasa hidroperóxido de fosfolípidos (PHGPx) y GPx epidídimal (Zini and Schlegel 1997, Vaisberg, Jelezarsky et al. 2005), estas se concentran en la mitocondria, núcleo y dominio acrosomal de los espermatozoides (Aitken and Roman 2008). En el presente trabajo observamos mayor porcentaje de área inmunoteñida a los 110d para GPx-

1/2 y 5 en los descendientes del grupo OM con respecto al grupo C, en relación al análisis por grupo a las diferentes edades de estudio observamos que disminuyó el área de inmunotinción en el grupo OM con respecto a la edad y que en el grupo C fue menor la expresión a los 650d, sin cambios en 110d y 450d lo que denota envejecimiento; nuestros resultados de IHC concuerdan en tendencia con el trabajo de Salomon, Hackenhaar et al. (2013) quien con el fin de crear un perfil oxidante que ayudara a dilucidar el proceso de senescencia en animales con y sin actividad reproductiva, compararon la actividad antioxidante de las enzimas GPx, glutatión S-transferasa (GST) y SOD, los niveles de antioxidantes no enzimáticos (vitamina C), así como daños en proteínas y lípidos en las gónadas de ratas macho; ellos reportaron en el grupo experimental, un aumento progresivo de la actividad de todas las enzimas antioxidantes hasta que los animales alcanzaron los 12 meses de edad y que esta decayó bruscamente en los animales de 24 meses, por el contrario en el grupo sin actividad reproductiva constataron que las actividades de las enzimas antioxidantes se mantuvieron estables de los 3 a los 12 meses de edad, pero de nuevo, la actividad cayó bruscamente en animales de 24 meses. De acuerdo a lo anterior tanto la actividad reproductiva del animal, el envejecimiento y la dieta materna, son factores importantes que modifican la expresión y actividad de GPx. Sin embargo, el conocer su perfil oxidante es importante ya que se ha reportado que selenoproteínas y el selenio son necesarios para el correcto desarrollo y capacidad fecundante de los espermatozoides (Tramer, Micali et al. 2002).

Por otro lado GPx-4 es una enzima intracelular y su especificidad en el testículo ha sido ampliamente reportada (Zini and Schlegel 1997, Vaisberg, Jelezarsky et al. 2005, Aitken and Roman 2008, Salomon, Hackenhaar et al. 2013). De acuerdo con (Puglisi, Tramer et al. 2005) es notable que el testículo de mamíferos exhiba la más alta actividad siendo casi dos órdenes de magnitud mayor que en el cerebro y el hígado, además se ha observado por microscopía electrónica en las espermátidas alargadas, así como en los espermatozoides del epidídimo, en la cromatina condensada, así como en las mitocondrias, ya que en particular su membrana presenta un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, siendo esta enzima un sistema de defensa contra el daño oxidativo. Nosotros observamos por IHC que el porcentaje de área inmunoteñida a 450d fue menor en descendientes de madres expuestas a una dieta alta en grasas con respecto al grupo C, y que a los 650d la expresión se incrementó en el grupo OM comparado con el grupo C. Así mismo en el análisis por grupo

a las diferentes edades de estudio, el porcentaje de área inmunoteñida en el grupo OM disminuyó a 650d respecto a 110d y en el grupo C resultó ser menor a 650d sin cambios en 110d y 450d. Lo anterior sugiere que la obesidad materna genera una disminución en la expresión de la enzima GPx-4 la cual al ser una proteína estructural pudiera estar afectando la motilidad de los espermatozoides (Wu, Oldfield et al. 1979).

Cao, Leers-Sucheta et al. (2004), en su estudio por establecer un vínculo entre el estrés oxidativo y la disminución en la esteroidogénesis relacionada con la edad, encontró que en preparaciones altamente purificadas de células de Leydig, el envejecimiento se acompaña de una expresión reducida de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, refiere que entre los antioxidantes no enzimáticos clave, sólo los niveles de glutatión reducido (GSH) disminuyeron significativamente en las células de Leydig. GSH participa en varias vías importantes implicadas en la defensa antioxidante incluyendo la reducción de hidroperóxidos tóxicos catalizados por GPx y algunas peroxirredoxinas, y reacciones de conjugación catalizadas por glutatión-S-transferasas. Lo anterior es importante ya que refiere que es posible que la reducción de GSH ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GS} \longrightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$) pudiera estar perjudicando gravemente el funcionamiento óptimo de las diversas actividades catalíticas, particularmente la eliminación de los radicales superóxido por GPx a través de la acción intermediaria de SOD, quedando reflejada en su expresión y es probable que esta sea la razón del incremento en el porcentaje de área inmunoteñida de SOD a los 450d en el grupo OM ($16.5\% \pm 1.5\%$) así como la disminución en GPx-1/2 y 5 ($6.3\% \pm 1.2\%$) y GPx-4 ($4.5\% \pm 0.7\%$) en el grupo OM a 450d.

Otra de las enzimas de este sistema de defensa es CAT considerada como una enzima clave en la eliminación del peróxido de hidrógeno, su actividad ha sido medida en hígado, riñón y cerebro de primates (Woodhead, Blackett et al. 1985.). No obstante Zini and Schlegel (1997) también han caracterizado la expresión del ARNm de CAT por *northern blot* e *hibridación in situ* en el tracto reproductivo masculino de ratas control de 60d, testículos de ratas de 10d a 90d y en testículos de ratas que fueron sometidas a ligadura del conducto eferente; reportando que en el testículo la expresión de CAT fue localizada principalmente en las células peritubulares e intersticiales, así como en el epidídimo y la próstata, además de observar que con la edad la expresión del RNAm decrece. Como ya se mencionó otro de los estudios relacionados con el envejecimiento es el realizado por Cao, Leers-Sucheta et al. (2004) que al tratar de establecer un vínculo funcional entre el exceso de estrés oxidativo y el

declive de la esteroidogénesis relacionado con la edad, reporta que tanto la actividad catalítica de CAT y los niveles de RNAm no mostraron cambios con la edad. En nuestro trabajo por IHC observamos que en los descendientes de madres que fueron alimentadas con una dieta alta en grasas el porcentaje de área inmunoteñida fue mayor con respecto a los del grupo C, y con respecto al análisis del mismo grupo durante el envejecimiento el grupo OM presentó mayor expresión a 450d comparada con 110d y 650d edades en las que el porcentaje de área inmunoteñida disminuye con respecto a la edad. Lo anterior nos muestra que la obesidad materna provoca un incremento del estrés oxidante, esto es importante ya que se ha visto que CAT juega un papel importante en la supervivencia de los espermatozoides, ya que después de la eyaculación, estos migran por el oviducto de la hembra, también reconocido como sitio para el almacenamiento de espermatozoides, durante este periodo éstos adquieren proteínas del oviducto que pueden afectar su fisiología (Gupta 2005).

Hasta el momento se sabe que la generación de radicales libres y oxidantes, como ROS y RNS, son el resultado común del metabolismo, así como un signo de envejecimiento normal o un sello distintivo de los procesos patológicos (Jung, Engels et al. 2007). Sin embargo los mecanismos de daño celular oxidativo durante el envejecimiento, son poco conocidos porque los intermediarios tóxicos son difíciles de detectar directamente. Algunas vías posibles incluyen reacciones que modifican los residuos de aminoácidos aromáticos en las proteínas dentro de los cuales, la O-tirosina es un marcador estable para la oxidación de la fenilalanina por el radical hidroxilo, mientras que 3-NT es un marcador para la oxidación por RNS de la tirosina (Leeuwenburgh, Hansen et al. 1998). En relación a los reportes donde se evalúa la expresión de la NT durante el envejecimiento encontramos que un estudio realizado en ratones C57BL por (Chigurupati, Son et al. 2008) en donde se demuestra que el ejercicio regular protege a los testículos de los cambios relacionados con la edad (disminución en el número de espermatogonias A, aumento de espermatogonias multinucleadas, megaloespermatocitos y espermátidas gigantes; además de observar gotitas de lípidos en el citoplasma de las células de Sertoli y la disminución de las células de Leydig), reportan que la producción de NT fue significativamente inferior en los testículos de ratones que corrieron en comparación con el grupo de ratones sedentarios. Lo anterior nos es relevante ya que en este trabajo observamos por IHC que en descendientes de madres que fueron alimentadas con una dieta alta en grasas presentaron mayor porcentaje de área

inmunoteñida a las diferentes edades de estudio (110d, 450d y 650 d) en relación con el grupo C, lo cual pudiera sugerirnos que las crías del grupo OM son menos activas resaltando que si bien los niveles fisiológicos de ROS son necesarios para mantener las funciones reproductivas, como la señalización celular, la producción de hormonas, la capacitación, la reacción acrosomal, la motilidad de los espermatozoides entre otras, un exceso de RNS debidas ya sea a la dieta materna como lo observamos en nuestro trabajo o el sedentarismo puede afectar negativamente la capacidad de reproductiva, causando la disfunción testicular, disminución de la secreción de gonadotropinas, además de alterar los parámetros seminales (Doshi, Khullar et al. 2012).

En relación al incremento en los porcentajes de área inmunoteñida de SOD ($16.5\% \pm 1.5\%$), CAT ($27.7\% \pm 0.8\%$), así como la disminución en GPx-1/2 y 5 ($6.3\% \pm 1.2\%$) y GPx-4 ($4.5\% \pm 0.7\%$) a los 450d en el grupo OM, es relevante mencionar que este mismo comportamiento se ha observado en un estudio realizado por (Sahoo, Roy et al. 2008) en donde evaluaron los efectos de hipotiroidismo transitorio (desde el nacimiento hasta 30 días) y el hipotiroidismo persistente (desde el nacimiento hasta 90 días) en el sistema de defensa antioxidante testicular de ratas maduras, comparándose con el fin de conocer el papel del estrés oxidativo inducido por el hipotiroidismo en el desarrollo testicular y la maduración; reportando en el hipotiroidismo persistente (disminución en el efecto de las hormonas tiroideas a nivel tisular; la causa más frecuente es la disminución en la síntesis y secreción de las mismas, y ocasionalmente resistencia periférica a las hormonas tiroideas) se genera una elevación en la actividad catalítica de SOD y CAT, con una disminución significativa de GPx y glutatión reductasa. Lo anterior nos sugiere que el consumo materno de una dieta alta en grasas, tras generar un desbalance entre los radicales libres y las defensas antioxidantes, también provoca daños en la función tiroidea que contribuye con el desarrollo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares (Franco, Fernandes et al. 2012). Así mismo se tienen antecedentes que explican que la hormona tiroidea tiene la función de regular el consumo de oxígeno y metabolismo energético mitocondrial en la fisiología testicular y sistema de defensa antioxidante durante el envejecimiento (Sahoo, Roy et al. 2008).

IX. CONCLUSIÓN.

De acuerdo con los resultados expuestos en el presente trabajo, sabemos que el consumo materno de una dieta alta en grasas durante la gestación y lactancia provoca daños al sistema reproductivo masculino de su descendencia alterando la estructura celular del testículo, generando un desequilibrio entre los sistemas de defensa antioxidante y la producción de radicales libres y/o especies reactivas, que con respecto al envejecimiento se acentúan y conllevan al desarrollo de problemas en la espermatogénesis, fertilidad, fecundidad e incluso perturbación del desempeño sexual. Por lo anterior, las mujeres en edad reproductiva deben mantener un peso adecuado, alimentación saludable y un estilo de vida que incluya una rutina de ejercicio físico dentro de las actividades diarias, a fin de no comprometer su salud y la de su producto, ya que los efectos de la programación durante la vida temprana se dan en todo el organismo de la progenie, siendo más susceptibles ciertos sistemas. Por lo que este estudio nos da la pauta a entender las causas tempranas de los daños en el sistema reproductivo masculino que se acentúan en la vida adulta de la descendencia.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Ahsan, H. (2013). "3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions." Hum Immunol **74**(10): 1392-1399.
- Aitken, R. J. and S. D. Roman (2008). "Antioxidant systems and oxidative stress in the testes." Oxid Med Cell Longev **1**(1): 15-24.
- Amaral, S., et al. (2008). "Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species." Curr Diabetes Rev **4**(1): 46-54.
- Barker, D. J., et al. (1990). "Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life." BMJ **301**(6746): 259-262.
- Barker, D. J., et al. (1993). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth." Diabetologia **36**(1): 62-67.
- Barrera, C. A., et al. (2013). Escenario actual de la obesidad en México. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. **51**: 292-299.
- Buckley, A. J., et al. (2005). "Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats." Metabolism **54**(4): 500-507.
- Cabler, S., et al. (2010). "Obesity: modern man's fertility nemesis." Asian J Androl **12**(4): 480-489.
- Camougrand, N. and M. Rigoulet (2001). "Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress." Respir Physiol **128**(3): 393-401.
- Cao, L., et al. (2004). "Aging alters the functional expression of enzymatic and non-enzymatic anti-oxidant defense systems in testicular rat Leydig cells." J Steroid Biochem Mol Biol **88**(1): 61-67.
- Cnattingius, S., et al. (2013). "Maternal obesity and risk of preterm delivery." JAMA **309**(22): 2362-2370.
- Conceicao, E. P., et al. (2013). "Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition--role of insulin resistance." J Nutr Biochem **24**(1): 81-87.
- Connor, K. L., et al. (2012). "Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function." J Physiol **590**(Pt 9): 2167-2180.
- Curtis, H. and N. Barnes (1996). La reproducción en: Invitación a la Biología. Madrid, España: 665-673.
- Chen, H., et al. (2001). "Age-related increase in mitochondrial superoxide generation in the testosterone-producing cells of Brown Norway rat testes: relationship to reduced steroidogenic function?" Exp Gerontol **36**(8): 1361-1373.

- Cheong, Y., et al. (2014). "Diet-induced maternal obesity alters ovarian morphology and gene expression in the adult mouse offspring." Fertil Steril **102**(3): 899-907.
- Chigurupati, S., et al. (2008). "Lifelong running reduces oxidative stress and degenerative changes in the testes of mice." J Endocrinol **199**(2): 333-341.
- Christante, C. M., et al. (2013). "Maternal obesity disturbs the postnatal development of gonocytes in the rat without impairment of testis structure at prepubertal age." Reproduction **146**(6): 549-558.
- da Silveira e Sa Rde, C., et al. (2003). "Evaluation of long-term exposure to Mikania glomerata (Sprengel) extract on male Wistar rats' reproductive organs, sperm production and testosterone level." Contraception **67**(4): 327-331.
- Dahlhoff, M., et al. (2014). "Peri-conceptual obesogenic exposure induces sex-specific programming of disease susceptibilities in adult mouse offspring." Biochim Biophys Acta **1842**(2): 304-317.
- Doshi, S. B., et al. (2012). "Role of reactive nitrogen species in male infertility." Reprod Biol Endocrinol **10**: 109.
- Dreher, I., et al. (1997). "Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines." J Trace Elem Med Biol **11**(2): 83-91.
- Drucker, C. R. (2005). Fisiología Médica. Manual Moderno. México: 581.
- Dupont, C., et al. (2012). "Maternal environment and the reproductive function of the offspring." Theriogenology **78**(7): 1405-1414.
- Erdemir, F., et al. (2012). "[The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters]." Actas Urol Esp **36**(3): 153-159.
- Franco, J. G., et al. (2012). "Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning." J Physiol **590**(Pt 21): 5503-5518.
- Frankel, S., et al. (1996). "Birthweight, body-mass index in middle age, and incident coronary heart disease." Lancet **348**(9040): 1478-1480.
- Furukawa, S., et al. (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." J Clin Invest **114**(12): 1752-1761.
- Gardner, D. S., et al. (2009). "Effect of the early-life nutritional environment on fecundity and fertility of mammals." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **364**(1534): 3419-3427.
- Gaytan, F., et al. (1986). "Morphometric aspects of rat testis development." J Anat **145**: 155-159.
- Geneser, F. (2000). Histología sobre las bases biomoleculares. E. M. Panamericana. Argentina.: 614-623.

- George, J. and R. Anderson (2013). Obesity, bariatric surgery and male reproductive function. Edimburgo: 179-189.
- Gluckman, P. D., et al. (2005). "Predictive adaptive responses and human evolution." Trends Ecol Evol **20**(10): 527-533.
- Gluckman, P. D., et al. (2007). "Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(31): 12796-12800.
- Gonzalez-Bulnes, A., et al. (2013). "Maternal diet-induced obesity in swine with leptin resistance modifies puberty and pregnancy outputs of the adult offspring." J Dev Orig Health Dis **4**(4): 290-295.
- Gruenewald, D. A. (2004). Aging and the Male Reproductive System. Encyclopedia of Endocrine Diseases. L. Martini. **I**: 122-125.
- Gupta, G. S. (2005). Proteomics of spermatogenesis. Nueva York. Springer: 721-748.
- Gutierrez, J. P., et al. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutricion 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, Mexico, Instituto Nacional de Salud Publica.
- Ibanez, L., et al. (2002). "Reduced ovulation rate in adolescent girls born small for gestational age." J Clin Endocrinol Metab **87**(7): 3391-3393.
- Johnson, L., et al. (1986). "Age-related variation in seminiferous tubules in men. A stereologic evaluation." J Androl **7**(5): 316-322.
- Jung, T., et al. (2007). "Nitrotyrosine and protein carbonyls are equally distributed in HT22 cells after nitrosative stress." Free Radic Biol Med **42**(6): 773-786.
- Kerr, J. B. (1992). "Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle." J Reprod Fertil **95**(3): 825-830.
- Kim, H. C., et al. (2007). "Expression of nitric oxide synthase isoforms in the testes of pigs." Anat Histol Embryol **36**(2): 135-138.
- Kondo, Y., et al. (2008). "Oral administration of tetrahydrobiopterin attenuates testicular damage by reducing nitric oxide synthase activity in a cryptorchid mouse model." J Androl **29**(2): 153-163.
- Leeuwenburgh, C., et al. (1998). "Markers of protein oxidation by hydroxyl radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats." Am J Physiol **274**(2 Pt 2): R453-461.
- Liu, Z., et al. (2009). "Stereological measurement of rat's seminiferous tubule." Chin Med J (Engl) **122**(21): 2643-2646.
- Lumey, L. H., et al. (2007). "Cohort profile: the Dutch Hunger Winter families study." Int J Epidemiol **36**(6): 1196-1204.

-
- Makris, S. L. (2011). Effect of Early Exposure on Reproductive Outcomes. Encyclopedia of Environmental Health. J. O. Nriagu, Elsevier. **5**: 234-239.
- Matheus, N. and A. López Ortega (2004.). "Degree of lipid peroxidation in testes of mice NMR1 according to age." Gaceta de Ciencias Veterinarias **10**(1): 82-86.
- McConnell, R. F., et al. (1992). "Proliferative Lesions of the Testes in Rat with Selected Examples from Mice." Guides for Toxicologic Pathology **UGR 3**: 1-10.
- Meikle, D. and M. Westberg (2001). "Maternal nutrition and reproduction of daughters in wild house mice (*Mus musculus*)." Reproduction **122**(3): 437-442.
- Meinhardt, A., et al. (1999). "Expression of mitochondrial marker proteins during spermatogenesis." Hum Reprod Update **5**(2): 108-119.
- Michalakakis, K., et al. (2013). "The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review." Metabolism **62**(4): 457-478.
- Mills, N. C., et al. (1977). "Morphological and biochemical changes which occur during postnatal development and maturation of the rat testis." Biol Reprod **17**(1): 124-130.
- Minsart, A. F., et al. (2013). "Neonatal outcomes in obese mothers: a population-based analysis." BMC Pregnancy Childbirth **13**: 36.
- Morales, E., et al. (2004). "Involution of seminiferous tubules in aged hamsters: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative morphological study." Histol Histopathol **19**(2): 445-455.
- Morales, E., et al. (2003). "Effect of ageing on the proliferation and apoptosis of testicular germ cells in the Syrian hamster *Mesocricetus auratus*." Reprod Fertil Dev **15**(1-2): 89-98.
- Mruk, D. D., et al. (2002). "Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility." Contraception **65**(4): 305-311.
- Nijland, M. J., et al. (2008). "Prenatal origins of adult disease." Curr Opin Obstet Gynecol **20**(2): 132-138.
- Nonogaki, T., et al. (1992). "Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs." Hum Reprod **7**(1): 81-85.
- Noorafshan, A. (2014). "Stereology as a valuable tool in the toolbox of testicular research." Ann Anat **196**(1): 57-66.
- O'Shaughnessy, P. J., et al. (2009). "Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice." Mol Cell Endocrinol **306**(1-2): 2-8.
- Oberley, T. D., et al. (1990). "Immunohistochemical localization of antioxidant enzymes in adult Syrian hamster tissues and during kidney development." Am J Pathol **137**(1): 199-214.

- Olivares, A., et al. (2010). "Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat model of diet-induced obesity." Gen Comp Endocrinol **166**(2): 356-364.
- Ottinger, M. A., et al. (2004). "The Japanese quail: a model for studying reproductive aging of hypothalamic systems." Exp Gerontol **39**(11-12): 1679-1693.
- Palmer, N. O., et al. (2012). "Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition." Spermatogenesis **2**(4): 253-263.
- Paniagua, R., et al. (1987). "Seminiferous tubule involution in elderly men." Biol Reprod **36**(4): 939-947.
- Peltola, V., et al. (1992). "Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis." J Androl **13**(5): 450-455.
- Peltola, V., et al. (1996). "Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis." Endocrinology **137**(1): 105-112.
- Perheentupa, A. and I. Huhtaniemi (2009). "Aging of the human ovary and testis." Mol Cell Endocrinol **299**(1): 2-13.
- Phillips, D. I., et al. (1994). "Thinness at birth and insulin resistance in adult life." Diabetologia **37**(2): 150-154.
- Puglisi, R., et al. (2005). "PHGPx in spermatogenesis: how many functions?" Contraception **72**(4): 291-293.
- Rae, M. T., et al. (2002). "The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep." Anim Reprod Sci **72**(1-2): 63-71.
- Ramlau-Hansen, C. H., et al. (2007). "Is maternal obesity related to semen quality in the male offspring? A pilot study." Hum Reprod **22**(10): 2758-2762.
- Retana-Marquez, S., et al. (2014). "Sexual behavior attenuates the effects of chronic stress in body weight, testes, sexual accessory glands, and plasma testosterone in male rats." Horm Behav **66**(5): 766-778.
- Rhind, S. M., et al. (1998). "Effects of restricted growth and development of Brecon Cheviot ewe lambs on subsequent lifetime reproductive performance." Small Ruminant Research **30**: 121-126.
- Rivera Dommarco, J. A., et al. (2012). Obesidad en México: recomendaciones para una política de estado. México. Dirección de Publicaciones y Fomento Editorial: 2-17.
- Rodriguez-Gonzalez, G. L., et al. (2014). "Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility." Int J Obes (Lond).
- Rodriguez-Gonzalez, G. L., et al. (2012). "Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring." J Dev Orig Health Dis **3**(5): 321-326.

- Ross, H. M., et al. (2006). Histología, Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina: 684-726 y 864.
- Russell, L. D., et al. (1987). "Hormonal control of pubertal spermatogenesis." Endocrinology **120**(4): 1615-1632.
- Sahoo, D. K., et al. (2008). "Hypothyroidism impairs antioxidant defence system and testicular physiology during development and maturation." Gen Comp Endocrinol **156**(1): 63-70.
- Salomon, T. B., et al. (2013). "Oxidative stress in testis of animals during aging with and without reproductive activity." Exp Gerontol **48**(9): 940-946.
- Segovia, S. A., et al. (2014). "Maternal obesity, inflammation, and developmental programming." Biomed Res Int **2014**: 418975.
- Segura-Campos, M., et al. (2013). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Omnia Science. Barcelona: 56.
- Seremak-Mrozikiewicz, A., et al. (2014). "Fetal programming as a cause of chronic diseases in adult life." Ginekologia Polska **85** (1): 43-48.
- Setchell, P. B. (1978). The Mammalian Testis. Reproductive Biology Handbooks New York, Cornell University Press: 181-218.
- Shen, G., et al. (2014). "Upstream and downstream mechanisms for the promoting effects of IGF-1 on differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes." Life Sci **101**(1-2): 49-55.
- Sinha Hikim, A. P., et al. (2003). "Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis." J Steroid Biochem Mol Biol **85**(2-5): 175-182.
- Sloboda, D. M., et al. (2009). "Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat." PLoS One **4**(8): e6744.
- Taylor, P. D. and L. Poston (2007). "Developmental programming of obesity in mammals." Exp Physiol **92**(2): 287-298.
- Teerds, K. J., et al. (2011). "Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models." Hum Reprod Update **17**(5): 667-683.
- Tenenbaum-Gavish, K. and M. Hod (2013). "Impact of maternal obesity on fetal health." Fetal Diagn Ther **34**(1): 1-7.
- Tiba, T., et al. (1993). "Regularities and irregularities in the structure of the seminiferous epithelium in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). I. Suggestion of the presence of the seminiferous epithelial cycle." Anat Histol Embryol **22**(3): 241-253.
- Tramer, F., et al. (2002). "Enzymatic and immunochemical evaluation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in testes and epididymal spermatozoa of rats of different ages." Int J Androl **25**(2): 72-83.

-
- Tresguerres, J. F. A. (1999). Fisiología Humana. Mc Graw-Hill. Madrid España: 1033-1047.
- Vaisberg, C. N., et al. (2005). "Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen." Theriogenology **64**(2): 416-428.
- Vigueras-Villasenor, R. M., et al. (2011). "Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats." Acta Histochem **113**(2): 214-220.
- Vincent, H. K., et al. (2007). "Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity." Diabetes Obes Metab **9**(6): 813-839.
- Wang, Y., et al. (2007). "[Diet-induced obesity affects testis development in pubertal rats]." Zhonghua Nan Ke Xue **13**(6): 514-519.
- Weinbauer, F. G. and E. Nieschlag (1993.). Hormonal Control of Spermatogenesis. USA., Academic Press: 99-130.
- Williams, L., et al. (2014). "Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review." Biochim Biophys Acta **1842**(3): 507-519.
- Woodhead, A. D., et al. (1985.). "Molecular biology of aging. ." Exp Gerontol **20**(6): 33-42.
- Wu, A. S., et al. (1979). "Specific effect of selenium deficiency on rat sperm." Biol Reprod **20**(4): 793-798.
- Zambrano, E. (2009). "[The transgenerational mechanisms in developmental programming of metabolic diseases]." Rev Invest Clin **61**(1): 41-52.
- Zambrano, E., et al. (2014). "Fetal programming of sexual development and reproductive function." Mol Cell Endocrinol **382**(1): 538-549.
- Zambrano, E., et al. (2010). "Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats." J Physiol **588**(Pt 10): 1791-1799.
- Zhang, S., et al. (2011). "Maternal obesity and the early origins of childhood obesity: weighing up the benefits and costs of maternal weight loss in the periconceptual period for the offspring." Exp Diabetes Res **2011**: 585749.
- Zini, A. and P. N. Schlegel (1997). "Expression of glutathione peroxidases in the adult male rat reproductive tract." Fertil Steril **68**(4): 689-695.

1. APENDICE

1.A Procedimiento para la elaboración de dietas experimentales.

Los reactivos utilizados para la elaboración de las dietas se enlistan a continuación:

- Caseína libre de vitaminas, de Harlan Tekland®
- L- Cistina Diclorhidrato, de Sigma Aldrich®
- Mezcla de Minerales AINK-76, de Harlan México® S.A.de C.V.
- Mezcla de Vitaminas AIN-93 VX, de Harlan México® S.A.de C.V.
- Colina Clorohidrato, de Sigma Aldrich®
- α – Celulosa, de Sigma Aldrich®
- Almidón de maíz de Droguería Cosmopolita® S.A de C.V.
- Aceite Comestible puro de Soya Nutrioli® de Ragasa Industrias S.A. de C.V.
- Manteca de cerdo de JC Fortes®
- Azúcar refinada de Great Value®

La dieta fue elaborada de la siguiente manera:

- a. Se pesó la formulación mencionada en el texto la cantidad correspondiente de cada componente por separado usando la balanza analítica Sartorius® ED623SCW así como la báscula EURA® 2000/100 (capacidad máxima=100 Kg y d=50 g), según la sensibilidad requerida en cada caso.
- b. Se adicionó primero la cantidad requerida de manteca de cerdo en la mezcladora de paletas y se accionó en velocidad intermedia durante 5 minutos o bien hasta que la manteca se distribuyera uniformemente en el fondo.
- c. Se mezclaron todos los componentes sólidos durante 5 minutos en velocidad baja en la mezcladora (siendo las mezclas de: vitaminas AIN-76 y de minerales AIN-93VX las últimas en incorporarse)
- d. Después, sin detener el mezclado se agrego la cantidad correspondiente al aceite de soya.
- e. A velocidad intermedia se mezcló por 5 minutos más o hasta haber obtenido una masa homogénea de consistencia adecuada para ser roída por los animales y a la vez ser moldeada con las manos.
- f. La dieta se almacenó en bolsas de polietileno opacas, por lapsos no mayores a un mes en un cuarto frío de 4°C.

Accepted Article Preview: Published ahead of advance online publication



Maternal obesity and over-nutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertilityGL Rodríguez-González et al

G L Rodríguez-González, C C Vega, L Boeck, M Vázquez, C Bautista, L A Reyes-Castro, O Saldaña, D Lovera, P W Nathanielsz, E Zambrano

Cite this article as: G L Rodríguez-González, C C Vega, L Boeck, M Vázquez, C Bautista, L A Reyes-Castro, O Saldaña, D Lovera, P W Nathanielsz, E Zambrano, Maternal obesity and over-nutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertilityGL Rodríguez-González et al, *International Journal of Obesity* accepted article preview 15 December 2014; doi: [10.1038/ijo.2014.209](https://doi.org/10.1038/ijo.2014.209).

This is a PDF file of an unedited peer-reviewed manuscript that has been accepted for publication. NPG are providing this early version of the manuscript as a service to our customers. The manuscript will undergo copyediting, typesetting and a proof review before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers apply.

Received 1 September 2014; revised 11 November 2014; accepted 23 November 2014; Accepted article preview online 15 December 2014

Maternal obesity and over-nutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility.

Guadalupe L Rodríguez-González¹, Claudia C Vega¹, Lourdes Boeck¹, Magaly Vázquez¹, Claudia Bautista¹, Luis A Reyes-Castro¹, Omar Saldaña¹, Daniela Lovera¹, Peter W Nathanielsz², Elena Zambrano¹.

1 Reproductive Biology Department, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

2 Center for Pregnancy and Newborn Research, Department of Obstetrics, University of Texas Health Science Center San Antonio, San Antonio, TX, USA.

* Corresponding author. Elena Zambrano Tel.: +52 55 5487 0900x2417, fax: +52 55 5655 9859. E-mail address: zamgon@unam.mx

Running title: male pups reproductive function of obese mothers

ABSTRACT

Purpose. Increasing evidence exists that maternal obesity and overnutrition (MO) during pregnancy and lactation have long-lasting consequences for progeny metabolism, cardiovascular and endocrine function. Data on effects of MO on offspring reproduction are limited. We hypothesized that MO during pregnancy and lactation in founder F_0 rat mothers would increase testicular and sperm oxidative stress (OS) and adversely impact male fertility in their F_1 offspring. **Methods.** We induced pre-pregnancy MO by feeding F_0 females a high fat diet from weaning through pregnancy and lactation. After weaning all F_1 rats ate control (C) diet. We determined serum testosterone, malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS), and superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activity in F_1 testes and sperm at postnatal days (PND) 110, 450 and 650. **Results.** At PND 450 and 650 MO offspring had lower LH while testosterone levels were lower at all ages. Testicular MDA and ROS concentrations and SOD and GPx activity were higher in MO F_1 at all ages. Nitrotyrosine immunostaining was higher at all ages in MO F_1 testes than C F_1 . At PND 450 and 650, MO F_1 spermatozoa showed higher MDA concentrations and lower SOD and GPx activity with reduced sperm concentration, viability and motility and more sperm abnormalities. Fertility rate was not affected at PND 110 but was lower in MO F_1 at PND 450 and 650. **Conclusions.** We conclude that MO during pregnancy and lactation increases F_1 testicular and sperm OS leading to premature aging of reproductive capacity.

Key words: aging, developmental programming, fertility, maternal obesity, sperm, testosterone.

Introduction

The worldwide prevalence of obesity has risen dramatically over the past few decades, an increase also reflected in women of reproductive age^{1, 2}. Adverse environments *in utero* including both maternal under- or over- nutrition may disturb the process of cell proliferation and differentiation leading to changes in organogenesis and developmental programming. The resultant changes in phenotype can enhance susceptibility to diseases in adult offspring^{3, 4} such as type 2 diabetes⁵, hypertension⁶, obesity^{7, 8} and alterations in reproductive function^{9, 10}. Male rat offspring of mothers that were protein restricted during pregnancy are overweight and have increased serum triglycerides, insulin, and leptin as well as a lower sperm count and decreased fertility¹⁰⁻¹². At the other extreme, in humans^{7, 13} and experimental animal models, offspring of obese mothers^{14, 15} are obese and exhibit metabolic changes as well as alterations in anxiety, associative learning and motivation^{16, 17}.

The recent growth of interest in maternal obesity and developmental programming has generally focused on complications in the cardiovascular system, especially hypertension, and predisposition to metabolic dysfunction, mainly obesity and diabetes. In contrast, programming of offspring reproductive capacity by maternal obesity is not well-documented. In rats, female offspring of mothers fed a high fat diet during pregnancy and lactation enter puberty earlier¹⁸, have higher serum leptin and insulin levels¹⁹ and an increased incidence of prolonged or persistent oestrus which may affect reproductive function²⁰. In humans, maternal obesity is related to earlier timing of pubertal milestones in male offspring²¹. Increased maternal BMI is associated with decreased inhibin B in serum of male offspring²².

In recent years obesity and male infertility have increased in parallel²³. Studies in humans^{24, 25} and in animals^{26, 27} have shown that obese males have lower sperm quality and that their sperm have more morphologic defects, more DNA damage and increased oxidative stress. The causes of male infertility are multifactorial but among these causes, oxidative stress is involved in normal and accelerated age related male

infertility²⁸. However, a correlation between maternal obesity and male offspring infertility associated with oxidative stress during active reproductive life and aging has not been established. We hypothesized that maternal obesity prior to and during pregnancy increases oxidative stress in offspring testes and sperm which then leads to premature aging of offspring reproductive function. We evaluated the relationship between maternal obesity during pregnancy and oxidative stress as well as reproductive performance of their male offspring.

Methods

Standardization of females used to produce the mothers (F₀) in this study.

Female albino Wistar rats were born and maintained in the animal facility of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), Mexico City, Mexico accredited by the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC). Rats were maintained under controlled lights (lights on from 07:00 to 19:00 h at 22–23°C) and fed normal laboratory chow (Zeigler Rodent RQ22-5, USA) containing 22.0% protein, 5.0% fat, 31.0% polysaccharide, 31.0% simple sugars, 4.0% fiber, 6.0% minerals and 1.0% vitamins (w/w), energy 4.0 kcal g⁻¹. At age between 16–17 weeks, when they weighed between 200 – 240 g, females were bred to randomly assigned, non-litter mate, proven male breeders. At delivery on day 0 litters that provided Founder Generation (F₀) mothers were culled to 10 pups, each containing at least four females. At weaning (day 21) one female F₀ pup from each litter was randomly assigned to either a control (C; *n* = 5 to 6) group fed laboratory chow or to a maternal obesity group (MO; *n* = 5 to 6) fed a high energy, obesogenic diet containing 23.5% protein, 20.0% animal lard, 5.0% fat, 20.2% polysaccharide, 20.2% simple sugars, 5.0% fiber, 5.0% mineral mix, 1.0% vitamin mix (w/w), energy 4.9 kcal g⁻¹. Thus each F₀ group had only one female from any litter and F₀ females in different groups, but not within groups, were sisters, providing homogeneity in F₀ mothers' own developmental programming and genetics.

F₁ offspring

F₀ female rats were placed with proven male breeders on day 120 and conceived during the next cycle. Lactating mothers were maintained on their pregnancy diet. Litter size and pup weight were recorded at birth. Ano-genital distance was measured to identify males and females¹¹. Litters with more than 14 pups were excluded. To ensure F₁ (first generation) offspring homogeneity, on postnatal day (PND) 2 all litters studied were adjusted to 10 pups with equal numbers of males and females wherever possible. Offspring were weaned at PND 21, housed 5 per cage and fed Chow diet throughout the study. Only male offspring were used for the study. At PND 110, 450 and 650, after 6 hours of fasting male rats were decapitated using a rodent guillotine (Thomas Scientific, NJ) by trained personnel experienced in the procedure. F₁ males evaluated at the three ages were siblings. F₁ males were decapitated between 12.00 to 14.00 hours. For each age group, trunk blood was collected and serum separated. Both testes were dissected, cleaned from surrounding fat, and weighed. One testis was frozen and stored at -70°C until analyzed. The second testis was fixed in 4% paraformaldehyde and paraffin embedded. The sternal, pancreatic, retroperitoneal and gonadal fat pads were dissected and weighed individually. At the three PND studied the cauda epididymis and vas deferens were rapidly removed and placed in saline at 37°C. Sperm were removed by clearing the vas deferens with tweezers and chopping the cauda epididymis with scissors.

Tissue and sample preparation

Testes were homogenized in saline at 4°C and aliquots obtained and frozen at -70°C for later protein quantification using the Bradford method and for determination of biomarkers of oxidative stress (ROS and antioxidant enzymes). Lipid peroxidation was determined at the time of testicular homogenization and sperm release. All determinations were performed in duplicate and averaged for statistical analysis.

Sperm aliquots containing 5×10^6 and 10×10^6 spermatozoa underwent 6 thermal shock cycles from -70°C to 45°C, sonication for two minutes with 6 intervals of 20 seconds

each, and were then placed in ice and stored frozen at -70°C until quantified for antioxidant enzymes.

Hormone measurements

Serum follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) levels were determined by double antibody radioimmunoassay (RIA) using standard and specific anti-rat LH antibodies from the National Institute of Diabetes, Digestive Kidney Diseases. FSH and LH were iodinated by the chloramine-T method, following separation of protein-bound and free [^{125}I] by Sephadex G-100. Results are expressed as NIDDK-rat-FSH-RP2 and NIDDK-rat-LH-RP3. The intra- and inter assay coefficients of variations were <4 and <7.9 and <5.1 and <6.5 , respectively¹⁰.

Serum testosterone was determined using a commercial rat kit, DPC Coat – a – Count (TKTT1) from Diagnostic Products (Los Angeles, USA). The intra-and inter assay variability was <8.17 and < 8.83 , respectively¹⁰.

Lipid peroxidation assay

Lipid peroxidation was determined the same day on which testes were homogenized and sperm were obtained. Aliquots containing 5 million of sperm were adjusted with saline to $100\ \mu\text{l}$, at room temperature without thermal shock or sonication. Lipid peroxidation was determined in $100\ \mu\text{l}$ aliquots of either homogenized testes or 5×10^6 sperm by measuring malondialdehyde (MDA) by the thiobarbituric acid-reactive substances assay (TBARS). All samples were read in a plate at $532\ \text{nm}$ in a Perkin-Elmer LS50-B luminescence spectrometer. Results were expressed as nmol MDA per mg of protein¹⁵ or nmol MDA per 5 million sperm²⁹. Intra and inter assay coefficients of variation were <6 and $<8\%$, respectively.

Reactive oxygen species (ROS) assay

5 μ l of homogenized testes were used to determine ROS. A standard curve was obtained using increasing concentrations of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) and incubated in parallel with the samples (37°C for 60 min). At the end of the incubation period fluorescent signals at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 525 nm were recorded in a Perkin-Elmer LS50-B luminescence spectrometer. Results were expressed as nmoles of DCF formed per mg of protein per minute¹⁵ or per nmoles of DFC formed per 5 million sperm per minute²⁹.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was determined in 10 μ l aliquots of homogenized testes or sperm with a RANSOD kit (RANDOX laboratories limited, UK). A standard curve was obtained according to the manufacturer's instructions. All samples were read in a plate at 505 nm in a Perkin-Elmer LS50-B luminescence spectrometer at 0, 30 sec and 3 min at 37 °C. Results were expressed as units of activity per mg of protein¹⁵ units of activity per 5 million sperm²⁹.

Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was determined in 10 μ l aliquot of homogenized testes or sperm with the RANSEL kit (RANDOX laboratories limited, UK). All samples were read in a plate at 304 nm in a Perkin-Elmer LS50-B luminescence spectrometer at baseline, 1, 2 and 3 min at 37 °C. Results were expressed as milliunits per mg of protein¹⁵ or milliunits per 10 million sperm²⁹.

Nitrotyrosine histology

5 μm paraffin sections of the testis were immunostained with affinity-purified mouse monoclonal antibody anti-nitrotyrosine MAB5404 (Millipore, USA) at 1:200 using an ABC elite kit (Vector Laboratories, USA) and visualized using 2.5% nickel sulfate with 0.02% chromogen in 0.175 M sodium acetate ¹⁵.

Histological evaluation of the testes

Tissue was mounted on slides with the tubules cut transversally to evaluate seminiferous tubule diameter and area and number of spermatogonia and spermatocytes. From one tissue section, at least 30 – 40 transverse seminiferous tubules per animal were photographed at 40x with an Olympus BX51 light microscope using image analysis software (Image-Pro Plus Version 3.1., Media Cybernetics, USA). Spermatogonia and spermatocytes were counted according to their hematoxylin and eosin staining (spermatogonia stained purple and spermatocytes pink) using a digital counter. The seminiferous tubule diameter and area (μm^2) were measured by planimetry (AxioVision Rel. 4.0 USA. Media Cybernetics, Inc. USA) in 40 – 50 transverse seminiferous tubules per animal that were photographed at 10x ^{30, 31}. All histological measurements were performed by two independent observers and results averaged.

Sperm measurements

Sperm viability was assessed by mixing 10 ml of saline (0.90% w/v of NaCl) containing spermatozoa with 10 ml of eosin. Live spermatozoa were identified by membrane integrity, which prevented staining with eosin. Dead sperm were easily identified after staining as previously described ²⁹. Two hundred sperm were counted under a light microscope. Results were expressed as the percentage of live cells. Sperm concentration and motility were evaluated with a computerized sperm analyzer (Sperm Quality Analyzer). For sperm morphology 10 μl of sample was taken smeared and stained using a quick staining kit for sperm morphology (FertiMexico S.A de C.V, Mexico). Abnormal sperm morphology was classified as defects in the sperm head,

midpiece or tail. Head defects included large, small, tapered, pyriform, round, and amorphous heads, heads with a small acrosomal area and double heads. Midpiece defects included bent neck, asymmetrical insertion of the midpiece into the head, a thick or irregular midpiece, and an abnormally thin midpiece. Tail defects included short, multiple, hairpin, broken or bent tails, tails of irregular width, coiled tails. For analysis of sperm abnormalities, 200 sperm were counted under light microscope at 40X.

Evaluation of fertility rate

At PND 110, 450 and 650 one experimental male was placed for one week with two non-experimental group virgin females aged 4 months. Males were then separated from the females who were kept individually until day 15 of gestation²⁹. The male was considered fertile when at least one of the two females became pregnant. Results were expressed as the percentages of fertile males and pregnant females.

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm SEM, n=5 to 6 per group from different litter. We evaluated the differences between groups at the same age and within the same groups at different ages. Data were analyzed using two way multiple analysis of variance (ANOVA) followed by Holm-Sidak test. Fertility rate was analyzed using a χ^2 test. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Offspring (F₁) body, testicular, epididymal fat and total fat weight

At PND 110 group body weights were similar but at PND 450 and 650 MO F₁ were heavier than C pups (Fig. 1A). Testicular weight was not different between F₁ C and MO at any age (Fig. 1B). In contrast gonadal and total fat were both higher in F₁ MO at PND 110 and 450 than those from the C (Fig. 1C and 1D). Body weight and gonadal fat

increased at PND 450 compared to 110 in both groups; total fat in both groups did not change with age. Testicular weight did not change with age (Fig. 1).

F₁ hormone concentrations

F₁ FSH serum levels were similar between groups at all ages (Fig. 2A), whereas LH serum levels at PND 450 and 650 were lower in MO offspring compared to C offspring (Fig. 2B). Testosterone serum levels were lower in MO F₁ pups than C at all ages (Fig. 2C). When hormone concentrations were analyzed within the same groups at different ages, FSH did not change with age in both groups, whereas LH and testosterone serum levels were decreased at PND 450 and 650 (Fig. 2).

F₁ testicular oxidative stress biomarkers

MDA and ROS concentrations were higher at all ages in the testes of F₁ MO (Fig. 3A and 3B) as were the antioxidant enzymes SOD and GPx (Fig. 3C and 3D). When oxidative stress biomarkers were analyzed within groups at different ages MDA concentration, SOD and GPx activity did not change due to the age, whilst the increase in ROS levels in the MO were much higher at PND 650 in comparison with PND 110 and 650 (Fig. 3). At all ages, testes of F₁ MO demonstrated higher nitrotyrosine immune reactivity than C (Fig. 4A). No differences were observed by age (Fig. 4A).

F₁ testicular histology.

At all ages, the seminiferous tubule area (Fig. 4B) as well as the number of spermatogonia per transversal tubule (Fig. 4C) were lower in F₁ MO compared to C offspring. In F₁ MO males, the number of spermatocytes per transversal tubule was lower than C offspring at PND 110 and 650 (PND 110 = C: $155 \pm 5a$, MO: $120 \pm 5a^*$; PND 450 = C: $120b \pm 8$, MO: $115 \pm 13a$; PND 650 = C: $131 \pm 4b$, MO: $65 \pm 4b^*$). In both C and MO offspring the seminiferous tubule area did not change with age (Fig. 4B), but

spermatogonia (Fig. 4C) and spermatocyte number per seminiferous tubule decreased with age in both groups.

F₁ sperm oxidative stress biomarkers

At PND 450 and 650 MDA levels were higher and SOD and GPx activity lower in sperm of F₁ MO compared to F₁ C. (Figs. 5A, B and C). While age increased MDA and decreased GPx activity the changes occurred earlier, PND 450, in F₁ MO compared to C (5A and C). SOD decreased with age in MO but not in the F₁ C (Fig.5B).

F₁ sperm parameters

Sperm viability, motility, concentration and morphology at PND 110 were similar in the two groups. However, at PND 450 and 650 all three measures were decreased in F₁ MO compared with C (Fig.5D-F). The percentage of normal sperm was reduced in the F₁ MO compared with F₁ C at PND 450 (Fig. 6A and B).

F₁ fertility rate

Fertility rate expressed as fertile males and the number of females successfully bred was similar in both groups at PND 110. At PND 450 the percentage of pregnant females was lower in the F₁ MO than C (Fig 6D). At PND 650 the percentage of fertile males and pregnant females was lower in the F₁ MO than C (Fig 6C and D). Both evaluations of fertility decreased with age in MO offspring but unchanged in C offspring (Fig 6C and D).

Discussion

Epidemiological³² and animal studies^{14, 33} have shown that maternal obesity during gestation is an important determinant of offspring body weight. In several previous studies we have reported that F₁ males from F₀ obese mothers exhibit increased body

weight, fat, adiposity index, serum triglycerides, leptin, insulin as well as insulin resistance^{14, 15, 34}. This occurs even when the F₁ males from F₀ obese mothers are fed the normal control laboratory diet. In the present study the MO F₁ were heavier than C and had more gonadal and total fat accumulation, demonstrating the consistency of the model. Abdominal obesity is not only associated with metabolic abnormalities³⁵ but also with a decline in testosterone levels that becomes more pronounced with aging³⁶. Testosterone production depends on normal function of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis³⁷. Obesity decreases LH concentration³⁸. In the present study LH and testosterone serum levels were decreased in the male MO F₁. However, the decline was much more pronounced as they aged. This may be due to a primary and/or a secondary testicular failure as suggested by other authors³⁹ additional to damage caused by oxidative stress resulting from the imbalance between the production of ROS and the antioxidant enzymes responsible for their removal⁴⁰.

Obesity *per se* has been associated with oxidative stress and high levels of ROS⁴¹. Prenatal hypoxia, maternal under or overnutrition and overexposure to glucocorticoids can lead to oxidative stress^{42, 43}. In previous studies we reported that MO increased F₀ maternal insulin, glucose, HOMA, leptin, triglycerides, cholesterol, retroperitoneal fat, and also that the maternal liver showed increased MDA and ROS concentrations and SOD and GPx activity¹⁵. In addition, several studies have shown that maternal obesity is associated with altered levels of plasma interleukin-6 and 10⁴⁴, augmented oxidative stress in maternal oocytes before pregnancy⁴⁵ and in the placenta, all of which may have harmful effects on the embryos and fetuses⁴⁶.

Studies in experimental animals support the hypothesis that oxidative stress in the offspring induces programmed phenotypes^{43, 47}. Maternal protein restriction in the rat, increases pancreatic oxidative stress and impairs offspring pancreatic antioxidant enzyme function⁴⁸. At the other extreme, maternal obesity in the rat negatively affects female offspring reproductive function^{18, 49}.

Testicular oxidative stress appears to be a common feature of the male infertility that results from decreased spermatogenesis and sperm damage⁵⁰. In the present study we found that oxidative stress was increased (MDA and ROS) in the MO F₁ testes from the MO. Oxidative damage can also be caused by an increase in reactive nitrogen species (RNS) which have also been implicated in producing testicular dysfunction and abnormal semen⁵¹. Nitrotyrosine is a product of tyrosine nitration and is an indicator of cell damage⁵². We observed that the testes from the MO offspring showed higher nitrotyrosine immunoreactivity. To maintain physiological levels of ROS and RNS, all tissues including reproductive tissues possess different antioxidant enzymes that work in synergy to reduce cytotoxic effects of free radicals⁵³. Our data show increased activity of SOD and GPx in the MO F₁ testes accompanied by increased production of markers of oxidative stress. We interpret these findings as showing compensation by anti-oxidant systems which was however inadequate to prevent the rise in oxidative stress. This dysregulation in the redox balance can have potentially harmful effects on germ cells and sperm⁵⁴. Aging is characterized by a progressive decline in cellular function due to the accumulation of ROS, that eventually will lead to the dysfunction and failure of physiological functions⁵⁵.

Lipoperoxidation and its products (like MDA) are toxic to germ cells damaging proteins and DNA and increasing apoptosis^{28, 56}. All these can affect the process of spermatogenesis that transforms spermatogonia to spermactocytes, spermatids and spermatozoa⁵⁷. Our histological analysis demonstrated that maternal obesity decreases offspring spermatogonia and spermatocyte numbers, a potential cause of the observed reduction in sperm concentration. Sperm are especially susceptible to ROS because they lack cytoplasmic antioxidant enzymes and have high levels of membrane polyunsaturated fatty acids⁵⁸. Oxidative stress in sperm can increase DNA damage and apoptosis and affect sperm quality⁴⁰; the latter can be used as an index of fertility⁵⁷. In this context we found that sperm from MO offspring had increased oxidative stress and decreased sperm quality and fertility. Evidence indicates that obesity can directly negatively impact male fertility⁵⁹ through different mechanisms such as decreased sex hormone secretion^{24, 60}, hyperinsulinemia, or due to the direct action of leptin on

testicular function⁶⁰. We propose that in addition to these direct effects of obesity the observed changes in MO F₁ offspring are also due to developmental programming by the challenge of maternal obesity to the F₁ during their development. Further studies will be needed to determine the role played by each of these mechanisms. What our study does establish, for the first time, is that there are F₁ negative reproductive outcomes consequent on maternal obesity.

Acknowledgements

Rodríguez-González GL* and Reyes-Castro LA* are graduate students from Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México and are recipients of Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) fellowship. This work was supported by CONACyT México 155166.

Conflict of interest

The authors have nothing to disclose and have no conflict of interest.

References

1. Taylor PD, Samuelsson AM, Poston L. Maternal obesity and the developmental programming of hypertension: a role for leptin. *Acta Physiol (Oxf)* 2014; **210**: 508-23.

2. Zambrano E, Nathanielsz PW. Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. *Nutrition reviews* 2013; **71** Suppl 1: S42-54.
3. Williams L, Seki Y, Vuguin PM, Charron MJ. Animal models of in utero exposure to a high fat diet: A review. *Biochimica et biophysica acta* 2014; **1842**: 507-19.
4. Parlee SD, Macdougald OA. Maternal nutrition and risk of obesity in offspring: The Trojan horse of developmental plasticity. *Biochimica et biophysica acta* 2014; **1842**: 495-506.
5. Portha B, Chavey A, Movassat J. Early-life origins of type 2 diabetes: fetal programming of the beta-cell mass. *Experimental diabetes research* 2011; **2011**: 105076.
6. Ingelfinger JR, Nuyt AM. Impact of fetal programming, birth weight, and infant feeding on later hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2012; **14**: 365-71.
7. Desai M, Beall M, Ross MG. Developmental origins of obesity: programmed adipogenesis. *Current diabetes reports* 2013; **13**: 27-33.

8. Sarr O, Yang K, Regnault TR. In utero programming of later adiposity: the role of fetal growth restriction. *Journal of pregnancy* 2012; **2012**: 134758.
9. Zambrano E, Guzman C, Rodriguez-Gonzalez GL, Durand-Carbajal M, Nathanielsz PW. Fetal programming of sexual development and reproductive function. *Molecular and cellular endocrinology* 2014; **382**: 538-49.
10. Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Garcia-Becerra R, Boeck L, Diaz L *et al*. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *The Journal of physiology* 2005; **563**: 275-84.
11. Zambrano E, Bautista CJ, Deas M, Martinez-Samayoa PM, Gonzalez-Zamorano M, Ledesma H *et al*. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *The Journal of physiology* 2006; **571**: 221-30.
12. Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deas M, Guillen L, Rodriguez-Gonzalez GL *et al*. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *The Journal of physiology* 2005; **566**: 225-36.

13. Catalano PM, Presley L, Minium J, Hauguel-de Mouzon S. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes care* 2009; **32**: 1076-80.
14. Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Rodriguez-Gonzalez GL, Nathanielsz PW. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *The Journal of physiology* 2010; **588**: 1791-9.
15. Vega CC, Reyes-Castro LA, Bautista CJ, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *Int J Obes (Lond)* 2013; doi. **10.1038/ijo.2013.150**.
16. Grissom N, Bowman N, Reyes TM. Epigenetic programming of reward function in offspring: a role for maternal diet. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 2014; **25**: 41-8.
17. Rodriguez JS, Rodriguez-Gonzalez GL, Reyes-Castro LA, Ibanez C, Ramirez A, Chavira R *et al*. Maternal obesity in the rat programs male offspring exploratory, learning and motivation behavior: prevention by dietary intervention pre-gestation or in gestation. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2012; **30**: 75-81.

18. Sloboda DM, Howie GJ, Pleasants A, Gluckman PD, Vickers MH. Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. *PloS one* 2009; **4**: e6744.
19. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *The Journal of physiology* 2009; **587**: 905-15.
20. Connor KL, Vickers MH, Beltrand J, Meaney MJ, Sloboda DM. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *The Journal of physiology* 2012; **590**: 2167-80.
21. Hounsgaard ML, Hakonsen LB, Vested A, Thulstrup AM, Olsen J, Bonde JP *et al.* Maternal pre-pregnancy body mass index and pubertal development among sons. *Andrology* 2014; **2**: 198-204.
22. Ramlau-Hansen CH, Nohr EA, Thulstrup AM, Bonde JP, Storgaard L, Olsen J. Is maternal obesity related to semen quality in the male offspring? A pilot study. *Hum Reprod* 2007; **22**: 2758-62.

23. Martini AC, Molina RI, Tissera A, Ruiz RD, de Cuneo MF. The impact of obesity on male reproduction: its biological significance. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 2013; **8**: 139-148.
24. Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertility and sterility* 2008; **90**: 619-26.
25. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertility and sterility* 2010; **93**: 2222-31.
26. Palmer NO, Bakos HW, Owens JA, Setchell BP, Lane M. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2012; **302**: E768-80.
27. Erdemir F, Atilgan D, Markoc F, Boztepe O, Suha-Parlaktas B, Sahin S. [The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters]. *Actas urologicas espanolas* 2012; **36**: 153-9.

28. Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 1996; **1**: e78-86.
29. Rodriguez-Gonzalez GL, Reyes-Castro LA, Vega CC, Boeck L, Ibanez C, Nathanielsz PW *et al.* Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. *Age (Dordr)* 2014; **36**: 9721.
30. Acer N, Sahin B, Usanmaz M, Tatoglu H, Irmak Z. Comparison of point counting and planimetry methods for the assessment of cerebellar volume in human using magnetic resonance imaging: a stereological study. *Surgical and radiologic anatomy : SRA* 2008; **30**: 335-9.
31. Liu Z, Chang Q, Xu ZL, Zhang ZG. Stereological measurement of rat's seminiferous tubule. *Chinese medical journal* 2009; **122**: 2643-6.
32. Villamor E, Cnattingius S. Interpregnancy weight change and risk of adverse pregnancy outcomes: a population-based study. *Lancet* 2006; **368**: 1164-70.
33. Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH *et al.* Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia,

- adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 2008; **51**: 383-92.
34. Nathanielsz PW, Ford SP, Long NM, Vega CC, Reyes-Castro LA, Zambrano E. Interventions to prevent adverse fetal programming due to maternal obesity during pregnancy. *Nutrition reviews* 2013; **71 Suppl 1**: S78-87.
35. Pi-Sunyer FX. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obesity research* 2002; **10 Suppl 2**: 97S-104S.
36. Derby CA, Zilber S, Brambilla D, Morales KH, McKinlay JB. Body mass index, waist circumference and waist to hip ratio and change in sex steroid hormones: the Massachusetts Male Ageing Study. *Clinical endocrinology* 2006; **65**: 125-31.
37. Chimento A, Sirianni R, Casaburi I, Pezzi V. Role of Estrogen Receptors and G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Regulation of Hypothalamus-Pituitary-Testis Axis and Spermatogenesis. *Frontiers in endocrinology* 2014; **5**: 1.
38. Hotaling JM, Patel Z. Male endocrine dysfunction. *The Urologic clinics of North America* 2014; **41**: 39-53.

39. Bonavera JJ, Swerdloff RS, Leung A, Lue YH, Baravarian S, Superlano L *et al.* In the male brown-Norway (BN) male rat, reproductive aging is associated with decreased LH-pulse amplitude and area. *Journal of andrology* 1997; **18**: 359-65.
40. Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European journal of urology* 2013; **66**: 60-67.
41. Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasani RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG *et al.* Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007; **116**: 1234-41.
42. Conceicao EP, Franco JG, Oliveira E, Resende AC, Amaral TA, Peixoto-Silva N *et al.* Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition--role of insulin resistance. *The Journal of nutritional biochemistry* 2013; **24**: 81-7.
43. Thompson LP, Al-Hasan Y. Impact of oxidative stress in fetal programming. *Journal of pregnancy* 2012; **2012**: 582748.

44. Jarvie E, Hauguel-de-Mouzon S, Nelson SM, Sattar N, Catalano PM, Freeman DJ. Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring. *Clin Sci (Lond)* 2010; **119**: 123-9.
45. Poston L, Igosheva N, Mistry HD, Seed PT, Shennan AH, Rana S *et al.* Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. *The American journal of clinical nutrition* 2011; **94**: 1980S-1985S.
46. Saben J, Lindsey F, Zhong Y, Thakali K, Badger TM, Andres A *et al.* Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment. *Placenta* 2014; **35**: 171-7.
47. Strakovsky RS, Pan YX. In utero oxidative stress epigenetically programs antioxidant defense capacity and adulthood diseases. *Antioxidants & redox signaling* 2012; **17**: 237-53.
48. Tarry-Adkins JL, Chen JH, Jones RH, Smith NH, Ozanne SE. Poor maternal nutrition leads to alterations in oxidative stress, antioxidant defense capacity, and markers of fibrosis in rat islets: potential underlying mechanisms for development of the diabetic phenotype in later life. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010; **24**: 2762-71.

49. Sloboda DM, Hart R, Doherty DA, Pennell CE, Hickey M. Age at menarche: Influences of prenatal and postnatal growth. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2007; **92**: 46-50.
50. Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism: clinical and experimental* 2013; **62**: 457-78.
51. Doshi SB, Khullar K, Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2012; **10**: 109.
52. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of biochemistry and biophysics* 1998; **356**: 1-11.
53. Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *International journal of molecular sciences* 2013; **14**: 10497-538.
54. Dennery PA. Oxidative stress in development: nature or nurture? *Free radical biology & medicine* 2010; **49**: 1147-51.

55. Stuart JA, Maddalena LA, Merilovich M, Robb EL. A midlife crisis for the mitochondrial free radical theory of aging. *Longevity & healthspan* 2014; **3**: 4.
56. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility* 2003; **79**: 829-43.
57. Omu AE. Sperm parameters: paradigmatic index of good health and longevity. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre* 2013; **22 Suppl 1**: 30-42.
58. Aitken RJ, Baker MA. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *International journal of andrology* 2002; **25**: 191-4.
59. Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis* 2012; **2**: 253-263.
60. Landry D, Cloutier F, Martin LJ. Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. *Reproductive biology* 2013; **13**: 1-14.

Figure Legends

Figure 1. Weights at different ages in F₁ control (C) and maternal obesity (MO) males. A) body weight, B) testicular weight, C) gonadal fat and D) total fat. Mean \pm SEM, n = 5 - 6 rats from different litters. $p < 0.05$ for data not sharing at least one letter at the same maternal diet, * $p < 0.05$ vs C.

Figure 2. Hormone concentrations at different ages in F₁ control (C) and maternal obesity (MO) males. A) FSH, B) LH and C) testosterone. Mean \pm SEM, n = 5 - 6 rats from different litters. $p < 0.05$ for data not sharing at least one letter at the same maternal diet, * $p < 0.05$ vs C.

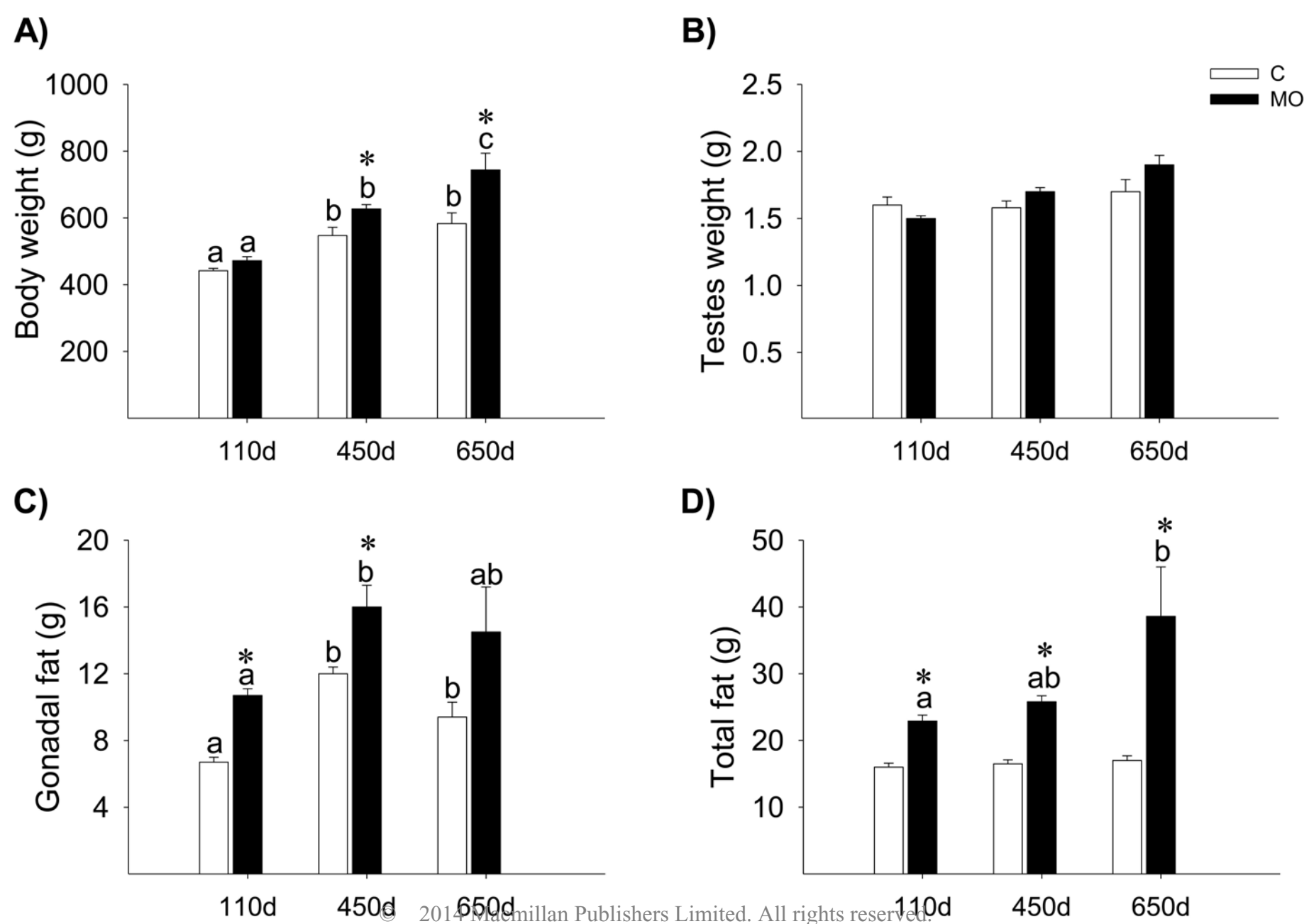
Figure 3. Testicular oxidative stress biomarkers at different postnatal days in F₁ control (C) and maternal obesity (MO) males. A) malondialdehyde, B) reactive oxygen species, C) superoxide dismutase (SOD) and D) glutathione peroxidase (GPx). Mean \pm SEM, n = 5 - 6 rats from different litters. $p < 0.05$ for data not sharing at least one letter at the same maternal diet, * $p < 0.05$ vs C.

Figure 4. Testicular nitrotyrosine (NT) fraction stained and histology at different postnatal days in F₁ control (C) and maternal obesity (MO) males. A) % area immunostained B) seminiferous tubule area, C) number of spermatogonias per transversal and D) representative pictures of seminiferous tubules at PND 110, arrows show the location of Sg: spermatogonias and Sp: spermatocytes. Mean \pm SEM, n = 5 - 6 rats from different litters. $p < 0.05$ for data not sharing at least one letter at the same maternal diet, * $p < 0.05$ vs C.

Figure 5. Sperm (spz) oxidative stress biomarkers and sperm quality at different postnatal days in F₁ control (C) and maternal obesity (MO) males. A) malondialdehyde, B) superoxide dismutase, C) glutathione peroxidase, D) viability, E) motility and F) sperm concentration. Mean \pm SEM, n = 5 - 6 rats from different litters. $p < 0.05$ for data not sharing at least one letter at the same maternal diet, * $p < 0.05$ vs C.

Figure 6. Sperm morphology and fertility rate at different postnatal days in F₁ control (C) and maternal obesity (MO) males. A) normal sperm, B) representative photographs of sperm morphology at PND 650, C) fertile males and D) pregnant females. Mean \pm SEM, n = 5 - 6 rats from different litters. $p < 0.05$ for data not sharing at least one letter at the same maternal diet, * $p < 0.05$ vs C.

Accepted manuscript



© 2014 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

Figure 1.

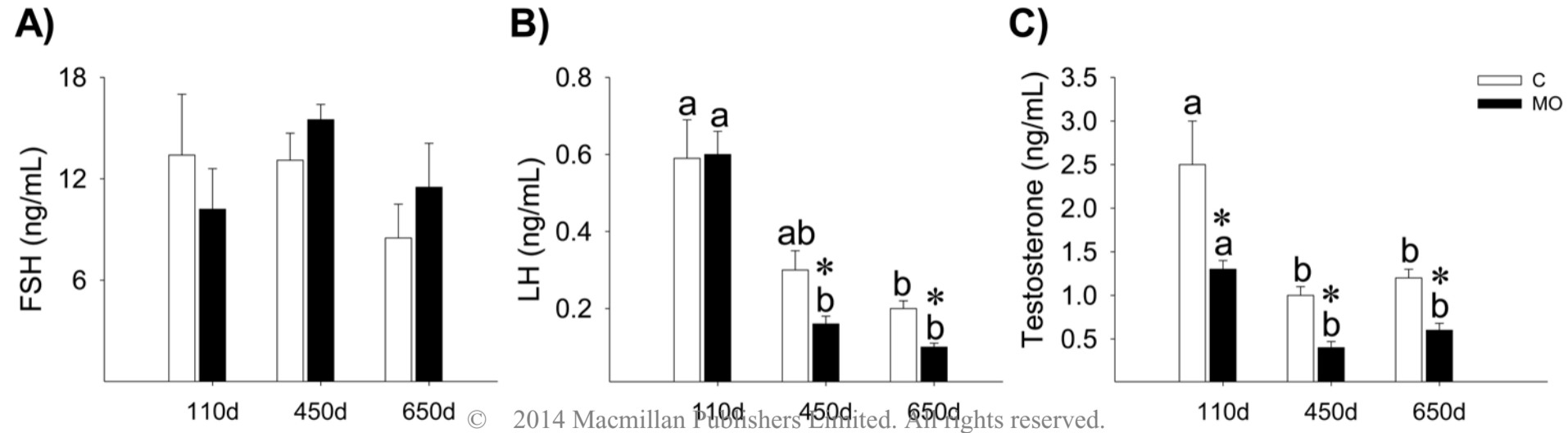


Figure 2.

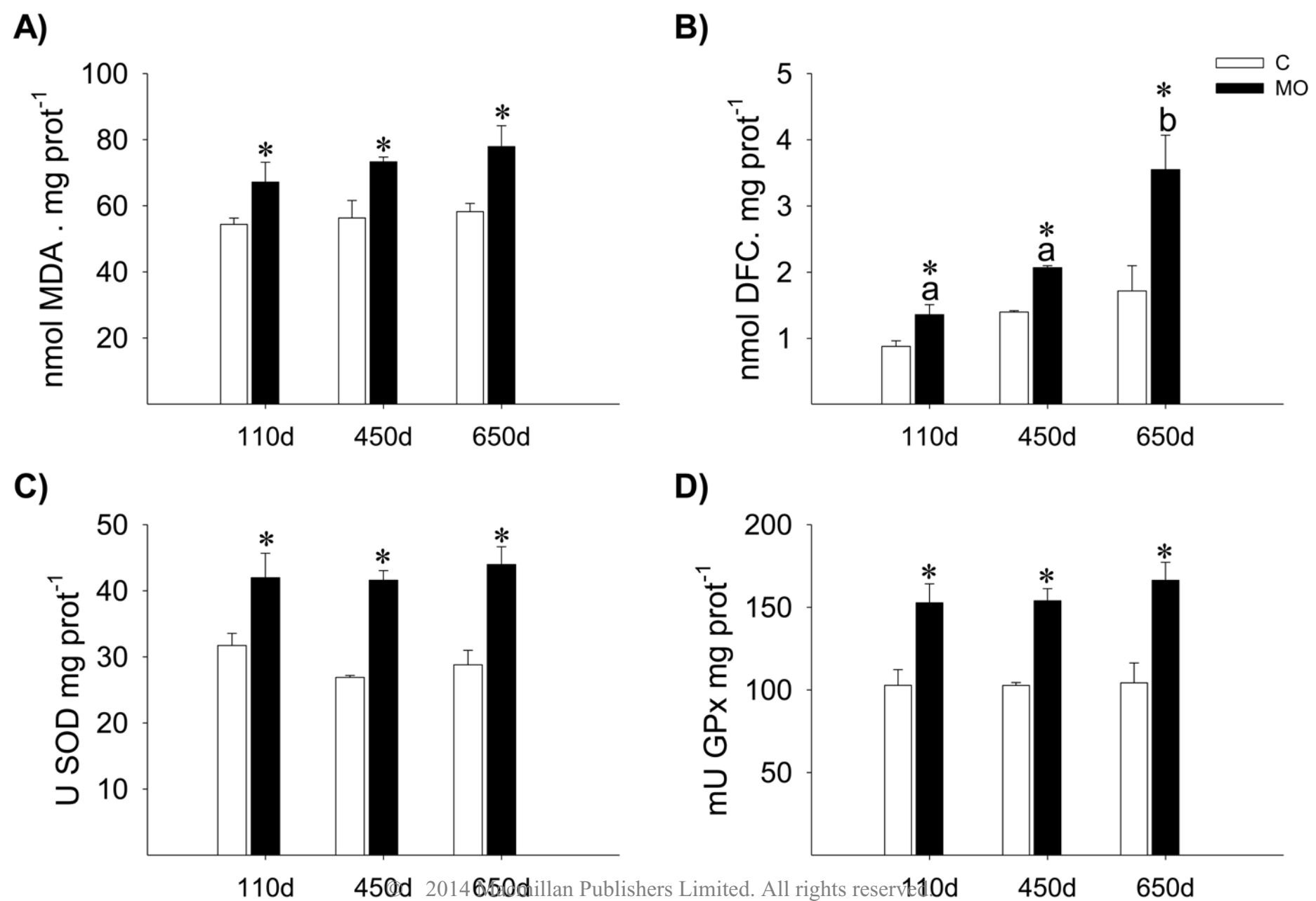


Figure 3.

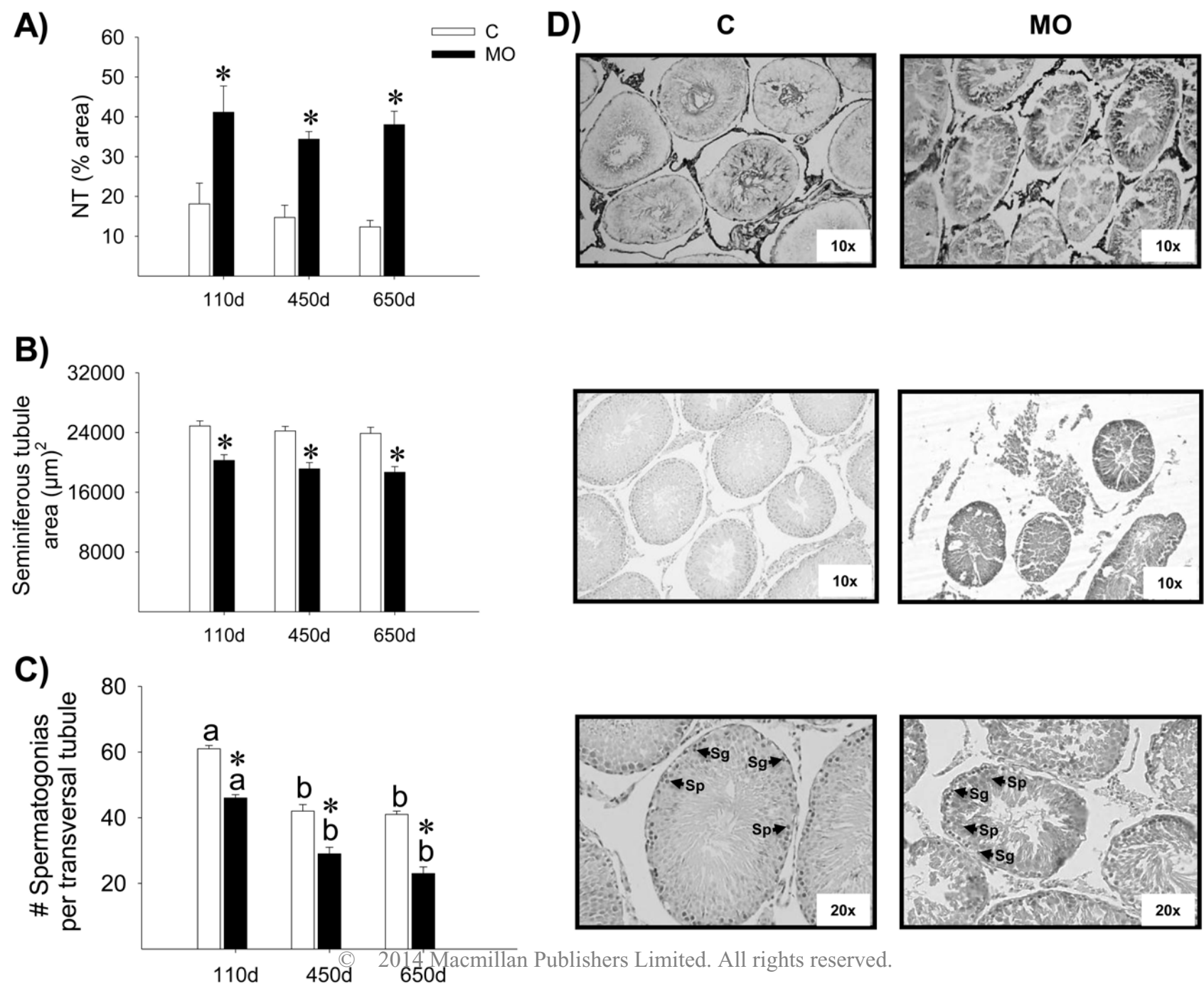
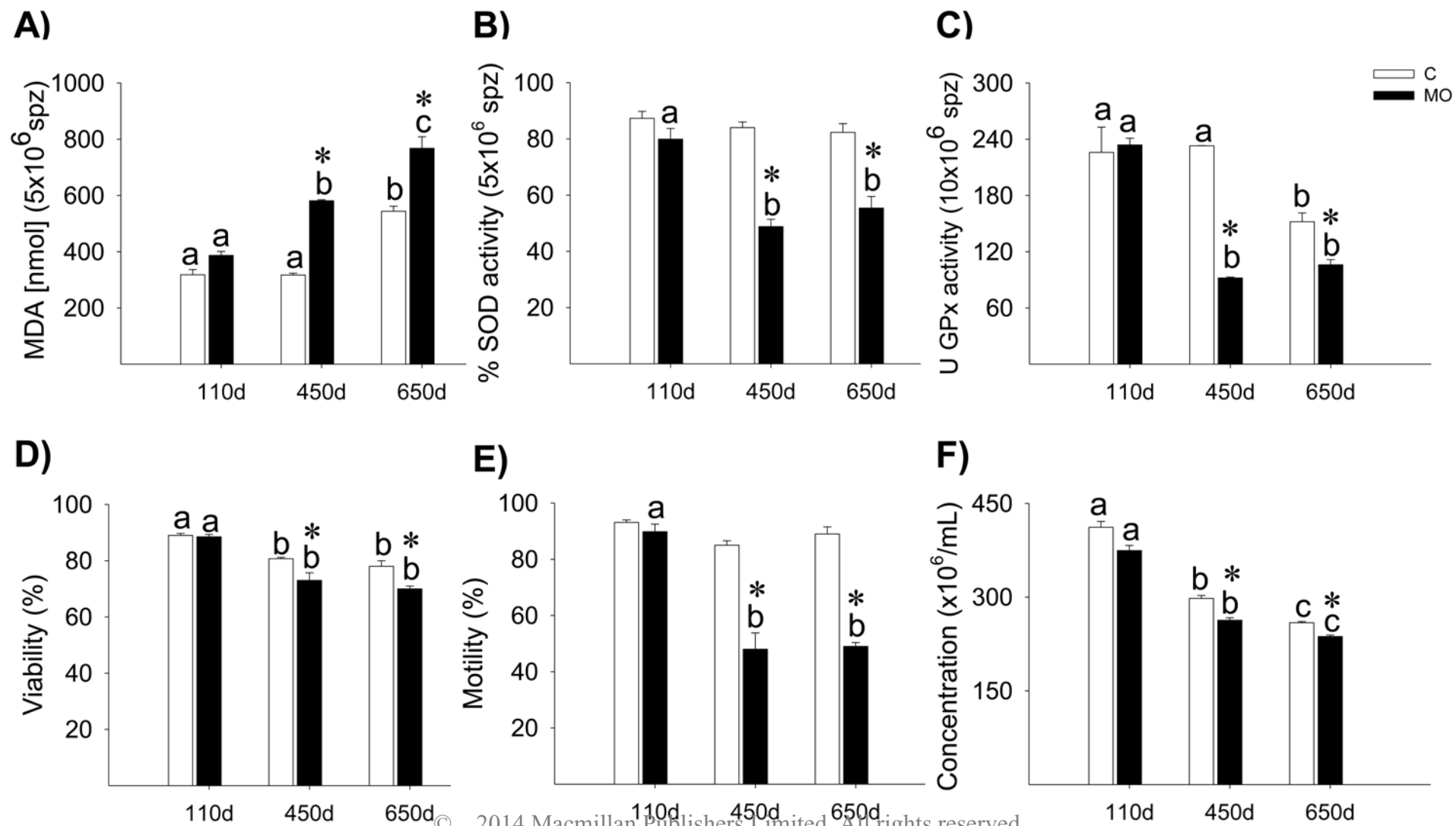


Figure 4.



© 2014 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

Figure 5.

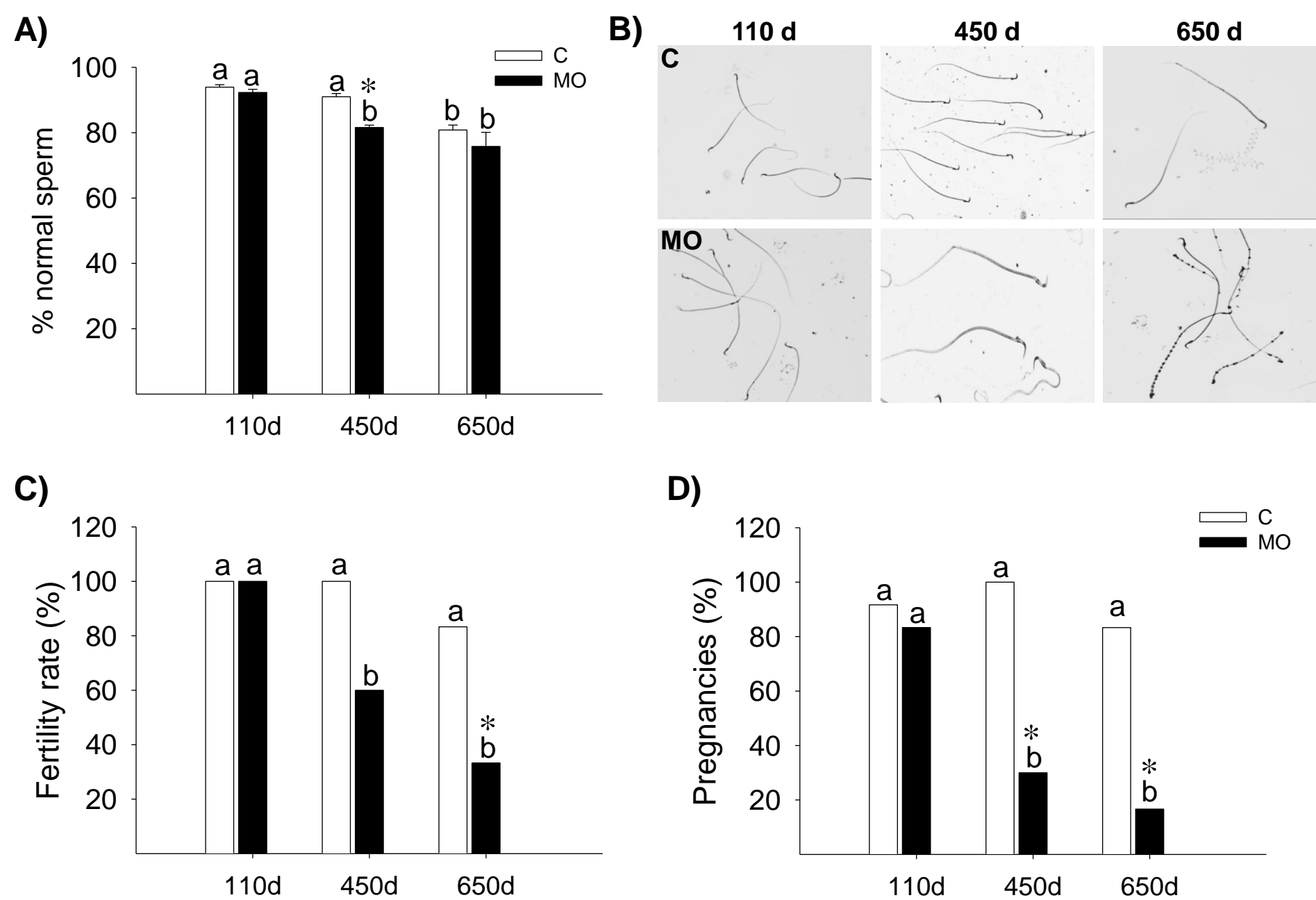


Figure 6.