



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTOS DEL CONSUMO DE UNA DIETA BAJA EN PROTEÍNA DURANTE LA  
GESTACIÓN DE LA RATA EN LA PROGRAMACIÓN DEL DESARROLLO  
SEXUAL Y EL ENVEJECIMIENTO DE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA DE LAS  
CRÍAS MACHO**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADRO DE:**  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**M. en BE GUADALUPE LETICIA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ**

**DIRECTORA DE TESIS**  
**DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ**  
Facultad de Medicina

**COMITÉ TUTOR**  
**DR. HORACIO MERCHANT LARIOS**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
**DRA. ANA ELENA LEMUS BRAVO**  
Universidad Autónoma Metropolitana

**CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2017**



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.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 2 del **Departamento de Biología de la Reproducción** del **Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán**, bajo la asesoría de la **Dra. Elena Zambrano González** y el comité tutorial integrado por el **Dr. Horacio Merchant Larios** del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y la **Dra. Ana Elena Lemus Bravo** de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) No. 155166.

Durante el curso del **Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM**, la alumna obtuvo apoyo para la asistencia a congresos del Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado (**PAEP**).

La sustentante contó con beca **CONACyT** para la realización de los estudios de Posgrado. No. de becario 229504/212871.

# AGRADECIMIENTOS

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

Al Departamento de Biología de la Reproducción y al Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A mi directora de tesis, la Dra. Elena Zambrano González por su confianza y asesoría, por estimular mi formación, por su ejemplo de trabajo y por haberme facilitado los medios para llevar a cabo las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Mi respeto y admiración siempre.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Horacio Merchant Larios y la Dra. Ana Elena Lemus Bravo por su invaluable aportación durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Fernando Larrea Gallo, jefe del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ por sus acertados comentarios y aportaciones.

Al Dr. Peter W. Nathanielsz por su tiempo, apoyo y valiosa visión científica.

Agradezco de manera especial al Dr. Felipe Vadillo Ortega, al Dr. Jesús Chimal Monroy, a la Dra. Ivette Caldelas Sánchez y a la Dra. Mina Konigsberg Fainstein por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis. Sus comentarios contribuyeron a mejorar la calidad y presentación del escrito.

El trabajo en equipo es importante pues nos permite complementarnos y obtener mejores resultados. Por lo que quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Luis Antonio Reyes Castro, a la Dra. Claudia Vega García, al M en C Carlos Ibáñez Chávez y a la Q.F.B Lourdes Boeck Quirasco, por formar parte de este proyecto. Gracias por su apoyo incondicional, por sus aportes individuales y por los momentos compartidos.

A mis compañeros del Departamento de Biología de la Reproducción, pero en particular a los integrantes del grupo de programación del desarrollo del que con gran satisfacción formo parte. Gracias por todo este tiempo trabajando juntos.

Después de buenos momentos quedan inolvidables recuerdos. Gracias al Dr. Luis Antonio Reyes Castro, a la Dra. Claudia Janet Bautista Carbajal y recientemente a la Dra. Diana Catalina Castro Rodríguez por las aventuras compartidas.

A todas las personas que de una forma u otra formaron parte de este proceso.

Mi agradecimiento a las ratas empleadas durante el desarrollo de esta tesis, quienes con su valiosísima participación fueron un pilar importante para el desarrollo y culminación de este proyecto.

# DEDICATORIAS

## **DEDICATORIAS**

### ***A mis padres***

Que son los pilares más importantes de mi vida y quienes siempre han estado en el momento preciso para extenderme su mano y por enseñarme a valorar los resultados de un gran esfuerzo. Va por ustedes, a quienes admiro y quiero por lo que son, por instruirme en la vida con su ejemplo, por creer en mí, por su amor incondicional, y por la fortaleza que demuestran día a día. Por todo esto y mucho más... Gracias mamá y papá.

### ***A la familia González Salinas***

Quienes me brindan su cariño y animan a seguir adelante. Gracias tíos y primos por estar siempre presentes y por su ayuda incondicional.

### ***Al peque de la casa***

Ángel Gabriel Alonso Mendoza por su cariño, sus ocurrencias que nos alegran y también nos desesperan, por cuidar de mi leal Cooper y porque a pesar de su corta edad es un gran apoyo.

### ***A Dios***

Por mi familia y también porque cada día bendice mi vida con la hermosa oportunidad de estar y disfrutar al lado de las personas que más quiero y aprecio.

# ÍNDICE

# ÍNDICE

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>I. Resumen</b>  | 1             |
| <b>II. Abstract</b>                                      | 3             |
| <b>III. Marco teórico</b>                                |               |
| 1. Programación del desarrollo                           | 5             |
| 2. Programación del desarrollo y fertilidad              | 7             |
| 2.1 Estudios epidemiológicos                             | 7             |
| 2.2 Estudios en animales                                 | 8             |
| 3. Sistema reproductivo                                  | 11            |
| 3.1 Desarrollo gonadal                                   | 11            |
| 3.2 Testículo (espermatogénesis y esteroidogénesis)      | 14            |
| 3.3 Eje reproductivo masculino                           | 16            |
| 4. Envejecimiento  | 18            |
| 4.1 Envejecimiento del sistema reproductor masculino     | 19            |
| 5. Estrés oxidante                                       | 20            |
| 5.1 Estrés oxidante e infertilidad                       | 22            |
| <b>IV. Planteamiento del problema</b>                    | 25            |
| <b>V. Pregunta de investigación</b>                      | 26            |
| <b>VI. Hipótesis</b>                                     | 27            |
| <b>VII. Objetivos</b>                                    |               |
| 1. Objetivo general                                      | 28            |
| 2. Objetivos específicos                                 | 28            |
| <b>VIII. Materiales y métodos</b>                        |               |
| 1. Animales  | 29            |
| 2. Apareamiento, cuidado y mantenimiento de los animales | 29            |
| 3. Elaboración de las dietas                             | 30            |

|   |    |
|---|----|
| 4. Obtención de las muestras biológicas a los 19 días de gestación (dG) | 31 |
| 5. Mantenimiento postnatal  | 32 |
| 6. Obtención de las muestras biológicas a diferentes edades postnatales | 32 |
| 7. Preparación de las muestras  | 33 |
| 8. Concentraciones hormonales   | 34 |
| 9. Biomarcadores de estrés oxidante                                     |    |
| 9.1 Malondialdehído (lipoperoxidación)                                  | 34 |
| 9.2 Determinación de ROS  | 35 |
| 10. Actividad de las enzimas antioxidantes                              |    |
| 10.1 Superóxido dismutasa (SOD)   | 36 |
| 10.2 Glutación peroxidasa (GPx)   | 36 |
| 11. Calidad espermática   | 37 |
| 12. AR (receptor de andrógenos) y células germinales                    |    |
| 12.1 Determinación del AR por Western blot                              | 37 |
| 12.2 Determinación del AR por inmunohistoquímica                        | 38 |
| 12.3 Conteo de células germinales totales y espermatocitos              | 38 |
| 13. Tasa de fertilidad  | 39 |
| 14. Análisis estadístico  | 40 |
| <b>IX. Resultados</b>   |    |
| 1. Características maternas   | 41 |
| 2. Peso corporal, testicular y grasa gonadal                            | 42 |
| 3. Concentraciones hormonales   | 43 |
| 4. Biomarcadores de estrés oxidante en el testículo                     | 44 |
| 5. Actividad de las enzimas antioxidantes en el testículo               | 45 |

|   |           |
|---|-----------|
| 6. Biomarcadores de estrés oxidante y biomarcadores de estrés oxidante en los espermatozoides | 46        |
| 7. Calidad espermática  | 48        |
| 8. Expresión del AR y análisis histológico  | 49        |
| 9. Tasa de fertilidad   | 51        |
| <b>X. Discusión</b>   | <b>53</b> |
| <b>XI. Conclusiones</b>   | <b>63</b> |
| <b>XII. Referencias</b>   | <b>64</b> |
| <b>XIII. Artículos generados durante el Doctorado</b>   | <b>83</b> |

# I. RESÚMEN

## I. RESÚMEN

**Introducción.** El término “programación del desarrollo” nos dice que la aparición de varias enfermedades incluyendo los problemas de fertilidad quedan programadas in *utero* o durante la vida postnatal temprana. La desnutrición durante el embarazo afecta la función testicular, la capacidad reproductiva y se asocia con el aumento del estrés oxidante, el cual está implicado en defectos del desarrollo y la patogénesis de muchas enfermedades incluyendo la infertilidad masculina.

**Objetivo.** Evaluar mecanismos por los cuales la restricción proteínica materna durante la gestación afecta el desarrollo sexual y capacidad reproductiva de las crías macho en la vida adulta.

**Métodos.** Se emplearon ratas Wistar preñadas alimentadas con dietas isocalóricas con contenido normal 20% (C) o restringido 10% (R) de proteína. Al nacimiento todas las ratas fueron alimentadas con dieta C. A diferentes edades, se sacrificaron grupos de animales en los que se determinó el peso corporal, la grasa epididimal y las concentraciones séricas de testosterona. En la etapa fetal, prepuberal y en la edad adulta se obtuvieron los testículos para determinar biomarcadores de estrés oxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes. La calidad espermática y biomarcadores de estrés oxidante fueron determinados en los espermatozoides en la vida adulta. En los testículos prepuberales se determinó la expresión del receptor de andrógenos (AR), el número de células germinales totales y espermatocitos por túbulo seminífero. La capacidad reproductiva se evaluó a tres edades en la vida adulta (ratas macho jóvenes, maduras y viejas) utilizando la tasa de fertilidad.

**Resultados.** El peso corporal y grasa epididimal fue mayor en las crías macho del grupo R en la edad adulta. Las concentraciones de testosterona disminuyeron en el grupo R, lo cual se exacerba con la edad. En los testículos del grupo R, los biomarcadores de estrés oxidante se encontraron elevados durante la vida fetal y edad adulta; mientras que la actividad de las enzimas antioxidantes fue menor en la vida postnatal temprana y mayor durante la vida adulta. En la edad adulta, los espermatozoides del grupo R presentaron incremento en los biomarcadores de

estrés oxidante y menor actividad de las enzimas antioxidantes; mientras que la calidad espermática disminuyó con respecto a la edad. En los testículos prepuberales la expresión del AR, así como el número de células germinales totales y de los espermatoцитos por túbulo seminífero fue menor en el grupo R. La tasa de fertilidad no se vio afectada en los adultos jóvenes del grupo R; sin embargo, cuando las crías macho de este grupo la tasa de fertilidad disminuyó con la edad, mientras que en el grupo C, la fertilidad no se ve modificada por la edad. Por lo tanto, la disminución en la fertilidad en el grupo R se asoció tanto a la dieta materna, como a la edad de las crías.

**Conclusión.** La restricción proteínica materna durante la gestación ocasiona que las crías macho presenten incremento en el estrés oxidante tanto en los testículos como en los espermatozoides, disminución en el número de las células germinales y de las concentraciones de testosterona, así como deterioro de la calidad espermática. Estas alteraciones observadas ya sea durante la vida fetal, etapa prepuberal y/o edad adulta posiblemente conllevaron al envejecimiento prematuro de la función reproductiva de las crías macho en la edad adulta.

## II. ABSTRACT

## II. ABSTRACT

**Introduction.** The term “developmental programming” tell us that the emergence of several diseases, including fertility problems are programmed in utero or during early postnatal life. Undernutrition affects testicular function, reproductive capacity, and it has been associated with increased oxidative stress, which is implicated in developmental defects and the pathogenesis of many diseases including male infertility.

**Objective.** To investigate mechanisms by which maternal protein restriction during pregnancy affects sexual development and male offspring reproductive capacity in adult life.

**Methods.** Pregnant Wistar rats were fed with different isocaloric diets, either the control (20% - casein) or the restricted (10% - casein) diet. At birth, all rats were fed with C diet. At different ages, a group of animals were killed to determined body weight, epididimal fat and testosterone serum levels were determined. In fetal, prepubertal and adult life, testes were obtained to determine oxidative stress biomarkers and antioxidant enzyme activity. Spem quallity and oxidative stress biomarkers were determined in the spermatozoa in adult life. In the prepuberal testes, the androgen receptor (AR) expression as well as total germ cell number and spermatocytes per seminiferous tubule was determined. Reproductive capacity was evaluated at three different ages during adult life (young, mature, and old male rats) using the fertility rate.

**Results.** Body weight and epididimal fat were higher in the offspring from the R group. Testosterone serum levels decreased due to the maternal diet and offspring age. In the testes from the R group, oxidative stress biomarkers were higher during fetal; while antioxidant enzyme activity was lower during early postnatal life and higher in adulthood. In adult life, the sperms from the R group presented an increase in the oxidative stress biomarkers and a reduction in the antioxidant enzyme activity; whilst sperm quality decreased because of the maternal diet and age. In the prepuberal testes the AR expression as well as the total germ cell number and spermatocytes per seminiferous tubule was lower in the R group. Fertility rate was not affected in the young adult rats from the R group; however,

when the male offspring from this group age, the fertility rate decreases; while in the C group fertility was not affected by age. Therefore, the lower fertility in the R group was due to the maternal diet and offspring age.

**Conclusion.** Maternal protein restriction during gestation causes male offspring to show an increase oxidative stress in both testes and spermatozoa, a decrease in germ cell number and testosterone concentrations, as well as impairment of sperm quality. These alterations observed either during fetal life, prepubertal stages and/or adulthood, possibly led to the premature aging of male reproductive capacity in the male offspring in adult life.

### III. MARCO TEÓRICO

### III. MARCO TEÓRICO

#### 1. Programación del desarrollo

El fenotipo de un individuo no sólo está determinado por los genes sino también por la influencia ambiental, que tiene mayor injerencia en la etapa fetal y posnatal. Estudios en humanos [1] y con animales de experimentación [2] han demostrado que la salud está relacionada con la calidad de vida en las primeras etapas del desarrollo. El concepto “programación del desarrollo” ahora denominado los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad, (DOHaD, por sus siglas en inglés: *Developmental Origins of Health and Disease*), propone que la fisiología y metabolismo fetal y neonatal pueden ser alterados por cambios durante una ventana de tiempo crítica del desarrollo, como la gestación y la lactancia. Estas alteraciones generan una respuesta fisiológica permanente en el feto que se asocia con el desarrollo de enfermedades en el adulto [3]. El concepto DoHaD se fundamenta en: 1) estudios epidemiológicos que asocian el peso al nacimiento, con la presencia de enfermedades cardiovasculares y metabólicas [4], y 2) en modelos animales donde la desnutrición, la obesidad, la sobre alimentación o la exposición a agentes hormonales como los glucocorticoides en el embarazo, predispone a la descendencia al desarrollo de alteraciones fisiológicas, metabólicas, reproductivas y conductuales [5-7]. Se han propuesto varios mecanismos que relacionan los insultos perinatales con el desarrollo de enfermedades en la vida adulta, tales como cambios en el medio endócrino materno-fetal, en la regulación epigenética y en el estrés oxidante y la inflamación.

La insulina, la leptina, los glucocorticoides y los andrógenos tienen un papel importante en varios procesos fisiológicos, como por ejemplo en la proliferación y diferenciación celular o en el gasto energético [8-11]. Estudios con ovejas y con modelos murinos han demostrado que la exposición materna a glucocorticoides sintéticos reduce el peso al nacimiento y ocasiona hiperglicemia e hiperinsulinemia en las crías en la vida adulta [12-14]. En ratas se ha reportado que la administración prenatal de dexametasona, no sólo afecta a la descendencia

inmediata, sino que también se asocia a cambios que se manifiestan con incremento en las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina en la siguiente generación [15]. De igual forma, en estudios con modelos animales se ha observado que la desnutrición [16, 17], la sobrealimentación materna [18], o la exposición gestacional a un exceso de testosterona [19] ocasionan cambios en las concentraciones maternas de insulina y/o leptina.

Por otro lado, la desnutrición materna [7] y el estrés gestacional [20] alteran las concentraciones de andrógenos durante el embarazo. Estos cambios en las concentraciones de las hormonas metabólicas y esteroideas durante la vida fetal pueden ser uno de los mecanismos, a través de los cuales los insultos perinatales programan el desarrollo de enfermedades en la vida adulta. Se ha propuesto que tanto los andrógenos como la insulina están implicados en la patogénesis del síndrome del ovario poliquístico [21] y síndrome metabólico [22].

Los cambios epigenéticos tales como la metilación del ADN o la modificación de histonas han surgido como mediadores clave de la programación del desarrollo [23]; dado que estas modificaciones pueden acumularse con el tiempo, la exposición a condiciones subóptimas durante la etapa fetal pueden ocasionar variaciones en la expresión génica y por lo tanto conllevar a un fenotipo de alteraciones durante la vida adulta [24]. Por ejemplo, la modificación del metabolismo de la glucosa en el embarazo, altera en la placenta la metilación del ADN del gen de la leptina [25]. Estos cambios epigenéticos podrían ayudar a explicar el desarrollo a largo plazo de obesidad y de diabetes tipo 2 en la descendencia.

Otro mecanismo que parece estar involucrado en la programación del desarrollo es el estrés oxidante, el cual es un proceso deletéreo que ocasiona daño en los componentes celulares tales como proteínas, lípidos y ADN [26]. Durante el embarazo pueden existir varios factores que incrementan el estrés oxidante como pueden ser la diabetes, la obesidad, la preclamsia, el tabaquismo y la restricción

del crecimiento intrauterino (IUGR, por sus siglas en inglés). Durante el IUGR se observa insuficiencia placentaria e incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), lo que genera que se aumente la expresión de diversos factores transcripcionales y/o factores hormonales, lo que puede afectar el metabolismo y el flujo placentario [27]. Hay evidencia considerable que indica que tanto la función de la insulina, así como la regulación de la presión arterial podrían ser objetivos sensibles a la programación por estrés oxidante durante el periodo pre y postnatal [28].

## ***2. Programación del desarrollo y fertilidad***

La mayoría de los trabajos publicados sobre programación del desarrollo se han enfocado principalmente a estudiar las alteraciones metabólicas (obesidad y diabetes) [29] y del sistema cardiovascular (hipertensión) [30]. Sin embargo, en las últimas décadas la importancia de las condiciones adversas durante la etapa prenatal y postnatal sobre la programación de la función reproductiva en machos han comenzado a ser estudiadas. Estudios en humanos y con animales de experimentación indican que varios trastornos reproductivos están influenciados por la exposición a diversos factores durante la vida fetal o postnatal [31].

### ***2.1 Estudios epidemiológicos***

Los estudios epidemiológicos sobre los efectos ambientales adversos durante el embarazo y sus efectos sobre la fertilidad de los descendientes masculinos son escasos. En un estudio longitudinal se compararon datos de 32 niños controles, es decir adecuados para la edad gestacional vs. 32 niños nacidos pequeños para la edad gestacional, los cuales fueron igualados por sexo, altura, peso, índice de masa corporal y edad (6 – 8 años); se reportó que la restricción del crecimiento prenatal junto con un espontáneo crecimiento compensatorio se asocia con altas concentraciones plasmáticas de dihidroepiandrosterona (adrenarquia), disminución en la concentración de la proteína de unión a hormonas sexuales e incremento de la adiposidad visceral [32]. Otros estudios han indicado que el bajo

peso al nacimiento se asocia con criptorquidia, hipospadias y baja concentración espermática [33]. También se ha reportado que los sujetos que nacieron pequeños para la edad gestacional presentan disminución en las concentraciones de testosterona [34, 35], de inhibina B y reducción del tamaño testicular; [34]. Por otro lado, estudios epidemiológicos de los efectos de la nutrición materna sobre la programación de la fertilidad de la descendencia masculina son muy escasos. En un estudio de cohorte se incluyeron hombres de alrededor de 59 años de edad, nacidos entre 1944 – 1945 (invierno hambriente holandés); los cuales fueron sometidos a entrevistas estandarizadas sobre parámetros reproductivos, y se reportó que los hombres provenientes de las madres expuestas a la hambruna no mostraron alteraciones en la fertilidad [36]. Por otro lado, en un estudio realizado en 328 hombres, mostró que un alto índice de masa corporal materno tiene influencia perjudicial en la calidad espermática y en la concentración plasmática de inhibina B de sus hijos [37].

## **2.2 Estudios en animales**

A pesar de las limitaciones evidentes como la placentación que varía según la especie y que el desarrollo gonadal ocurre en diferentes momentos, los modelos animales son una herramienta muy importante para descifrar los mecanismos que conducen a las alteraciones en la función gonadal en la descendencia durante la vida adulta debido a la exposición materna a glucocorticoides, hormonas sexuales o malnutrición durante etapas críticas del desarrollo.

Estudios en ovejas han reportado que la administración materna de betametasona ocasiona que los fetos presenten disminución en el peso testicular y afectación en el desarrollo morfológico de los testículos [38]. Mientras que en ratas han reportado que las crías macho puberales provenientes de madres tratadas con dexametasona durante la gestación, presentan disminución en las concentraciones de testosterona y que sus células de Leydig (aisladas de los testículos) reducen significativamente su producción de testosterona [39]. En un

modelo murino se observó que la exposición prenatal a betametasona afecta los parámetros espermáticos y la fertilidad de las crías macho [40].

Un estudio publicado en corderos demostró que los machos nacidos de madres tratadas con propionato de testosterona presentan reducción en el peso corporal, menor circunferencia escrotal, así como disminución en la concentración y movilidad espermática [41]. En ratas, la exposición prenatal a testosterona se asocia con retraso en la entrada a la pubertad y disminución en las concentraciones de testosterona en la edad adulta [42]. También se ha reportado que si durante la etapa neonatal las ratas macho son expuestas a estrógenos, induce anomalías en el pene, incremento en la apoptosis de las células germinales, disminución en las concentraciones de testosterona así como alteraciones en la calidad espermática en la edad adulta [43, 44].

Se ha demostrado que la nutrición materna desempeña un papel importante en la programación de la capacidad reproductiva de las crías. En ovejas se ha visto que un 50% de restricción nutricional materna no afecta en los corderos el inicio de la pubertad (determinado como el primer aumento en las concentraciones plasmáticas de testosterona), ni el peso testicular; sin embargo, ocasionó reducción en el diámetro de los túbulos seminíferos, así como disminución en el número de las células de Sertoli [45]. Otro estudio realizado en ovejas ha reportado que la desnutrición materna incrementa en los testículos fetales oveja la expresión de la StAR (proteína reguladora de la esteroidogénesis) y las concentraciones circulantes de testosterona [46].

Estudios en ratas han reportado que la desnutrición hipocalórica materna ocasiona en las crías macho retraso en el crecimiento testicular, una drástica reducción de la leptina plasmática y grasa corporal, así como retraso en los marcadores de desarrollo sexual [47]. En un modelo murino, Toledo y col., 2011, reportaron que la restricción de proteína *in utero* ocasiona que las crías macho durante la vida adulta, presenten disminución en el peso corporal, en el número de células de Sertoli, en la concentración y movilidad espermática e incremento en las

alteraciones morfológicas en los espermatozoides [48]. La restricción de proteína en la dieta materna durante la lactancia ocasiona, en la descendencia masculina, reducción en el peso corporal y testicular (sin cambios en la relación peso corporal/testicular), aumento en las concentraciones de testosterona sérica y testicular, disminución en las concentraciones de estradiol y alteraciones en la expresión del receptor de andrógenos (AR) y estrógenos, así como disminución en la expresión de la aromatasa testicular. Estos cambios en la función esteroidogénica pueden tener efectos nocivos en el futuro desarrollo de las células germinales y la función reproductiva de la descendencia masculina [49]. La desnutrición materna altera la ontogenia normal del desarrollo y la función gonadal [50]. En las ratas macho, las etapas neonatal y prepuberal son cruciales para la espermatogénesis y la futura capacidad reproductiva, ya que durante estas etapas se lleva a cabo la diferenciación, proliferación y maduración de las estirpes celulares testiculares, y alteraciones en alguno de estos procesos impactarán la futura fertilidad [51].

En nuestro grupo de trabajo, hemos demostrado que la restricción en el consumo de proteína en la dieta materna durante la gestación incrementa la exposición fetal a estradiol, testosterona, progesterona y corticosterona [7, 52], y que las crías macho provenientes de madres restringidas en proteína durante el embarazo, pero alimentadas con dieta control después del destete, presentan retraso en los marcadores de desarrollo sexual [7], en la formación de la luz tubular testicular, mayor apoptosis de células germinales [53], bajas concentraciones séricas de LH y testosterona, disminución en la expresión de la enzima P450<sub>scc</sub> (rompimiento de la cadena lateral del colesterol) en el testículo, así como reducción en la cuenta espermática y envejecimiento prematuro de la función reproductiva [7]. Se ha reportado que el consumo materno de una dieta baja en proteína durante gestación ocasiona efectos transgeneracionales en el desarrollo sexual de las crías F2, tales como retraso en el descenso de los testículos y disminución en las concentraciones de testosterona sin cambios en la fertilidad [54]. También hemos reportado que por la vía paterna, existen efectos transgeneracionales sobre la

conducta tipo ansiedad en las hembras F2 cuyas abuelas fueron alimentadas con una dieta baja en proteína durante la gestación y/o lactancia [55].

Por otro lado, la obesidad materna durante la gestación y lactancia incrementa el estrés oxidante tanto en el testículo como en los espermatozoides, disminuye las concentraciones de testosterona, la calidad espermática y envejecimiento prematuro de la función reproductiva [56]. Estos resultados nos permiten sugerir que la capacidad reproductiva pudo quedar programada a diferentes niveles del eje hipotálamo – hipófisis – testículo desde etapas tempranas del desarrollo. Por ejemplo, durante la etapa neonatal y prepuberal se lleva a cabo la diferenciación, proliferación y maduración de las diferentes estirpes celulares testiculares y alguna alteración en alguno de estos procesos puede repercutir en la futura fertilidad [51, 57-61].

### **3. Sistema reproductivo**

#### ***3.1 Desarrollo gonadal***

En los machos, la masculinización y la fertilidad en la vida adulta dependen de una adecuada programación endócrina fetal, la cual es mediada en gran medida a través de la testosterona secretada por los testículos. La testosterona masculiniza el sistema reproductivo fetal al inducir el crecimiento y desarrollo de los conductos de Wolff, las glándulas accesorias y los genitales externos masculinos. La interrupción de estos procesos causará un espectro de trastornos como por ejemplo criptorquidia o disminución en la cuenta espermática durante la vida adulta [62].

Conocer el desarrollo del testículo fetal es necesario para comprender algunos de los trastornos reproductivos durante la vida adulta. En los fetos XY, a partir de la expresión del *SRY* (región determinante del sexo en el cromosoma Y), las futuras gónadas inician una serie de eventos que determinarán cambios citológicos, histológicos y funcionales característicos de los testículos como la inducción de la migración de las células somáticas del mesonefros, para la formación de los

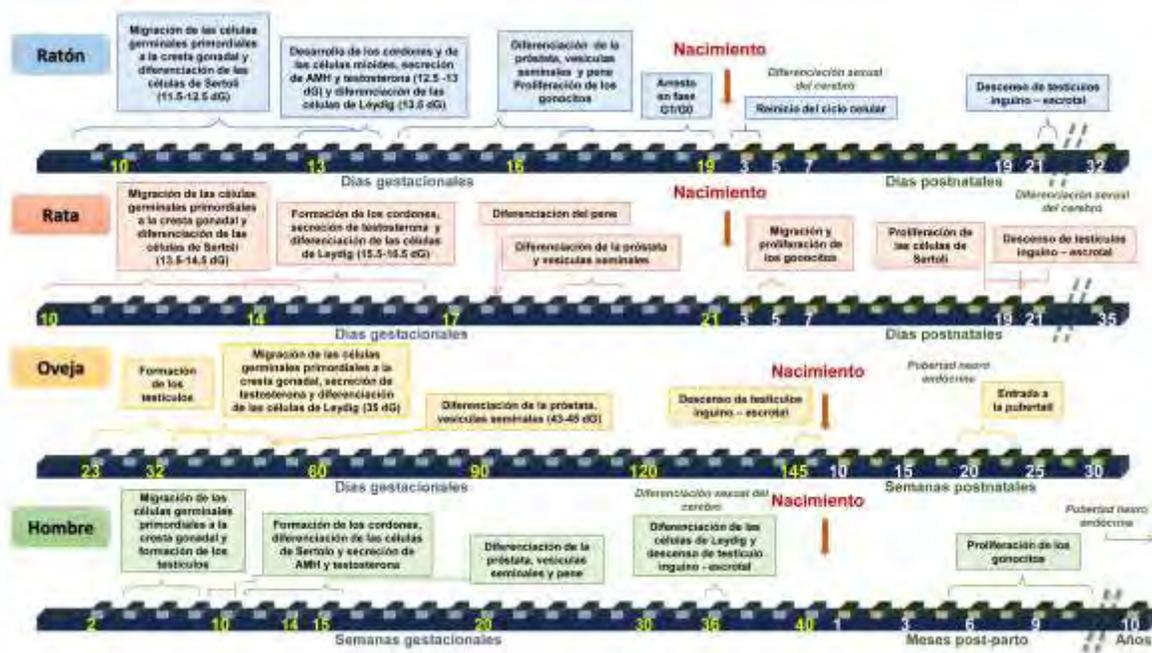
cordones y la diferenciación de las células de Sertoli [63]. En el humano, después de las 6 semanas de concepción se desarrollan los cordones seminíferos que contienen a las células de Sertoli y a los gonocitos [62]. En las ratas este proceso de inicia a los 13.5 días de la gestación [64]. Las células de Sertoli comienzan a mostrar un patrón de expresión específico caracterizado por el aumento en la expresión del gen SOX9 (región Y determinante del sexo, caja 9) y de la hormona anti-muleriana (AMH) que ocasiona la regresión de los conductos de Müller [65].

Las células de Sertoli tienen un papel fundamental durante el desarrollo del testículo, ya que su diferenciación y función es necesaria para la adecuada diferenciación de las células germinales, de las células mioideas peritubulares y de las células de Leydig [66]. Después de la determinación del sexo, las células de Sertoli proliferan, en roedores, esto ocurre durante la vida fetal y la etapa neonatal, mientras que en el humano, únicamente en el periodo peripuberal [58]. La FSH incrementa el índice de proliferación de las células de Sertoli, aunque también los factores no hormonales (como los factores de crecimiento) tienen un papel fisiológico en la proliferación y función de las células de Sertoli [67]. En ratas se ha observado que el límite de proliferación de las células de Sertoli disminuye constantemente entre los días 5 a 15 después del nacimiento y durante los días 14 a 21 postnatales. En el periodo de maduración, las células de Sertoli experimentan diferentes procesos que incluyen cambios morfológicos, la producción de proteínas que son esenciales para las células germinales y la formación de la barrera hematotesticular, que se origina a partir de las uniones estrechas entre las células de Sertoli [68].

Se han detectado al menos dos poblaciones de células de Leydig, las fetales y las adultas que surgen secuencialmente durante el desarrollo del testículo [69], y a pesar de estos dos tipos de poblaciones son diferentes en morfología, ambas tienen la capacidad de producir testosterona que es la responsable de coordinar la masculinización y virilización del sistema reproductivo [70, 71]. Las células de Leydig fetales son cruciales para el alargamiento de los cordones seminíferos, la

masculinización del tracto reproductivo a través de la testosterona e inducen el descenso de testículos a través del factor de crecimiento similar a la insulina 3 (IGF3)[72].

La alteración en la acción de los andrógenos fetales, interfiere con el proceso de masculinización y puede conllevar a trastornos en la diferenciación sexual [73]. En el humano, la producción fetal de andrógenos testiculares comienza alrededor de la séptima u octava semana de gestación, las concentraciones de testosterona alcanzan su máximo alrededor de las semanas 12 a 14, para posteriormente comenzar a declinar [74]. En la rata, la testosterona fetal testicular es detectable a los 15.5 días post-coito y las concentraciones aumentan hasta alcanzar un máximo a los 18.5 días post-coito [75]. Esta ventana de programación es esencial [75, 76] para la adecuada diferenciación y masculinización del epidídimo, conductos deferentes, vesículas seminales, próstata, pene, escroto y perineo (figura 1) [53].



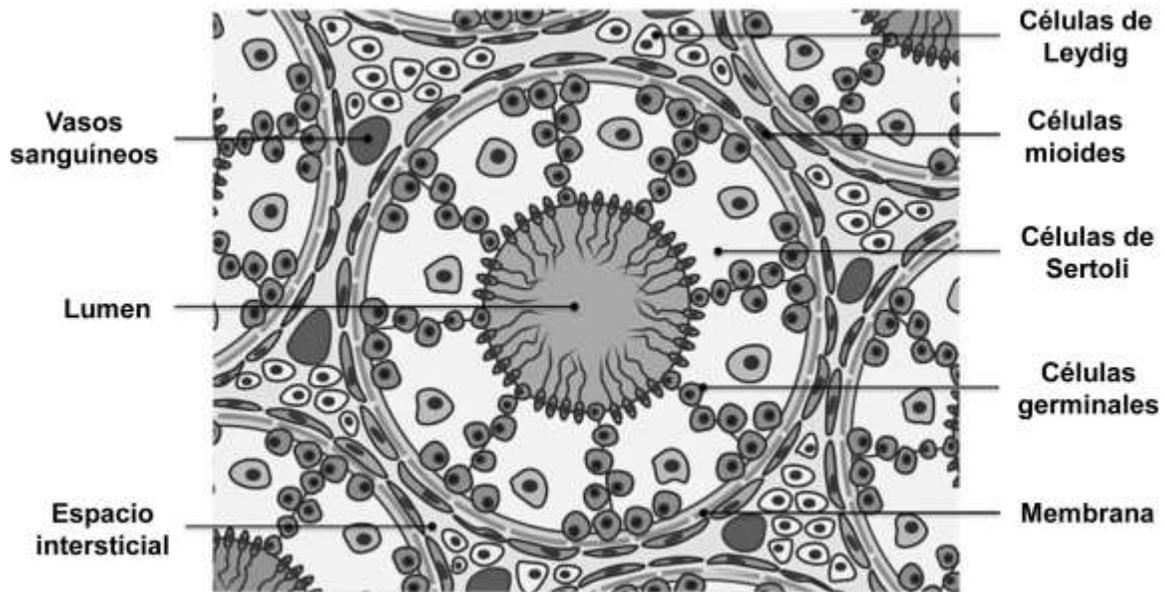
**Figura 1.** Desarrollo del tracto reproductor masculino en el ratón, rata, oveja y hombre. dG = días gestacionales [53].

### **3.2 Testículo (espermatogénesis y esteroidogénesis)**

El testículo diferenciado se divide en compartimiento intersticial y tubular. En el compartimiento intersticial (espacio entre los túbulos seminíferos) se encuentran los macrófagos, fibroblastos, vasos sanguíneos y las células Leydig donde se secretan los andrógenos [77]. En el compartimiento tubular, se encuentran los túbulos seminíferos (Figura 2) [78].

Las células de Sertoli comprenden el componente estructural principal de los túbulos seminíferos; y son consideradas como células de sostén con una función nutritiva, suministrando el soporte físico y nutricional para la maduración de las células germinales. Las células de Sertoli sintetizan y secretan una gran cantidad de glicoproteínas necesarias para la progresión exitosa espermatogonias a espermatozoides, y pueden clasificarse en tres categorías: (1) las que facilitan el transporte de iones y hormonas o proporcionan funciones bioprotectoras tales como la proteína de unión a andrógenos (ABP), transferrina y ceruloplasmina, (2) proteasas e inhibidores de proteasas que desempeñan un papel importante en los procesos de remodelación tisular, que se producen por ejemplo durante la espermiación y (3) los componentes estructurales de la membrana basal entre las células de Sertoli o peritubulares o mioides [58, 79]. Las células de Sertoli también mantienen la barrera hematotesticular, que funcionan como una barrera natural para regular el paso de diversas moléculas dentro y fuera del compartimiento de adluminal de los túbulos seminíferos, y una barrera inmunológica para crear un entorno especializado para la diferenciación y el movimiento de las células germinales en desarrollo [80].

Las células mioides, son células mesenquimales que rodean el borde exterior de los túbulos seminíferos que en conjunto con las células de Sertoli forman la membrana basal que es necesaria para mantener la morfología normal de los túbulos. Las células mioides tienen la capacidad de contracción, lo que induce ondas e impulsos que ayudarán al transporte de los espermatozoides a través de la luz tubular hacia el epidídimo [81, 82].



**Figura 2.** Estructura del testículo. Modificado de [83].

La fertilidad masculina depende de la función adecuada del testículo. La función testicular normal, incluye la producción de espermatozoides maduros y de testosterona. La espermatogénesis es un proceso biológico complejo que implica la proliferación y diferenciación de espermatogonias diploides, en espermatozoides haploides maduros capaces de llevar a cabo la fertilización.

El proceso de la espermatogénesis se puede dividir en tres etapas importantes: (1) la primera se conoce como espermatocitogénesis o mitosis, en la cual las espermatogonias A1 dan lugar a los espermatocitos primarios a través de un proceso de división mitótica [79, 84]; (2) meiosis, que reduce el número cromosómico de diploide a haploide y comienza con la entrada de las espermatogonias tipo B en la profase de la primera división meiótica. En este proceso, los espermatocitos primarios se dividen para formar espermatocitos secundarios y posteriormente se dividen de nuevo para formar espermátidas redondas [85]; (3) la última etapa denominada espermiogénesis es el evento de desarrollo post-meiótico más crítico que ocurre durante la espermatogénesis ya que es donde las espermátidas haploides experimentan grandes cambios celulares, moleculares y morfológicos para formar a los espermatozoides. Los

espermatozoides son posteriormente liberados al epitelio seminífero en un proceso que se llama espermación, el cual es un determinante crítico del número de espermatozoides que entran al epidídimo y por tanto el contenido espermático del eyaculado [86].

Las células Leydig en el testículo sintetizan y secretan varias hormonas esteroideas que se conocen globalmente como andrógenos, los cuales estimulan el crecimiento del tracto reproductor masculino [87]. Las hormonas esteroideas utilizan para su síntesis el colesterol [88], el cual es transportado por medio de la StAR (proteína reguladora aguda de esteroideas) al interior de la mitocondria donde la P450<sub>scc</sub> (enzima divisora de la cadena lateral) convierte el colesterol en pregnenolona, paso limitante de esta ruta de biosíntesis [88].

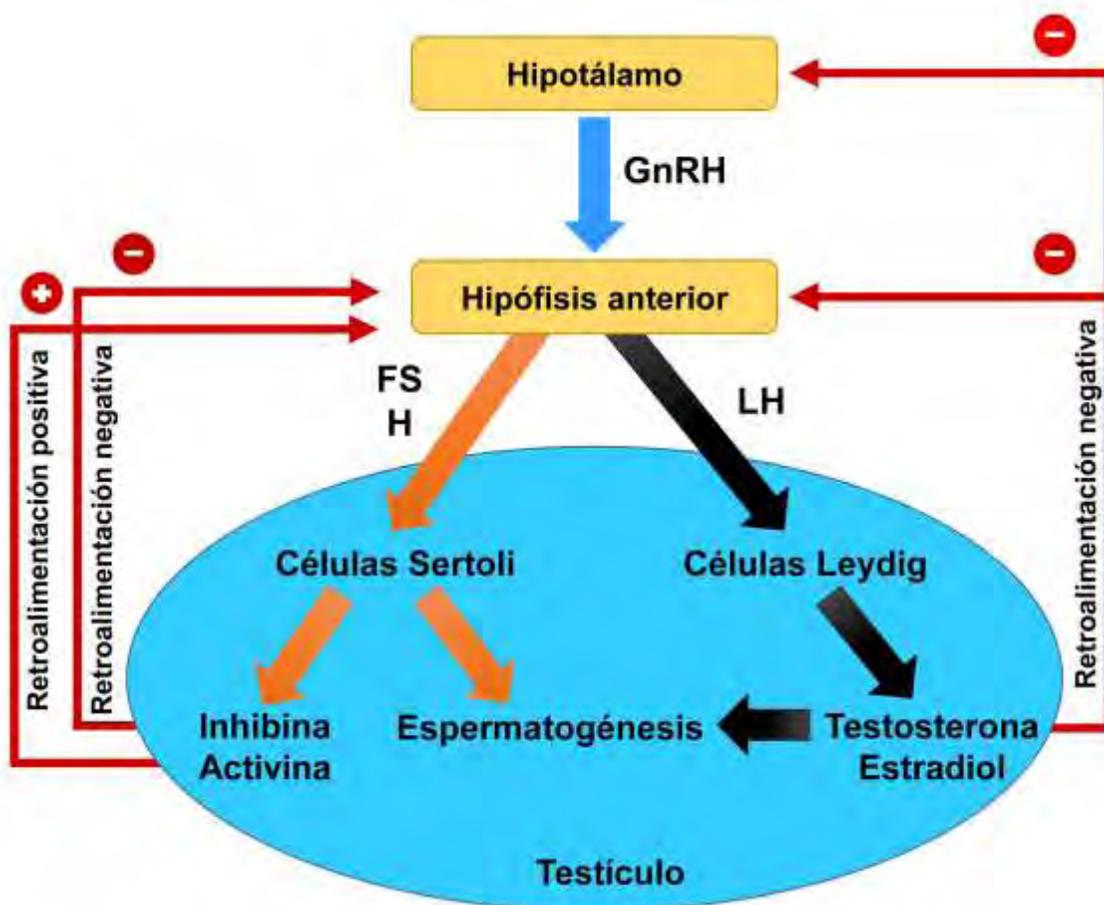
### ***3.3 Eje reproductivo masculino***

El eje reproductivo desempeña un papel vital en la fertilidad y la producción de hormonas esteroideas, el cual consta de tres niveles: hipotálamo, hipófisis y testículo y sus productos hormonales son la hormona secretora de gonadotropinas (GnRH), la hormona leuteinizante (LH), la hormona estimulante de folículos (FSH) y las hormonas esteroideas (Figura 3).

La GnRH es secretada por el hipotálamo de manera pulsátil [89] y estimula a la hipófisis anterior para inducir la síntesis y secreción de LH y FSH [90], las cuales tienen funciones importantes en la fertilidad. La LH estimula a las células de Leydig en los testículos y promueve la secreción de andrógenos como la testosterona. La FSH actúa sobre las células de Sertoli que son las encargadas de construir un microambiente para que se lleve a cabo la espermatogénesis y de producir complejos proteicos como la activina e inhibina [91].

El equilibrio del eje reproductivo se mantiene a través de un mecanismo de retroalimentación debido a la acción inhibitoria sobre el hipotálamo e hipófisis de la

LH, FSH, hormonas esteroides e inhibina. La testosterona y el estradiol secretados por los testículos tiene la propiedad de inhibir la secreción de la LH, como consecuencia de un efecto directo de la testosterona en el hipotálamo disminuyendo la formación de GnRH, lo que conduce a la disminución de LH y FSH por la hipófisis anterior, así pues, cuando la secreción de testosterona aumenta, este mecanismo de retroalimentación negativa reduce la secreción de GnRH; por otro lado, la inhibina ejerce un mecanismo de retroalimentación negativa sobre los centros hipotalámicos que controlan la producción de GnRH, por lo tanto disminuye la secreción FSH por la adenohipófisis [92].



**Figura 3.** Eje hipotálamo – hipófisis – testículo.

El eje reproductivo también se ve afectado por otras hormonas circulantes como por ejemplo la leptina e insulina [93]. La leptina es una hormona secretada por el tejido adiposo y es conocida como un regulador de la ingesta de alimentos y del

gasto energético, sin embargo, también desempeña un papel importante en la salud reproductiva [94], probablemente a través de diferentes acciones sobre el eje hipotálamo – hipófisis los cuales son un elemento clave en la regulación de la función testicular así como en la regulación neuroendocrina de la función reproductiva [95].

En relación con la función testicular, el receptor de leptina se ha localizado en las células de Leydig, en las células germinales, así como en la membrana plasmática del espermatozoide [96]. El sistema insulina/factor de crecimiento a insulina (IGF, por sus siglas en inglés) desempeña un papel importante en el crecimiento, proliferación y diferenciación celular [8]. Es importante destacar que este sistema también desempeña un papel importante en el desarrollo adecuado y la función de los testículos. Se ha demostrado que el IGF tipo 1 se expresa preferentemente en las células de Sertoli y en menor proporción en los espermatoцитos primarios y células de Leydig. Con respecto al receptor, el IGF1R se encuentra altamente expresado en los espermatoцитos secundarios [97]. Es importante mencionar que la producción de hormonas, la espermatogénesis y los testículos experimentan cambios a medida que el hombre envejece.

#### **4. Envejecimiento**

El envejecimiento es un proceso gradual que se caracteriza por la disminución de la respuesta homeostática [98-100] y se debe en gran medida a modificaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas [101] lo que ocasiona la disminución de la capacidad de adaptación de cada uno de los órganos y sistemas e incrementa la vulnerabilidad para la presencia de enfermedades crónico degenerativas. Con la edad, la dinámica mitocondrial, la biogénesis y la capacidad de fosforilación oxidativa disminuyen, mientras que el daño del ADN mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la inducción de eventos apoptóticos incrementa [102, 103]. El aumento en la generación de ROS y el daño oxidativo se han relacionado con múltiples patologías y envejecimiento prematuro. Por lo tanto,

el estrés oxidante y la alteración de los mecanismos de defensa antioxidante pueden contribuir en el proceso de envejecimiento biológico [104].

Diversos factores como la actividad física [105], la edad [106], la restricción calórica [107], la obesidad [108], la hipertrigliceridemia, la tolerancia anormal a la glucosa, la resistencia a la insulina y la hipertensión [109], tiene un papel importante en el proceso de envejecimiento ya que estos pueden alterar el equilibrio homeostático y la función mitocondrial [104].

#### ***4.1 Envejecimiento del sistema reproductor masculino***

Múltiples factores genéticos y ambientales aceleran el envejecimiento en las células somáticas, así como el de las células reproductoras masculinas. En el género masculino, la edad conduce a cambios graduales en las concentraciones hormonales como la testosterona y en el proceso de espermatogénesis, lo que en consecuencia ocasiona disminución tanto en la calidad, como en la concentración espermática [110].

Los efectos del envejecimiento en el sistema reproductor masculino se ven reflejados en la morfología testicular. Por ejemplo, en los hombres el volumen testicular aumenta entre los 11 y 30 años de edad y permanece constante entre los 30 y 60 años para posteriormente comenzar a disminuir gradualmente [111]. Estudios histomorfológicos han demostrado que con el envejecimiento disminuye en el número de células germinales y de células de Sertoli, lo cual puede ser debido al estrechamiento de los túbulos seminíferos [112]. Se sabe que las concentraciones de testosterona en suero disminuyen con la edad, particularmente debido a la disminución en el número de células de Leydig [113], al deterioro de la perfusión testicular y a la alteración de la secreción de GnRH [114]. La calidad espermática se ve modificada con la edad; la producción diaria de espermatozoides, así como la concentración y viabilidad espermática se correlacionan negativamente con la edad. En los hombres mayores de 50 años, la producción de espermatozoides disminuye más del 30% [113, 115]. La integridad

del ADN disminuye con la edad por lo que existe mayor fragmentación del ADN espermático empaquetamiento anormal de la cromatina y protaminación [116].

Las ROS son mediadores significativos en los mecanismos de transducción de señales y tienen función en la capacitación espermática, la reacción acrosomal y en la regulación de la unión de los espermatozoides y el ovocito [117]. Además, la radiación, el exceso de calor, algunos medicamentos, la exposición a metales pesados y el tabaquismo, conducen a una mayor producción de ROS en los testículos y el epidídimo [118]. La membrana de los espermatozoides está compuesta por una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados lo que los hace vulnerables a los efectos del estrés oxidante [118, 119]. Los espermatozoides contienen una pequeña cantidad de citoplasma, por lo que tienen menor número de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa. Además, el citoplasma del espermatozoide se concentra en el centro del espermatozoide, lo que hace improbable que alguna de las enzimas antioxidantes proteja la membrana de los espermatozoides [120].

Diversos estudios han indicado que el aumento de los niveles de ROS puede ser una causa importante de la infertilidad masculina. El incremento de ROS provoca aumento en la peroxidación lipídica, daño al ADN y apoptosis, lo que en última instancia culmina en la pérdida de la movilidad y viabilidad de los espermatozoides [121]. Durante el curso del envejecimiento, un desequilibrio entre los mecanismos de defensa antioxidantes y la producción de ROS dará como resultado ADN, lípidos y proteínas de baja calidad [122].

## **5. Estrés oxidante**

Los organismos vivos no pueden existir sin oxígeno; sin embargo, en condiciones celulares desfavorables, los derivados del oxígeno pueden interrumpir el equilibrio oxidativo; comprometer la viabilidad celular; dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [123]. Por lo tanto, se estableció el término estrés oxidante para definir la situación en la que se encuentra una célula que presenta un desequilibrio entre la

formación excesiva de oxidantes (radicales libres) en presencia de limitadas defensas antioxidantes en el organismo [124]. Esta condición está implicada en la patogénesis de varias enfermedades tales como cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas e infertilidad masculina, entre otras [125, 126].

Existen dos clases principales de radicales libres de interés biológico: las especies reactivas de nitrógeno (RNS) y las ROS [127]. Las RNS son una familia de compuestos químicos que se derivan del óxido nítrico, el cual fisiológicamente se sintetiza a partir de L-arginina, a través de la acción catalítica de la óxido nítrico sintasa [128]. Las ROS se generan como subproductos de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, de los peroxisomas y el sistema del citocromo P450 entre otros y desempeñan un papel importante en la señalización celular [129].

Las ROS describen colectivamente una serie de moléculas reactivas, tales como superóxido ( $O_2 \cdot^-$ ), radical hidroxilo ( $OH \cdot$ ), radical hidroperóxilo ( $HO_2 \cdot$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el óxido peroxil ( $ROO \cdot$ ) son oxidantes que pueden conducir fácilmente a reacciones de radicales libres en sistemas celulares [130, 131]. Además de los radicales libres mencionados anteriormente, existen otras moléculas con propiedades pro-oxidantes como los AGEs que son los productos finales de la glicación avanzada (glicotoxinas) que son derivados de la glicación endógena no enzimática de macromoléculas [132], las cuales tras su formación promueven la formación de RNS y ROS [133].

Los antioxidantes son moléculas que tienen la capacidad de detener o limitar los daños causados por los radicales libres [134], y se dividen en dos grandes categorías: enzimática y no enzimática. Los antioxidantes enzimáticos constituyen enzimas innatas que pueden desintoxicar el exceso de RNS y ROS, dentro de los cuales se incluyen la SOD, la GPx y la catalasa [135]; mientras que los antioxidantes no enzimáticos son moléculas exógenas y endógenas, tales como glutatión, vitamina C, vitamina A, vitamina E, selenio (Se) y zinc (Zn) [26, 136], los

cuales se denominan acarreadores (scavengers) de radicales libres pues les donan electrones para reducirlos y hacerlos menos reactivos [137].

Un estado de estrés oxidante, induce en la célula efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial y apoptosis [138]. Los lípidos es donde se produce el mayor daño de manera aguda, en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica (LPO), la cual afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados [139], como por ejemplo las células germinales [140]. La LPO es un indicador de estrés oxidante en células y tejidos. Los peróxidos lipídicos, derivados de ácidos grasos polinsaturados, son inestables y se descomponen para formar una serie de compuestos complejos. Entre estos se incluyen compuestos carbonilo, de los cuales el más abundante es el malonildialdehído (MDA). Por esta razón, la cuantificación del MDA es ampliamente usada como indicador de peroxidación lipídica [141].

Las consecuencias del daño en la estructura molecular de los ácidos grasos poli insaturados son más evidentes cuando estos lípidos forman parte de las membranas celulares o subcelulares, ya que se altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica lo que produce edema y muerte celular [142].

### ***5.1 Estrés oxidante e infertilidad***

Las ROS son subproductos de los procesos fisiológicos normales y del metabolismo celular. En los espermatozoides, las ROS son requeridas para la maduración, hiperactivación, capacitación, unión a la zona pelúcida, la reacción acrosomal y la fusión del ovocito con el espermatozoide [143] (figura 4). En condiciones fisiológicas normales, los antioxidantes en el semen ayudan a mantener bajas las concentraciones de estrés oxidante, permitiendo así los procesos normales de señalización celular y de la función espermática y evitar el daño celular inducido por ROS [144].

Sin embargo, cuando las ROS superan los sistemas de defensa antioxidante se producen efectos patológicos. Los espermatozoides son susceptibles a los daños inducidos por ROS debido a: 1) la susceptibilidad de la cromatina durante el periodo de condensación, 2) las células espermáticas carecen de mecanismos de reparación del ADN, 3) los propios espermatozoides producen ROS, especialmente durante su paso a través del epidídimo, 4) poseen bajas concentraciones de enzimas antioxidantes citoplasmáticas (la mayoría de las enzimas antioxidantes se pierden en la espermiogénesis) y 5) debido a la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que contiene la membrana del espermatozoide, lo que los vuelve muy susceptibles a la LPO [145-147].



**Figura 4.** Estrés oxidante en la reproducción masculina. Modificado de [143].

Se ha demostrado que los espermatozoides con anomalías morfológicas como el citoplasma residual o la gota citoplasmática son muy activos en la

producción de ROS [148, 149] y esto se asocia con la alteración en la movilidad, concentración y morfología espermática, los cuales son parámetros importantes para conocer el potencial de un individuo para producir espermatozoides viables [122]. La disminución de la movilidad puede ser el resultado de una cascada de eventos que ocurren durante la LPO, tales como daño axonal e incremento en las alteraciones de la pieza media [150, 151].

Durante el proceso de espermiogénesis, la cromatina espermática sufre una serie de modificaciones en el que las histonas se sustituyen por proteínas de transición y posteriormente por protaminas para su compactación, lo cual protege al ADN [152]. Sin embargo, si existe una protaminación incompleta de la cromatina y una pobre compactación, el ADN es más vulnerable al estrés oxidante ya que puede ocasionar fragmentación del ADN, apoptosis, una baja tasa de fertilización, una alta frecuencia de abortos involuntarios y morbilidad en la descendencia [153].

# IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha establecido que un órgano o un tejido específico pueden ser programados *in utero* por efecto de un estímulo o reto precoz en un periodo sensible del desarrollo, con consecuencias adversas en su función en la vida postnatal, lo que se ha definido como “programación del desarrollo”. La malnutrición durante etapas tempranas se asocia con aumento en el estrés oxidante, el cual está implicado en la patogénesis de muchas enfermedades y defectos del desarrollo, incluyendo la infertilidad masculina. En nuestro grupo de trabajo hemos publicado que la restricción en el consumo de proteína en la dieta materna durante la gestación reduce la capacidad reproductiva de las crías macho en la vida adulta. Por lo que para el presente proyecto propusimos estudiar los efectos del consumo de una dieta baja en proteína durante la gestación, sobre la maduración y funcionamiento de la célula de Sertoli, su repercusión en la adecuada progresión de la espermatogénesis, así como sus efectos sobre el estrés oxidante en testículos fetales, prepuberales, puberales y durante la etapa adulta. Además de su impacto sobre la calidad espermática y capacidad reproductiva.

# V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

## **V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué efectos tendrá el consumo materno de una dieta baja proteína durante la gestación, en las concentraciones séricas de testosterona, en la calidad espermática, en la generación de ROS en los testículos y espermatozoides y en la función reproductiva de las crías en la vida adulta?

## VI. HIPÓTESIS

## **VI. HIPÓTESIS**

La restricción en el consumo de proteína en la dieta materna durante la gestación provocará disminución en las concentraciones séricas de testosterona, incremento en el estrés oxidante en el testículo y en los espermatozoides, disminución en la cuenta espermática debido a alteraciones en el funcionamiento de las células de Sertoli y al menor número de células germinales durante la etapa prepuberal, así como envejecimiento prematuro de la función reproductiva.

## VII. OBJETIVOS

## **VII. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo general**

Evaluar mecanismos por los cuales la restricción en el consumo de proteína en la dieta materna durante la gestación afecta el desarrollo sexual y la capacidad reproductiva de las crías macho en la vida adulta.

### **2. Objetivos específicos**

Determinar en las crías macho los efectos de la restricción en el consumo de proteína en la dieta materna durante la gestación sobre:

- » El patrón de crecimiento corporal y testicular.
  
- » La LPO, ROS y la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx) en testículos de 19 días de gestación, así como de 21, 36, 110 y 840 días de edad.
  
- » La LPO, ROS y la actividad de SOD y GPx en espermatozoides de crías de 110 días de edad.
  
- » La calidad espermática en las crías de 110 días de edad.
  
- » La expresión del AR a los 14, 21 y 36 días y el número de células germinales (totales y espermatocitos) en testículos de 14 días de edad.
  
- » La capacidad reproductiva a los 110, 450 y 840 días de edad.
  
- » Evaluar el proceso normal de envejecimiento de la función reproductiva y si la restricción proteínica materna acelera este proceso.

# VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

## **VIII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Animales**

Todos los procedimientos involucrados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) en materia de cuidado y uso de los animales de laboratorio. Los animales se obtuvieron del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del INCMNSZ y se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz y temperatura (luz de 07:00 h a 19:00 h a 22 – 23 °C). Durante todo el experimento los animales consumieron alimento y agua ad libitum.

### **2. Apareamiento, cuidado y mantenimiento de los animales**

Se emplearon ratas hembra vírgenes de la cepa Wistar de 4 meses de edad, con un peso de entre 220 y 260 g, con ciclos regulares y alimentadas con dieta chow (Zeigler Rodent RQ 22-5). Las hembras se alojaron en cajas de acrílico con un macho de la misma cepa y de fertilidad probada (2:1) para su apareamiento. Diariamente por la mañana se realizaron frotis vaginales para determinar la presencia de espermatozoides. El día que se observaban los espermatozoides en el frotis vaginal fue designado como inicio de la gestación (día cero). Sólo se mantuvieron en el estudio aquellas ratas que quedaron preñadas dentro de los 5 días posteriores a ser colocadas con el macho. Las ratas gestantes fueron transferidas a cajas individuales y divididas de manera aleatoria para ser alimentadas ad libitum con una de las dos dietas isocalóricas, ya sea el control con 20% de caseína (grupo C, n=14) o la restringida con 10% de caseína (grupo R, n=14). Los grupos experimentales fueron: control (C) y restringido únicamente durante la gestación (R). Se registró el peso corporal al inicio y al final de la gestación.

### **3. Elaboración de las dietas**

Las dietas control y restringida, se prepararon en la planta piloto de la Unidad de Tecnología de Alimentos del INCMNSZ, utilizando los siguientes equipos: mezcladora Hobart®: Modelo A200 The Hobart MFG. C.O; báscula EURA®: peso total 100 Kg. Modelo 2000/100 y balanza Sartorius®: sensibilidad 0.001g.

La composición de las dietas experimentales se muestra en la tabla 1. La dieta control corresponde a las últimas recomendaciones de la NRC de 1993, para roedores en periodo de gestación y lactancia [154].

Los componentes de la dieta se pesaron en una balanza o báscula según la cantidad requerida y fueron introducidos en el tazón de la mezcladora Hobart®. La dieta se mezcló durante 15 minutos; posteriormente se le adicionó agua (aproximadamente 2 L / 7Kg de dieta) y se dejó mezclando durante 5 minutos más, hasta obtener una pasta moldeable. Con la masa obtenida se formaron galletas, dejándolas secar durante 2 ó 3 días a temperatura ambiente. Las galletas obtenidas se guardaron en refrigeración para su conservación.

**Tabla 1.** Composición de las dietas isocalóricas. C (control, caseína 20%) y R (restringida, caseína 10%). Adquisición de los ingredientes: *caseína libre de vitaminas, mezcla de minerales, vitaminas y clorhidrato de colina* de Harlan Teklad, EUA; *almidón de maíz y dextrosa anhidra* de la Droguería Cosmopolita S.A de C.V, México; *L-cistina dihidroclorada y  $\alpha$ -celulosa* de Sigma – Aldrich Química S.A de C.V, México; *aceite de maíz* de La Gloria, México. Todos los componentes son grado alimenticio.

|                                     | <b>Dieta Control (C)</b> | <b>Dieta Restringida (R)</b> |
|-------------------------------------|--------------------------|------------------------------|
|                                     | <b>Caseína 20%</b>       | <b>Caseína 10%</b>           |
|                                     | <b>(g/100g)</b>          | <b>(g/100g)</b>              |
| <b>Caseína libre de Vitaminas</b>   | 20                       | 10                           |
| <b>L-Cistina Dihidroclorada</b>     | 0.3                      | 0.15                         |
| <b>Clorhidrato de Colina</b>        | 0.165                    | 0.165                        |
| <b>Mezcla de Vitaminas</b>          | 1                        | 1                            |
| <b>Mezcla de Minerales</b>          | 3.5                      | 3.5                          |
| <b><math>\alpha</math>-Celulosa</b> | 5                        | 5                            |
| <b>Aceite de Maíz</b>               | 5                        | 5                            |
| <b>Almidón de Maíz</b>              | 32.5                     | 37.5                         |
| <b>Dextrosa Anhidra</b>             | 32.5                     | 37.5                         |
| <b>Contenido energético</b>         | 3.85 kcal/g              | 3.85 kcal/g                  |

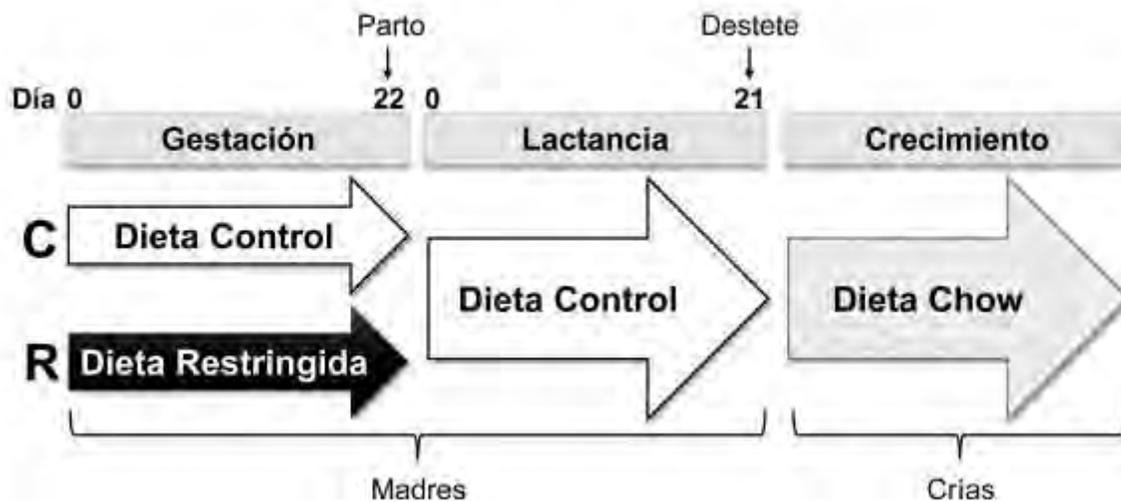
#### **4. Obtención de las muestras biológicas a los 19 días de gestación (dG)**

A los 19 dG entre las 12:00 a 14:00 horas y tras seis horas de ayuno, 8 madres de cada grupo fueron sacrificadas usando una guillotina para roedor (Thomas Scientific, NJ), los fetos fueron extraídos y sacrificados por decapitación para que los testículos fueron disectados, pesados, agrupados por camada, congelados y almacenados a -70°C para evaluar posteriormente marcadores de estrés oxidante.

## 5. Mantenimiento postnatal

El parto de las ratas gestantes (6 por cada grupo) ocurrió en el día 22 post-coito y fue designado como inicio de la lactancia y día postnatal (PND, por sus siglas en inglés) cero. Al nacimiento, todas las madres se alimentaron ad libitum con dieta control. Al día 2 PND, las camadas se ajustaron a 12 crías por madre, de ser posible en una proporción 1:1 (macho: hembra). Se registró el peso corporal materno al inicio y final de la lactancia, así como la proporción macho: hembra.

Las madres con menos de 12 o más de 15 crías fueron excluidas del estudio. Al destete (PND 21), todas las crías fueron separadas de acuerdo a su sexo en grupos de 3 a 4 crías por caja y a partir de ese momento y hasta el final del estudio las crías consumieron dieta chow ad libitum (figura 5). En este trabajo, sólo se reportan los resultados en las crías macho.



*Figura 5. Diseño experimental.*

## 6. Obtención de las muestras biológicas a diferentes edades postnatales

El presente proyecto es un estudio a lo largo de la vida que pretende evaluar el proceso normal de envejecimiento en la función reproductiva y además si la

restricción en el consumo de proteína en la dieta materna acelera en las crías este proceso. Por lo tanto, las crías fueron sacrificadas a diferentes edades (fetal, prepuberal y edad adulta).

A los 14 PND, un macho de cada camada fue sacrificado para la obtención de los testículos. Uno de ellos fue congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  para evaluar posteriormente la expresión del AR por Western blot. La mitad del otro testículo fue fijado en paraformaldehído al 4% y el resto en solución de Karnovsky.

Después de 6 horas de ayuno, un macho de cada camada fue decapitado (entre las 12:00 a 14:00 horas) a los 21, 36, 110 y 850 PND. La sangre fue recolectada y posteriormente centrifugada para obtener el suero, el cual fue congelado para su posterior análisis. Los testículos fueron obtenidos, limpiados, pesados, congelados y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para evaluar posteriormente marcadores de estrés oxidante. A los 110, 450 y 850 DPN, la grasa que rodea al epidídimo fue retirada para pesarla individualmente. A los 110, 450 y 850 DPN la cola del epidídimo y el conducto deferente fueron diseccionados cuidadosamente y colocados en solución salina a  $37^{\circ}\text{C}$  para liberar los espermatozoides. Aunque es difícil hacer comparaciones de edad entre la rata y el humano, podemos decir que los 110 PND equivalen a un adulto joven ( $\sim 17$  años), los 450 días a un adulto maduro ( $\sim 45$  años) y los 850 PND serían equivalentes a un hombre de  $\sim 90$  años [155].

## **7. Preparación de las muestras**

Los testículos congelados se homogenizaron en solución salina a  $4^{\circ}\text{C}$ , se obtuvieron alícuotas y fueron conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para cuantificar posteriormente proteínas mediante la técnica de Bradford y la determinación de especies reactivas de oxígeno y la actividad de enzimas antioxidantes.

De los espermatozoides obtenidos se realizaron alícuotas con  $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  y ajustadas a volumen final de  $50 \mu\text{l}$  con solución salina, las cuales fueron sometidas

a choque térmico de -70 °C a 45 °C y posteriormente se sonicaron durante dos minutos con 6 intervalos de 20 segundos cada uno. Se colocaron el hielo y se congelaron a -70 °C para la posterior cuantificación de ROS y de enzimas antioxidantes.

## **8. Concentraciones hormonales**

La FSH y LH se determinaron por RIA de doble anticuerpo, empleando la hormona estándar y los anticuerpos específicos anti FSH o LH de rata, proporcionados por NIDDK (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Baltimore, MD). La FSH y LH fueron yodadas por el método de cloramina – T, siguiendo la separación de proteínas libres y unidas [<sup>125</sup>I], por Sephadex G – 100. Los resultados fueron expresados como NIDDK-rata-FSH-RP2 y NIDDK-rata-LH-RP3. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron <4 y 7.9 y <5.1 y <6.5 respectivamente.

Las concentraciones de testosterona fueron determinadas por radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida, utilizando un estuche comercial para rata de DPC Coat – a – Count (TKTT1), adquirido de Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, el cual emplea un anticuerpo específico y testosterona marcada radioactivamente con <sup>125</sup>I. Las variabilidades intra- e interensayo fueron de <8.17 y <8.83.

## **9. Biomarcadores de estrés oxidante**

### ***9.1 Malondialdehído (lipoperoxidación)***

La lipoperoxidación se determinó el mismo día en el cual los testículos fueron homogenados y los espermatozoides obtenidos. Alícuotas con 5 x 10<sup>6</sup> espermatozoides se ajustaron con solución salina a un volumen final de 100 µl. La lipoperoxidación se determinó mediante la medición de MDA utilizando el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). A 100µl de la muestra se les añadió 400 µl del Reactivo C, el cual contiene TBA = ácido tiobarbitúrico,

TCA = ácido tricloroacético y HCl concentrado = ácido clorhídrico. Las muestras fueron agitadas vigorosamente y a continuación se les añadió 5µl de BHT y se incubaron a 45°C por una hora. Transcurrido este tiempo fueron colocadas en hielo y centrifugadas a 8000 rpm por 15 minutos a 6°C. Se colocaron 300 µl del sobrenadante en una placa de 96 pozos y las muestras fueron leídas a 532nm en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50-B. Los resultados fueron expresados como nmol MDA por mg de proteína o nmol MDA en  $5 \times 10^6$  espermatozoides [156]. Las variabilidades intra- e interensayo fueron de <6 y <8, respectivamente.

## **9.2 Determinación de ROS**

Las muestras del testículo homogenado o de los espermatozoides ( $5 \times 10^6$ ) fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 7 minutos a 6°C. Se utilizaron 5 µl del sobrenadante. En una placa negra de 96 pozos la curva y las muestras se trataron de la siguiente forma:

Curva estándar: el volumen utilizado del estándar 3 fue de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 µl. Se llevó a un volumen final de 200 µl con amortiguador Tris – HEPES 9:1. Estándar 1: 4.0121 mg de 2',7'-diclorofluoresceína en 1.0 ml de metanol grado HPLC. Estándar 2: 49.5ml amortiguador 9:1 + 495 µl de metanol grado HPLC + 5 µl de estándar. Estándar 3: 100 µl del estándar 2 + 900 µl de amortiguador 9:1. Tris Base 40 mM, pH 7.4. Amortiguador HEPES (120 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5.0 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 6.0 mM Glucose, 1.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10.0 mM HEPES). Muestras: 5 µl de la muestra + 145 µl de amortiguador Tris – HEPES 18:1 + 50 µl de solución de trabajo (100 µl de la solución stock en 1.9 ml de metanol grado HPLC).

Tanto la curva como las muestras fueron incubadas a 37°C durante 1 hora en obscuridad. Al final del periodo de incubación las señales fluorescentes fueron determinadas a una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 525 nm empleando un espectrofotómetro de luminiscencia

Perkin-Elmer LS50-B [156]. Los resultados están expresados como nmoles de diclorofluoresceína (DCF) formados por mg de proteína por minuto o como nmoles de diclorofluoresceína (DCF) formados en  $5 \times 10^6$  espermatozoides por minuto.

## **10. Actividad de las enzimas antioxidantes**

### **10.1 Superóxido dismutasa (SOD)**

Las alícuotas del testículo homogenado y de los espermatozoides ( $5 \times 10^6$ ) descongelados fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 7 minutos a 6°C. La actividad de la SOD se determinó empleando el estuche de RANSOD (RANDOX laboratorios limited, UK). El método emplea Xantina y Xantin oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T) para formar un colorante formazán rojo. Se mide la actividad de la superóxido dismutasa por el grado de inhibición de esta reacción. Las muestras fueron procesadas de la siguiente forma: se colocaron 7  $\mu$ l del sobrenadante de cada muestra o de la curva estándar en una placa de 96 pozos; y posteriormente a cada pozo se le adicionaron 212.5  $\mu$ l del sustrato mixto que contiene la Xantina y el I.N.T y 31.3  $\mu$ l de la Xantin oxidasa. La placa fue agitada vigorosamente. Las muestras fueron leídas a 505nm a diferentes tiempos (0, 30" y 3') a 37°C. Los resultados fueron expresados como unidades de SOD por mg de proteína.

### **10.2 Glutación peroxidasa (GPx)**

Tanto para el tejido como para la alícuota de  $5 \times 10^6$  de espermatozoides sonicados se utilizó el estuche RANSEL de RANDOX (en este método la GPx cataliza la oxidación de glutación, por el hidróxido de cumeno. El glutación oxidado en presencia de la glutación reductasa y NADPH, es convertido a su forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH en NADP<sup>+</sup>. Se mide la reducción de la actividad). Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 7 minutos a 6°C; posteriormente las muestras fueron procesadas de la siguiente forma: se

colocaron 7  $\mu$ l de cada muestra en una placa y se les añadieron 250  $\mu$ l del reactivo R1a que contiene glutatión, glutatión reductasa y NADPH; posteriormente se les agregaron 10  $\mu$ l de hidroperóxido de cúmeno. La placa fue agitada vigorosamente. Las muestras fueron leídas a 340nm a diferentes tiempos (0, 1', 2' y 3') a 37°C. Los datos fueron expresados como mili unidades de GPx por mg de proteína.

## **11. Calidad espermática**

Los espermatozoides obtenidos del conducto deferente y de la cola del epidídimo fueron utilizados para la determinación de la concentración, viabilidad, motilidad y morfología espermática. Para la viabilidad se tomaron 10  $\mu$ l de espermatozoides y se les añadieron 10  $\mu$ l de eosina y se contaron 4 campos en el microscopio de campo claro. La concentración y motilidad fue realizada de forma automatizada en capilares desechables del equipo SQA-V (Sperm Quality Analyzer). La evaluación de la morfología espermática se realizó en el microscopio de campo claro para lo cual se realizó un barrido con 10  $\mu$ l de la muestra y fue teñido empleado un método de tinción rápida (esperma-form, Laboratorio FertiMéxico S.A. de C.V) que ayuda a diferenciar las diferentes partes del espermatozoide (cabeza, pieza media, flagelo). Se observaron por lo menos 200 espermatozoides por muestra.

## **12. AR (receptor de andrógenos) y células germinales**

### ***12.1 Determinación del AR por Western blot a los 14, 21 y 36 días de edad.***

Se realizaron homogenados totales de los testículos en presencia de inhibidores de proteasas. Las muestras fueron centrifugadas, se obtuvo la fracción soluble y se realizó la cuantificación del contenido de proteínas por el método de Bradford [157]. De cada muestra se procesaron 50  $\mu$ g de proteína en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% que posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con solución de bloqueo TBST (20 mM de tris base, 0.5 M de NaCl, 0.1% de tween 20) con 5% de leche descremada. Al término se realizaron 3 lavados con TBST y se incubaron con el anticuerpo anti-AR (1:1000, Santa Cruz, USA)

toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario (1:3000, Santa Cruz, USA) por una hora. Al término las membranas se realizaron 4 lavados con TBST. La unión del anticuerpo a su antígeno se reveló usando sistemas de quimioluminiscencia.

### ***12.2 Determinación del AR por inmunohistoquímica (IHQ) a los 14, 21 y 36 días de edad.***

Uno de los testículos fue fijado en paraformaldehído al 4% por un periodo no mayor de 16 horas. Transcurrido ese tiempo las muestras fueron lavadas en PBS y procesadas para su inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes de 4 µm de grosor. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados; la actividad endógena de peroxidasa fue bloqueada durante 30 minutos en una solución al 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / metanol, y lavados posteriormente con agua destilada. Para la determinación del AR, se empleó un anticuerpo primario policlonal producido en conejo (Santa Cruz, USA Cat. SC-816) con una dilución de 1:500, el cual se une a la zona amino terminal del receptor. Posteriormente los cortes fueron lavados en PBS e incubados durante 30 minutos con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con HRP (peroxidasa de rábano. Santa Cruz, Biotechnology, USA) y fueron lavadas nuevamente en PBS. Para determinar los sitios de unión del anticuerpo las muestras fueron teñidas con diaminobencidina de 6 – 8 minutos y contrastadas con una tinción de hematoxilina. Las muestras fueron deshidratadas, aclaradas y montadas con medio de montaje (Entellan®). La expresión del AR se observó en las células de Sertoli, dentro de los túbulos seminíferos empleando el microscopio de campo claro.

### ***12.3 Conteo de las células germinales a los 14 días de edad.***

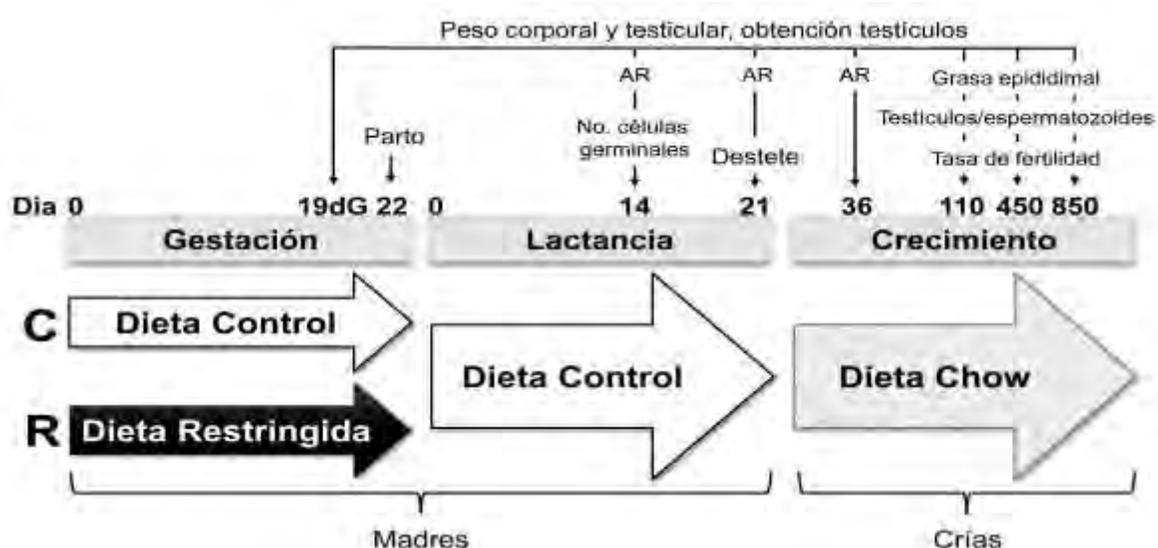
Una parte del testículo fue fijado en solución de Karnovsky modificado sin calcio por un periodo no mayor a 16 horas. Transcurrido este tiempo los tejidos fueron lavados en una solución amortiguadora de cacodilatos y posteriormente las muestras se post – fijaron en OsO<sub>4</sub> al 1% y fueron procesadas para su inclusión

en EPON 812. Se realizaron cortes de 1  $\mu\text{m}$  de grosor, los cuales fueron teñidos por flotación en azul de toluidina al 0.5%. Para realizar el conteo de las células germinales y de los espermatoцитos, los cortes fueron montados en laminillas y al menos 50 túbulos seminíferos en corte transversal fueron fotografiados por animal con un microscopio Olympus BX51, utilizando el software de análisis de imágenes (Image-Pro Plus Version 3.1., Media Cybernetics, USA).

### 13. Tasa de fertilidad a diferentes edades postnatales

La fertilidad de los machos se evaluó a los 110, 450 y 850 PND (adultos jóvenes, maduros y viejos) de la siguiente forma: cada macho experimental se colocó con dos hembras por una semana; posteriormente los machos fueron separados y las hembras fueron mantenidas individualmente hasta el día 15 de gestación. Se determinó que el macho era fértil cuando este fecundo al menos a una de las dos hembras no experimentales con las que se apareó. Los datos fueron reportados como el % de machos fértiles y el % de hembras gestantes.

En la figura 6, se muestra en forma esquemática los experimentos realizados en la etapa fetal, prepuberal y en la vida adulta.



**Figura 6.** Línea de tiempo, donde se muestran los experimentos realizados durante el estudio.

## 14. Análisis estadístico

Se realizaron dos experimentos diferentes un primero para la obtención de los testículos a 19 dG (n=8 camadas por grupo) y un segundo experimento para 14, 21, 36, 110, 450 y 850 PND (n=6 camadas por grupo). Para evaluar las diferencias entre los grupos C y R a la misma edad y dentro del mismo grupo, pero en diferentes edades se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con prueba postHoc Holm-Sidak. Se utilizó la prueba t de Student no pareada para evaluar las diferencias en las características maternas, calidad espermática, la expresión del receptor de andrógenos y el número de células germinales. La tasa de fertilidad se analizó utilizando  $\chi^2$ . A  $p < 0,05$  se consideró significativo. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  EE.

# IX. RESULTADOS

## IX. RESULTADOS

### 1. Características maternas y de las crías.

*El consumo de una dieta baja en proteína durante la gestación no modificó el peso corporal materno, pero si el de las crías fetales y al nacimiento.*

En la tabla 2, podemos observar que el peso corporal materno al inicio y final del embarazo fue similar en ambos grupos experimentales. El peso corporal de las crías a los 19 dG y al nacimiento fue menor en el grupo R; tanto la talla al nacimiento, como la distancia ano-genital, el diámetro cefálico y abdominal fueron similares al grupo C. No se observaron cambios en la proporción de sexos entre camadas. El cambio a dieta control al inicio de la lactancia en las madres del grupo R, no modificó el peso corporal al inicio, ni al final de la lactancia.

**Tabla 2.** Características maternas y medidas morfométricas de las crías macho al nacimiento

| <b>Madres</b>   | <b>C</b>    | <b>R</b>    |
|---|-------------|-------------|
| <b><i>Peso corporal (g) al inicio de la gestación</i></b> | 229 ± 6     | 223 ± 6     |
| <b><i>Peso corporal (g) al final de la gestación</i></b>  | 331 ± 14    | 322 ± 7     |
| <b><i>Peso corporal (g) al inicio de la lactancia</i></b> | 245 ± 9     | 240 ± 4     |
| <b><i>Peso corporal (g) al final de la lactancia</i></b>  | 258 ± 8     | 248 ± 6     |
| <b>Crías</b>  |             |             |
| <b><i>Peso a los 19dG (g)</i></b>                         | 3.1 ± 0.07  | 2.7 ± 0.08* |
| <b><i>Peso al nacimiento (g)</i></b>                      | 5.8 ± 0.03  | 5.2 ± 0.01* |
| <b><i>Talla al nacimiento (cm)</i></b>                    | 4.6 ± 0.03  | 4.5 ± 0.05  |
| <b><i>Distancia ano-genital (mm)</i></b>                  | 3.4 ± 0.01  | 3.2 ± 0.02  |
| <b><i>Diámetro cefálico (mm)</i></b>                      | 11.4 ± 0.02 | 11.4 ± 0.02 |
| <b><i>Diámetro abdominal (mm)</i></b>                     | 12.2 ± 0.03 | 12.2 ± 0.03 |
| <b><i>Relación macho: hembra</i></b>                      | 1.1 ± 0.11  | 0.9 ± 0.07  |

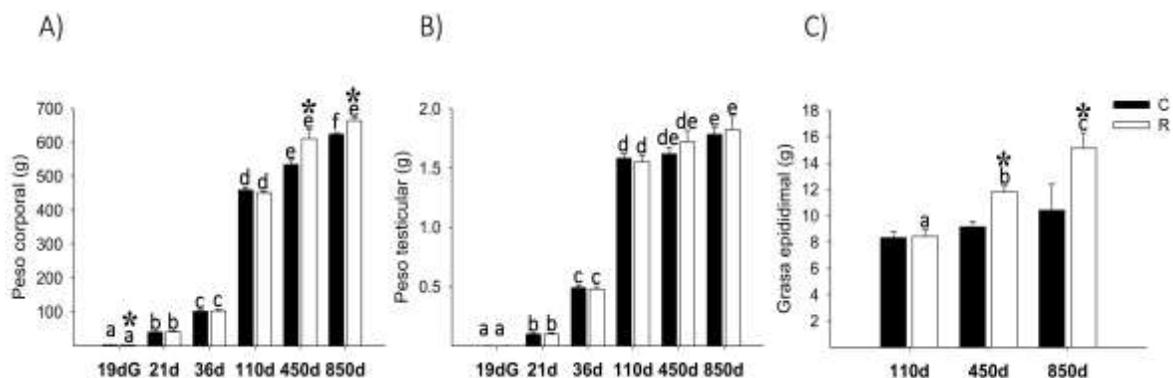
Media ± EE, n=8 camadas (~48 machos fetales) a los 19 dG y n=6 camadas (~36 crías macho) al nacimiento. dG= días gestacionales. P<0.05 \* vs C para el control (C) y restringido (R).

A partir de este momento, en la descripción de los resultados, primero se mencionarán las diferencias entre las crías de los grupos C y R a la misma edad y posteriormente entre mismo grupo, a las diferentes edades evaluadas.

## 2. Peso corporal, testicular y grasa epididimal.

***El consumo materno de una dieta baja en proteína durante la gestación incrementa en la vida adulta de las crías el peso corporal y la grasa epididimal.***

A los 19 dG el peso corporal fue menor en el grupo R en comparación con C; a los 21 (destete), 36 y 110 PND no se encontraron diferencias estadísticas en el peso corporal de las crías, sin embargo, para los 450 y 850 PND el peso corporal fue significativamente mayor en las crías del grupo R en comparación con C (Fig. 7A). Con respecto al peso testicular no se encontraron diferencias estadísticas entre grupos a todas las edades evaluadas (Fig. 7B). A los 110 PND la grasa epididimal fue similar entre ambos grupos; sin embargo, para los 450 y 850 fue significativamente mayor en las crías del grupo R vs C (Fig. 7C). El incremento en el peso corporal y testicular en ambos grupos se relaciona con la edad (Fig. 7A y 7B), sin embargo, en el grupo R se observa que el incremento en la grasa epididimal es debido a la edad (Fig. 7C).

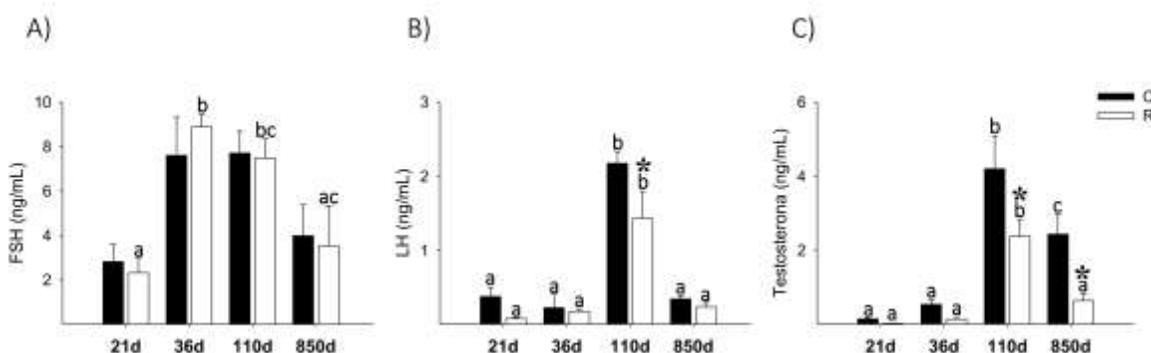


**Figura 7.** Pesos a diferentes edades. A) peso corporal, B) peso testicular y C) grasa epididimal. Media  $\pm$  EE,  $n=8$  camadas ( $\sim 48$  machos fetales) a los 19 dG y  $n=6$  ratas de diferente camada para el resto de las edades postnatales.  $P < 0.05$  para letras diferentes en el mismo grupo, pero a diferentes edades y \* vs C a la misma edad. dG= días de gestación y d= días postnatales. Control (C) y restringido (R).

### 3. Concentraciones hormonales.

***El consumo materno de una dieta baja en proteína durante la gestación disminuye en la vida adulta de las crías las concentraciones séricas de LH y testosterona.***

A todas las edades evaluadas, las concentraciones de FSH fueron similares entre los grupos C y R (Fig. 8A); mientras que las concentraciones de LH fueron únicamente menores a los 110 PND en el grupo R con respecto al C (Fig. 8B). La testosterona sérica fue menor a los 110 y 850 PND en el grupo R en comparación con C (Fig. 8C), sin diferencias entre grupos a las otras edades evaluadas. Cuando las concentraciones hormonales fueron analizadas entre mismo grupo por edad, observamos las concentraciones de FSH de las crías del grupo R, disminuyen a los 850 PND con respecto a 36 PND (Fig. 8A). Tanto en C como en R las concentraciones LH se incrementan a los 110 PND y se observa una caída entre los 110 y 850 PND (Fig. 8B). Esta misma tendencia se observa en las concentraciones de testosterona, sin embargo, la disminución debido a la edad es más evidente en las crías del grupo R (Fig. 8C).



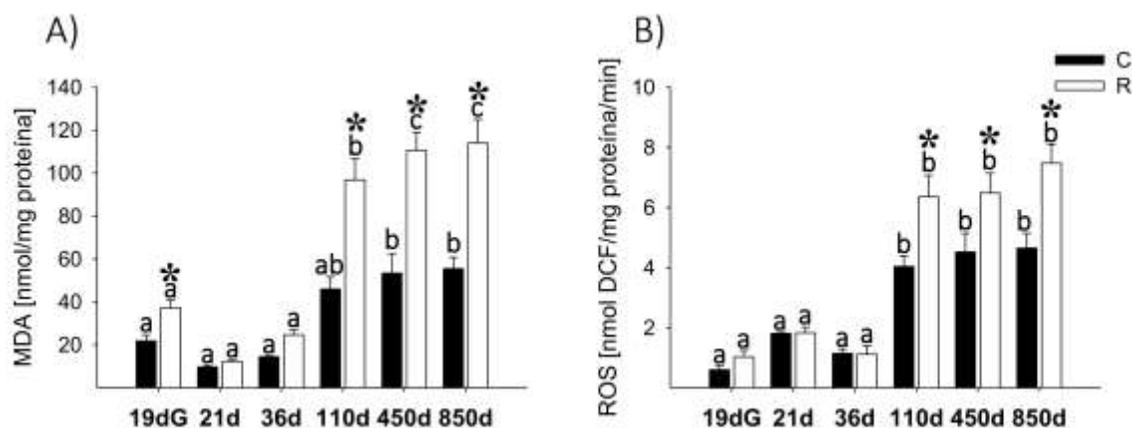
**Figura 8.** Concentraciones hormonales. A) FSH, B) LH y C) testosterona. Media  $\pm$  EE, n=6 ratas de diferente camada.  $P < 0.05$  para letras diferentes en el mismo grupo, pero a diferentes edades y \* vs C a la misma edad. d= días postnatales. Control (C) y restringido (R).

#### 4. Biomarcadores de estrés oxidante en el testículo

*El consumo materno de una dieta baja en proteína durante la gestación incrementa en los testículos de las crías (edad adulta) las concentraciones de MDA y ROS.*

A los 19 dG las concentraciones de MDA fueron mayores en los testículos de las crías del grupo R en comparación con C (Fig. 9A). A los 110, 450 y 850 PND las concentraciones testiculares tanto de MDA como de ROS fueron más altas en las crías del grupo R que en las del C (Fig. 9A y 9B).

Cuando los biomarcadores de estrés oxidante en el testículo se analizaron entre mismo grupo por edad, encontramos que en el grupo C el MDA se incrementa a los 110 PND en comparación con 19 dG, 21 y 36 PND, esta misma tendencia se observa en el grupo R, sin embargo; a los 450 PND el MDA presenta un incremento significativo con respecto a 110 PND (Fig. 9A). Para ambos grupos, las concentraciones de ROS aumentan a los 110 PND en comparación con las edades más tempranas y sin cambios a los 450 y 850 PND (Fig. 9B).



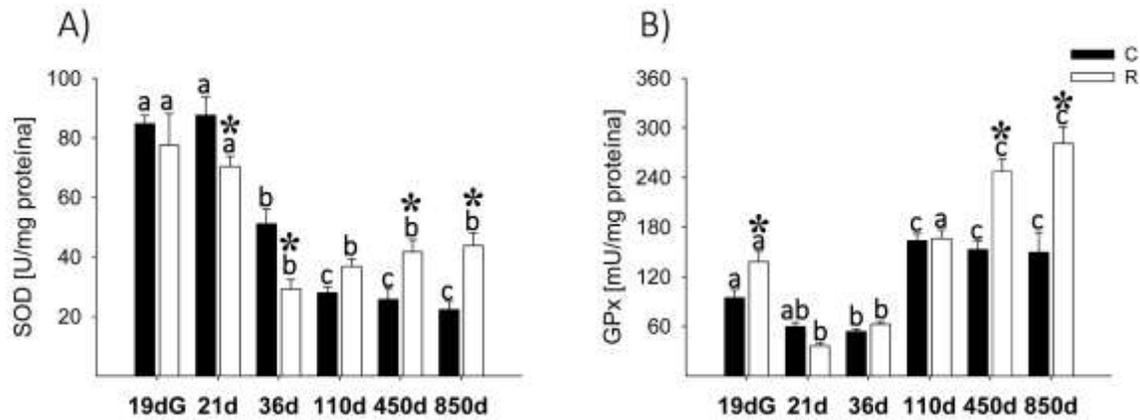
**Figura 9.** Biomarcadores de estrés oxidante en el testículo. A) MDA y B) ROS. Media  $\pm$  EE,  $n=8$  camadas (~48 machos fetales) a los 19 dG y  $n=6$  ratas de diferente camada para el resto de las edades postnatales.  $P<0.05$  para letras diferentes en el mismo grupo, pero a diferentes edades y \* vs C a la misma edad. dG= días de gestación y d= días postnatales. Control (C) y restringido (R).

## **5. Actividad de las enzimas antioxidantes en el testículo.**

***El consumo materno de una dieta baja en proteína durante la gestación incrementa en los testículos de las crías (edad adulta) la actividad de SOD y GPx.***

Con respecto a las enzimas antioxidantes, a los 19 dG y 110 PND la actividad de SOD fue similar en ambos grupos; sin embargo, a los 21 y 36 PND la actividad de SOD fue significativamente menor en el grupo R que en el C. En las ratas de 450 y 850 PND, la actividad de SOD se incrementó en los testículos del grupo R en comparación con C (Fig. 10A). A los 19 dG, 450 y 850 PND, la actividad de GPx testicular fue mayor en las crías del grupo R que en las del C; no se encontraron diferencias a los 21, 36 y 110 PND (Fig. 10B).

Al evaluar la actividad antioxidante entre mismo grupo, pero a las diferentes edades, observamos que tanto en el grupo C y R, la actividad de SOD fue mayor a los 19 dG y 21 PND en comparación con 36 PND. Sin embargo, en el grupo C la actividad de SOD disminuyó a los 36 PND y más aún a los 110 PND sin cambios a los 450 y 850 PND; mientras que en el grupo R la actividad de SOD disminuye a los 36, 110, 450 y 850 PND en comparación con edades más tempranas (Fig. 10A). En el grupo C, la actividad de GPx disminuye a los 36 PND en comparación con 19 dG; sin embargo, a los 110 PND la GPx se incrementa con respecto a 19 dG, 21 y 36 PND, sin observarse cambios a los 450 y 850 PND. La misma tendencia se observó en el grupo R, sólo que la actividad de GPx fue significativamente mayor a los 450 PND en comparación con las otras edades evaluadas, sin observarse cambios a los 850 PND (Fig. 10B).

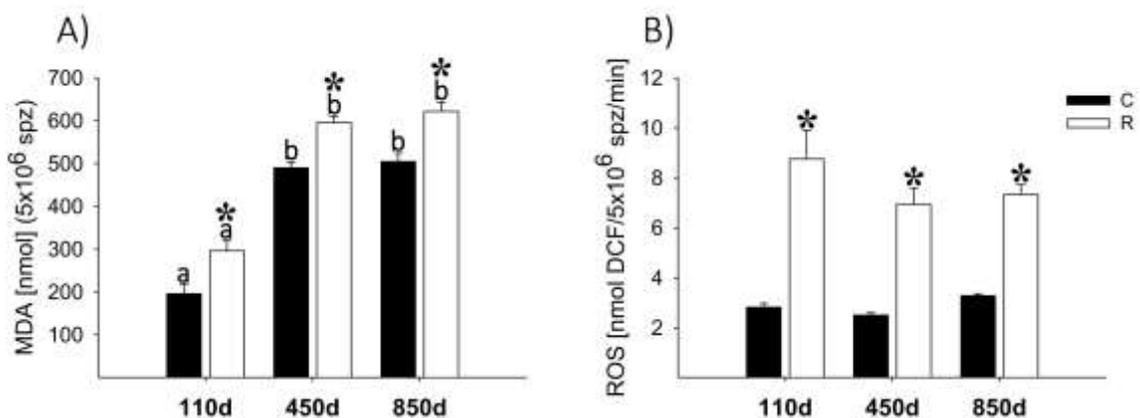


**Figura 10.** Actividad de enzimas antioxidantes en el testículo. A) SOD y B) GPx. Media  $\pm$  EE,  $n=8$  camadas ( $\sim 48$  machos fetales) a los 19 dG y  $n=6$  ratas de diferente camada para el resto de las edades postnatales.  $P < 0.05$  para letras diferentes en el mismo grupo, pero a diferentes edades y \* vs C a la misma edad. dG= días de gestación y d= días postnatales. Control (C) y restringido (R).

## 6. Biomarcadores de estrés oxidante y actividad de las enzimas antioxidantes en los espermatozoides.

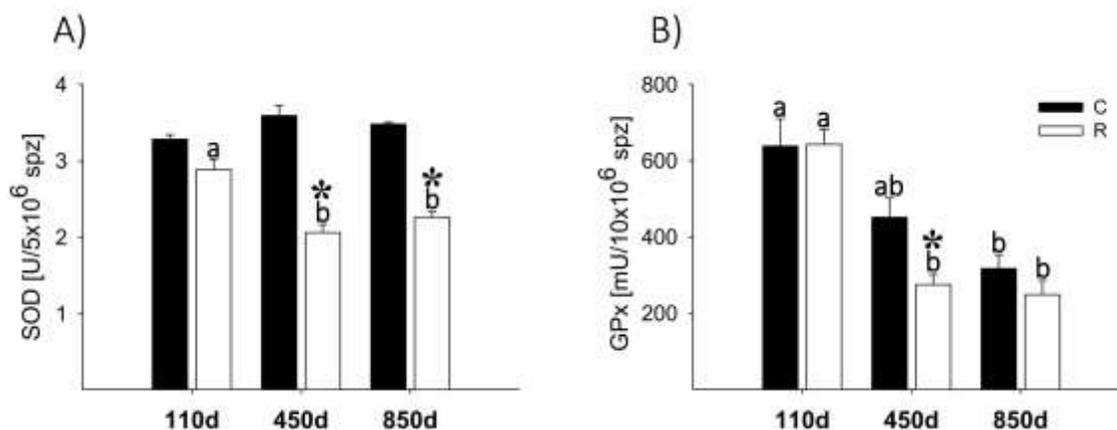
*El consumo materno de una dieta baja en proteína durante la gestación incrementa en los testículos de las crías (edad adulta) las concentraciones de MDA y ROS y disminuye la actividad SOD y GPx.*

Las concentraciones de MDA y ROS fueron significativamente mayores en los espermatozoides de las crías del grupo R con respecto al C (Fig. 11A y 11B).



**Figura 11.** Biomarcadores de estrés oxidante en los espermatozoides. A) MDA y B) ROS. Media  $\pm$  EE,  $n=6$  ratas de diferente camada a las 3 edades postnatales.  $P < 0.05$  para letras diferentes en el mismo grupo, pero a diferentes edades y \* vs C a la misma edad. d= días postnatales. Control (C) y restringido (R).

La actividad de SOD fue menor en los espermatozoides del grupo R a los 450 y 850 PND, mientras que la actividad de la GPx fue menor únicamente a los 450 PND (Fig. 12A y 12B).



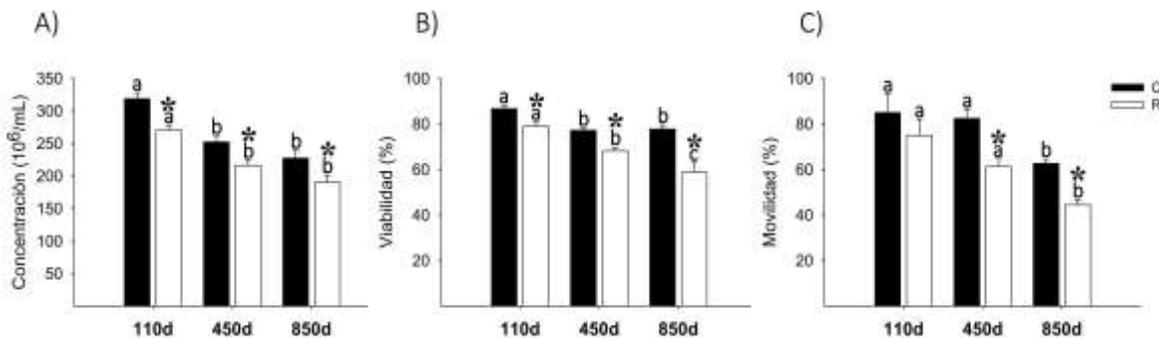
**Figura 12.** Actividad de las enzimas antioxidantes en los espermatozoides. A) MDA y B) ROS. Media  $\pm$  EE, n=6 ratas de diferente camada a las 3 edades postnatales.  $P < 0.05$  para letras diferentes en el mismo grupo, pero a diferentes edades y \* vs C a la misma edad. d= días postnatales. Control (C) y restringido (R).

Cuando los biomarcadores de estrés oxidante en los espermatozoides se analizaron entre el mismo grupo por edad, encontramos que tanto en el grupo C como en el R, el MDA se incrementa a los 450 PND sin observarse cambios a los 850 PND (Fig. 11A). Para ambos grupos, las concentraciones de ROS fueron similares a las tres edades evaluadas (Fig. 11B). En el grupo R, la actividad de SOD disminuyó a los 450 PND sin observarse cambios a los 850 PND (Fig. 12A), sin observarse cambios en el grupo C. Con respecto a 110 PND, la actividad de GPx disminuye a los 450 PND en el grupo R; mientras que, en el grupo C hasta los 850 PND (Fig. 12B).

## 7. Calidad espermática.

*El consumo materno de una dieta baja en proteína durante la gestación disminuye en los espermatozoides de las crías (edad adulta) su concentración, viabilidad, movilidad e incrementa las anomalías espermáticas.*

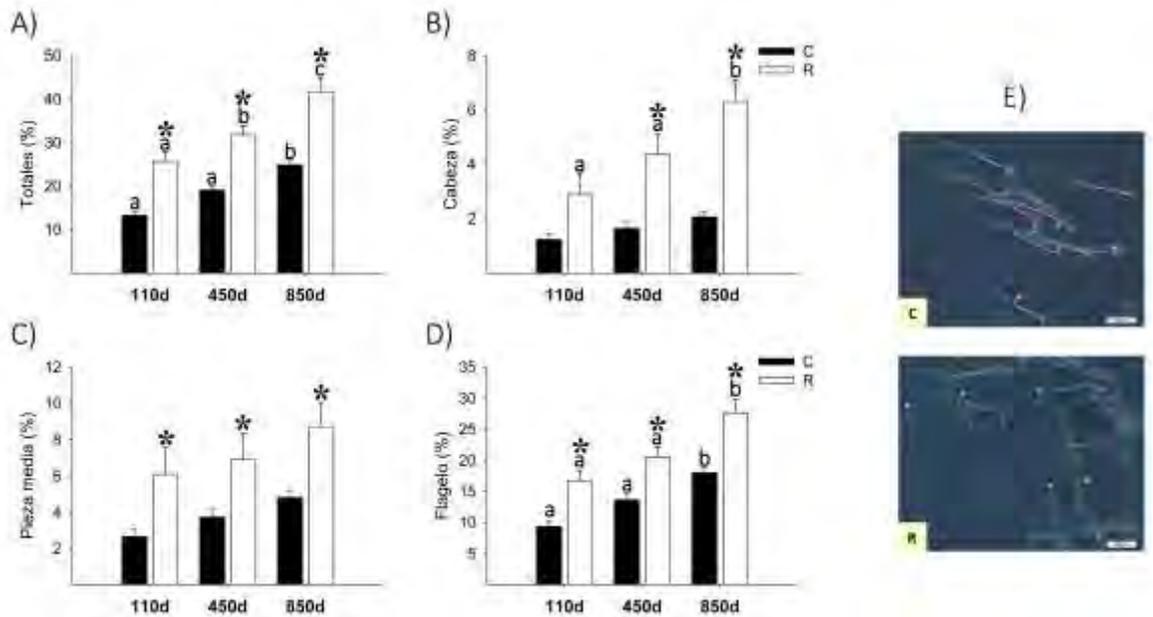
La calidad espermática evaluada por concentración, viabilidad y movilidad reveló una significativa disminución en el grupo R tanto en la concentración como en viabilidad a las tres edades evaluadas (Fig. 13A y 13B); mientras que la movilidad fue menor en el grupo R a los 450 y 850 PND (Fig. 13C). Al analizar la calidad espermática entre el mismo grupo por edad encontramos que en ambos grupos la concentración y la viabilidad disminuye a los 450 PND sin observarse cambios a los 850 PND (Fig. 13A y 13B). Con respecto a la movilidad, en el grupo C esta disminuye hasta los 850 PND, mientras que en grupo R la disminución ocurre a los 450 PND (Fig. 13C).



**Figura 13.** Calidad espermática. A) concentración, B) viabilidad y C) movilidad. Media  $\pm$  EE,  $n=6$  ratas de diferente camada a las 3 edades postnatales.  $P<0.05$  para letras diferentes en el mismo grupo, pero a diferentes edades y \* vs C a la misma edad. d= días postnatales. Control (C) y restringido (R).

El análisis de la morfología espermática mostró que, a las tres edades evaluadas, el grupo R presentó mayor número de anomalías espermáticas con respecto a C, particularmente en la pieza media y flagelo (Fig. 14A, 14C, 14D y 14E), mientras que los defectos en cabeza se incrementaron en el grupo R fue mayor a los 450 y 850 PND (Fig. 14B). El análisis de las anomalías espermáticas entre el mismo grupo por edad encontramos que en el grupo C el número de

anormalidades se incrementó hasta los 850 PND, observándose principalmente alteraciones en el flagelo; mientras que en el grupo R las alteraciones en la morfología de la cabeza y flagelo de los espermatozoides se incrementaron con la edad (Fig. 14A, 14B, 14C y 14D).



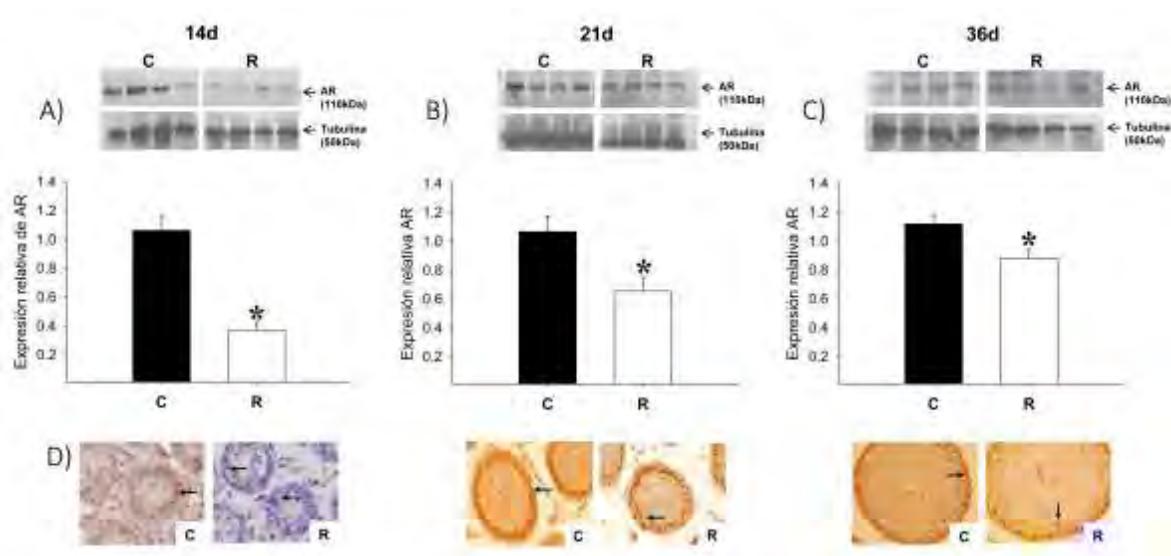
**Figura 14.** % de anomalías espermáticas. A) totales, B) cabeza, C) pieza media y D) flagelo. Media  $\pm$  EE, n=6 ratas de diferente camada a las 3 edades postnatales.  $P < 0.05$  para letras diferentes en el mismo grupo, pero a diferentes edades y \* vs C a la misma edad. d= días postnatales. Control (C) y restringido (R).

## 8. Expresión del AR y células germinales.

**El consumo materno de una dieta baja en proteína durante la gestación disminuye en el testículo de las crías prepuberales la expresión del AR, así como el número de células de Sertoli y células germinales.**

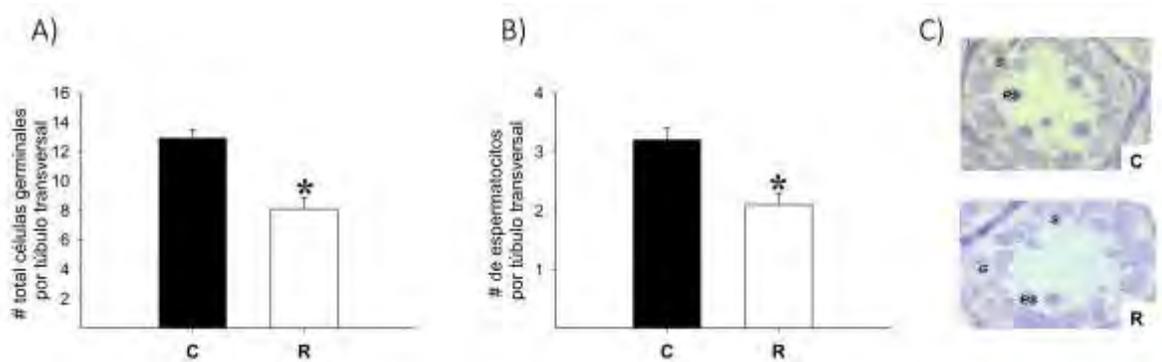
El análisis de la expresión relativa del AR realizado por Western blot demostró que, a las tres edades evaluadas, los testículos del grupo R presentaron menor expresión del AR con respecto a C (Fig. 15A, 15B y 15C). Con respecto al análisis observado por inmunohistoquímica encontramos que a los 14 PND, todas las células de Sertoli del grupo C fueron positivas al AR, mientras que en el grupo R,

únicamente algunas células de Sertoli fueron positivas al AR (Fig 15A-C). Para los 21 y 36 PND las células de Sertoli de ambos grupos expresaban el AR; sin embargo, la señal fue menor en los citoplasmas del grupo R (Fig. 15B-C, 15B-R, 15C-C y 15C-R). El análisis por IHQ, también nos permitió evaluar la localización de las células de Sertoli que se relaciona con su proceso de maduración. Similar a lo observado a los 14 PND, tanto a los 21 como a los 36 PND, la unión de las células de Sertoli no estaba del todo establecida y no todas estaban localizadas cerca de la membrana (Fig. 15A-R, 15B-R y 15C-R). A los 21 PND, el número de células de Sertoli fue menor en el grupo R con respecto al control (C:  $43.4 \pm 0.8$ , R:  $35.9 \pm 0.5^*$  células por túbulos transversal;  $n=6$ ,  $p<0.05$ ).



**Figura 15.** Expresión del AR a los 14, 21 y 36 PND por Western blot (A-C). Laminilla representativa del AR por IHQ (D) 40X. La flecha continua muestra un ejemplo de una célula de Sertoli positiva al AR y la discontinua una célula de Sertoli negativa al AR. Media  $\pm$  EE,  $n=4$  ratas de diferente camada.  $P<0.05$  \* vs C. Control (C) y restringido (R).

A los 14 PND, tanto el número de células germinales totales como el número de espermatocitos por túbulo seminífero, fue menor en las machos del grupo R en comparación con C (Fig. 16A y 16B).

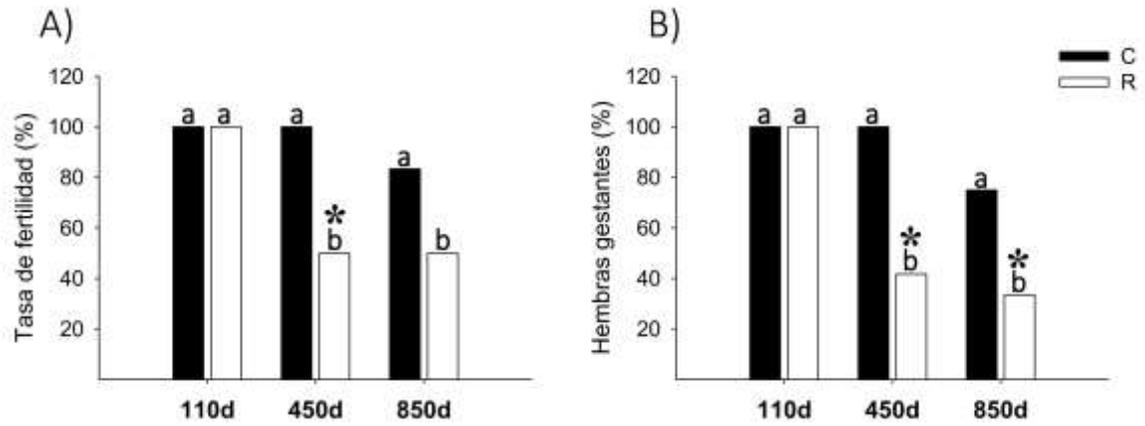


**Figura 16.** Número de células germinales a los 14 PND (A-B) Fotografías representativas de un túbulo transversal (C) 100X. S, célula de Sertoli; G, gonocito; PS, espermatoцитo primario. Media  $\pm$  EE, n=5 ratas de diferente camada.  $P < 0.05$  \* vs C. Control (C) y restringido (R).

## 9. Tasa de fertilidad.

***El consumo materno de una dieta baja en proteína durante la gestación disminuye la fertilidad y conlleva al envejecimiento prematuro de la función reproductiva.***

La tasa de fertilidad reportada como el porcentaje de machos fértiles (Fig. 17A) y el porcentaje de hembras gestantes (Fig. 17B) fue similar en ambos grupos a los 110 PND; sin embargo, a los 450 PND la fertilidad disminuyó en términos de machos fértiles (Fig. 17A y 17B) y a los 850 PND al ser expresada en el porcentaje de hembras gestantes (Fig. 17B). En el grupo C, la fertilidad no se vio alterada por la edad, sin embargo, en el grupo R la disminución en la tasa de fertilidad se debió no sólo a la dieta materna, sino también a la edad de las crías macho (Fig. 17).



**Figura 17.** Tasa de fertilidad. A) % machos fértiles y B) % de hembras gestantes. Media  $\pm$  EE,  $n=6$  ratas de diferente camada.  $\chi^2$ .  $P<0.05$  para letras diferentes en el mismo grupo, pero a diferentes edades y \* vs C a la misma edad. d= días postnatales. Control (C) y restringido (R).

# X. DISCUSIÓN

## X. DISCUSIÓN

En los últimos años, un gran número de estudios epidemiológicos [158-160] y con animales de experimentación [2, 161, 162] han demostrado que la exposición a condiciones subóptimas *in utero* o durante la vida neonatal pueden inducir respuestas permanentes en una gran variedad de órganos, lo cual predispone a una mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades durante la vida adulta tales como diabetes tipo 2 [163], hipertensión [164], obesidad [165], problemas conductuales [5, 166] y alteraciones de la función reproductiva [165]. En el presente trabajo reportamos que la restricción en el consumo de proteína en la dieta materna durante la gestación incrementa desde etapas tempranas el estrés oxidante en el testículo, disminuye la calidad espermática y conlleva al envejecimiento prematuro de la función reproductiva en la vida adulta. También se observó que en la etapa prepuberal existe retraso en el proceso de maduración de las células de Sertoli y disminución tanto en el número de células de Sertoli como en el número de células germinales.

Los primeros eventos de la vida intrauterina desencadenan procesos que preparan al individuo para las circunstancias que se prevén en el entorno postnatal [167, 168]. Sin embargo, si el ambiente intrauterino y postnatal difieren marcadamente, esto puede dar lugar a fenotipos mal adaptados en la edad adulta [167]. En diversos estudios, hemos reportado que las crías macho provenientes de madres alimentadas con una dieta baja en proteína durante la gestación, pero que son alimentados con dieta control después del destete, presentan incremento en el peso corporal, triglicéridos, leptina e insulina, así como resistencia a la insulina [169-171].

En el presente estudio, las crías del grupo R fueron más pesadas que el grupo C y tuvieron mayor acumulación de grasa epididimal y aunque no se reporta en este trabajo también presentaron mayor índice de adiposidad, lo que demuestra la consistencia del modelo utilizado. La grasa abdominal no sólo se asocia con desordenes metabólicos [172] sino también con la disminución en las

concentraciones de testosterona [173] cuya secreción depende de la función adecuada del eje hipotálamo – hipófisis – gonada [174]. En el presente estudio, las concentraciones de LH y testosterona se encontraron disminuidas en el grupo R lo cual es más pronunciado con el envejecimiento. Esta disminución puede deberse a un fallo testicular primario o secundario [175], a la mayor ganancia de peso que presentó el grupo R durante la vida adulta o al desequilibrio entre la producción de ROS y las enzimas antioxidantes [176].

Algunos estudios han reportado los efectos de ROS sobre la esteroidogénesis. Por ejemplo, en células MA-10 (células de Leydig tumorales) se ha visto que la producción de testosterona se inhibe por altas concentraciones de ROS [177]. En ratones, se ha reportado que una sola inyección de lipopolisacáridos (componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas), ocasionó disminución en las concentraciones en suero de testosterona, aumento en la lipoperoxidación en las células de Leydig, menor expresión de la proteína StAR y 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta$ -5-4 isomerasa (cataliza la conversión de la pregnenolona a progesterona), así como reducción en el potencial de su membrana mitocondrial (fundamental para mantener la función fisiológica de la cadena respiratoria para generar ATP) mediada por las ROS [178].

Estudios con animales han reportado que varias condiciones perinatales [179, 180] tales como la malnutrición o la obesidad materna o la exposición a glucocorticoides [181] incrementan el estrés oxidante [3, 182, 183]. Tarry-Adkins y col., 2010, han reportado que la desnutrición materna utilizando una dieta baja en proteína (8%), similar a la que nosotros utilizamos, se asocia con incremento en el estrés oxidante y deterioro de la función de las enzimas antioxidantes en el páncreas de las crías macho de 3 y 15 meses de edad [184]. Por ejemplo, en nuestro grupo de trabajo hemos reportado que el consumo de una dieta baja en proteína ocasionó que las madres gestantes tuvieran mayor estrés oxidante y alteraciones metabólicas; que las placentas e hígados de los machos fetales presentaran daño oxidativo; y que las crías en la edad adulta exhibieran altas

concentraciones de ROS, leptina, insulina, triglicéridos; sin embargo, el consumo de resveratrol materno durante la gestación previno en tanto en las madres como en las crías las alteraciones metabólicas y el incremento del estrés oxidante [185]. Lo que sugiere que existe un vínculo entre el insulto intrauterino y el incremento en el estrés oxidante.

Es importante mencionar que la exposición fetal a altas concentraciones de corticosterona materna, afectan adversamente en la descendencia la función hipófisis – gonada e hipófisis – adrenal. Estudios en ratas han reportado que la sobreexposición a glucocorticoides durante el desarrollo disminuye en la vida adulta comportamientos tales como la frecuencia de la cópula y la eyaculación [186]; y que la actividad sexual masculina disminuye debido a la exposición a estrés prenatal [187]. En estudios previos hemos reportado que, a los 19 dG los fetos de madres alimentadas con una dieta baja en proteína durante la gestación están expuestos a altas concentraciones de corticosterona [185] lo cual pudo afectar la fertilidad en la vida adulta de las crías macho.

La fertilidad masculina depende de un proceso altamente dinámico denominado espermatogénesis [188], donde las células germinales generan una gran cantidad de ROS como subproductos del metabolismo celular [189]. Si bien, una cierta cantidad de ROS es esencial para las funciones celulares normales, como la señalización celular, la homeostasis y procesos tales como la capacitación que permite al espermatozoide fertilizar el ovocito, la acumulación excesiva de ROS es tóxica para las células germinales debido a que ocasiona daños en las proteínas, ADN e incrementa la apoptosis [190, 191], lo cual puede dañar el proceso de espermatogénesis [192]. [193-195]. También, el aumento en la temperatura escrotal puede afectar la espermatogénesis e incrementar el estrés oxidante, inducido principalmente por las ROS provenientes de las mitocondrias [189]. En el presente estudio, encontramos que el estrés oxidante (MDA y ROS) se incrementa en los testículos del grupo R durante la edad adulta, lo cual puede deberse al incremento de la temperatura escrotal ocasionado por la mayor acumulación de

grasa epididimal. Para mantener los niveles fisiológicos de ROS, todos los tejidos incluyendo los reproductivos poseen diferentes enzimas antioxidantes que trabajan en sinergia para reducir los efectos citotóxicos de los radicales libres [196]. Nuestros resultados demuestran que en la vida adulta se incrementa la actividad enzimática de SOD y GPx además del incremento de los marcadores de estrés oxidante. Esta desregulación en el equilibrio redox puede tener efectos nocivos en las células germinales y los espermatozoides [197].

Los espermatozoides son especialmente susceptibles a ROS debido a que carecen de las enzimas antioxidantes citoplasmáticas y tiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados [198]. El estrés oxidante en los espermatozoides puede incrementar el daño al ADN y afectar la calidad espermática [176] lo cual puede ser usado como un índice de fertilidad [192]. En este contexto, nosotros encontramos que las crías machos del grupo R presentan incremento en el estrés oxidante, menor calidad espermática y alteraciones de la fertilidad. Las alteraciones morfológicas observadas en los espermatozoides a los 110 días postnatales pueden deberse a los efectos citotóxicos del estrés oxidante debido a la restricción proteínica materna, particularmente porque a esta edad se encontró un incremento significativo en las concentraciones de ROS y MDA en los testículos y espermatozoides.

Es importante mencionar que en la rata las primeras dos semanas de vida postnatal son cruciales para el inicio de la espermatogénesis. En el tercer día postnatal 7.5% de los gonocitos proliferan y migran hacia la membrana basal. Su adecuada proliferación y migración asegura que estos se conviertan en espermatogonias tipo A, si por alguna razón este proceso no se lleva a cabo en el tiempo adecuado los gonocitos degeneran y mueren [61]. En datos preliminares de nuestro laboratorio muestran que este proceso se ve retrasado en las crías provenientes de madres restringidas durante la gestación. Nuestros resultados demuestran que, a los 14 días postnatales tanto el número de células germinales como el número de espermatozoides se encuentra disminuido en el grupo

R, lo cual pudo ser resultado de alteraciones en el proceso de proliferación y migración de los gonocitos. Por otro lado, las células de Sertoli desempeñan un papel importante en el desarrollo y función testicular, por lo que es de suma importancia su periodo de proliferación el cual comienza durante el periodo fetal y termina 2 semanas después del nacimiento [15], el cese de la proliferación implica la maduración de las células de Sertoli, cuya función principal es generar un entorno adecuado para la proliferación y maduración de las células germinales; por lo que cambios en el número, estructura y/o función de este tipo celular puede afectar el desarrollo de las células germinales y comprometer la espermatogénesis [13]. Un parámetro indicativo del proceso de diferenciación de la célula de Sertoli es la formación de la luz tubular e incremento en la expresión del receptor de andrógenos [68]. En el grupo R existe retraso en el proceso de la formación de la luz tubular [199] menor expresión del AR lo cual repercutió en la etapa de proliferación de las células de Sertoli, ya que a los 21 días este grupo presentó menor número células de Sertoli, lo que resultó en una menor producción de espermatozoides en la vida adulta.

Existe evidencia que indica que la fertilidad se puede ver afectada a través de diferentes mecanismos tales como disminución en la secreción de hormonas sexuales [200, 201], hiperinsulinemia o por a la acción directa de la leptina en la función testicular [201] ya que el el receptor de leptina se ha localizado en las células de Leydig, en las células germinales así como en la membrana plasmática del espermatozoide [96]. Por lo que en el presente trabajo se propone que, además de la disminución de las hormonas sexuales y del incremento en el índice de adiposidad y estrés oxidante, las altas concentraciones de triglicéridos, insulina y leptina que presenta el grupo R durante la vida adulta [6, 202], también tienen un papel importante en las alteraciones de la fertilidad. El síndrome metabólico es un trastorno complejo que incluye la presencia de varios factores fisiopatológicos tales como obesidad, hipertensión, dislipidemia, hiperglicemia/resistencia a la insulina y disfunción endotelial. Estos problemas pueden promover la disfunción eréctil e infertilidad [203]. La testosterona desempeña un papel importante no sólo

en la salud sexual masculina sino también en el mantenimiento de la masa muscular y ósea, en la eritropoyesis e incluso en el metabolismo de los lípidos y glucosa [204]. Hay reportes que indican que bajas concentraciones de testosterona se asocian con la prevalencia del síndrome metabólico [205]. En los varones, algunas de las características del síndrome metabólico que pueden contribuir al hipogonadismo son la inflamación, las altas concentraciones de estrógenos y leptina así como la mayor actividad de la aromatasa en la grasa visceral [203].

Durante varias décadas, la edad paterna ha sido pasada por alto, pero en la actualidad se ha reconocido el impacto negativo que tiene sobre la fertilidad y su progenie. Con base en la literatura, las edades más grandes reportadas en estudios de desarrollo sexual y fertilidad es de 720 días postnatales para el grupo control [206], y 270 días postnatales para las crías macho expuestas a restricción proteínica materna durante la gestación [7]. Por lo que, el presente trabajo permitió estudiar a largo plazo (110, 450 y 850 PND) el proceso normal de envejecimiento en la capacidad reproductiva de las crías macho y como el consumo de una dieta baja en proteína durante la gestación afecta este proceso.

Las hormonas desempeñan un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de las funciones reproductivas [207]. En los humanos y los roedores, el envejecimiento reproductivo se asocia con la disminución en las concentraciones de testosterona [208]. Bonavera y col., 1997, reportaron que, en las ratas macho las concentraciones de testosterona disminuyen con la edad con una concomitante reducción en la secreción pulsátil de LH [175], lo cual podría ser secundario a una disfunción hipotálamo – hipofisaria [209]. Nuestros hallazgos concuerdan con lo previamente publicado ya que en el presente trabajo observamos que, en las crías macho, las concentraciones de LH disminuyen con el envejecimiento. La disminución de LH, tiene consecuencias importantes sobre las funciones del testículo y puede ser la causa de la menor concentración de testosterona en la vida adulta.

En estudios previos, hemos reportado que en la rata la restricción proteínica durante la gestación disminuye en las crías macho a los 70 días postnatales las concentraciones de LH y testosterona, sin cambios en FSH y tasa de fertilidad [7]. En el presente trabajo, se observó que, si bien las concentraciones de testosterona disminuyen con la edad, el consumo de una dieta baja en proteína exacerba en las crías del grupo R esta disminución. Estudios realizados por Zirkin y col., 2001, han demostrado que las concentraciones de ROS aumentan en los testículos de ratas viejas y que este incremento se asocia con la disminución en la expresión de la StAR, de la P450scc y la esteroidogénesis [210].

El envejecimiento se correlaciona con el aumento del estrés oxidativo en todos los órganos vitales, incluyendo los testículos [211]. Robaire y cols. 2015, analizaron espermatozoides y espermátidas aisladas de testículos de ratas jóvenes (4 meses) y viejas (18 meses) y encontraron que las células germinales aisladas de ratas jóvenes sobreviven en cultivo durante periodos más largos y que los espermatozoides aislados de animales viejos presentaron altas concentraciones de ROS y mayor daño al ADN [188]. Los mecanismos de defensa antioxidante en el testículo protegen contra el daño oxidante a las estirpes celulares testiculares y a los espermatozoides. Vazquez-Memije y col., han reportado que la generación de ROS se incrementa y la capacidad del sistema antioxidante disminuye en la edad adulta y en edades más avanzadas [212]. En el caso de los testículos del grupo C, observamos que a los 110 días postnatales la actividad de SOD disminuye con la edad mientras que la actividad de GPx aumenta. Por otro lado, el aumento observado en el grupo R en la actividad de las enzimas antioxidantes por encima del grupo C puede deberse a una posible compensación debido al gran incremento en ROS y MDA en los testículos del grupo R. En los testículos de rata, la GPx es diez veces más activa que en el hígado, riñón o pulmones [211].

Existe evidencia que indica que a medida que los hombres envejecen, la calidad de sus células germinales se deteriora y disminuye la fertilidad [213, 214]. Se ha reportado que en el momento en que un hombre llega a los 38 años, los

espermatozoides que produce muestran en promedio tres veces más daño al ADN que los de un hombre más joven [215]. El envejecimiento está asociado con alteraciones en la morfología y movilidad espermática [216], incremento en el estrés oxidante y reducción en la actividad de las enzimas antioxidantes [217]. En el presente estudio encontramos que a las tres edades evaluadas las crías del grupo R exacerba la disminución de la calidad espermática y la incidencia de anomalías espermáticas.

A pesar de que en el presente estudio a los 110 PND las crías macho del grupo R ya presentaban alteraciones metabólicas así como incremento en el estrés oxidante en los testículos y espermatozoides, la tasa de fertilidad fue similar entre el grupo C y R, sin embargo, a los 270 PND (estudio previo), la fertilidad disminuyó al 50% en el grupo R [7], lo que indica envejecimiento prematuro de la función reproductiva.

Del presente trabajo de tesis no sólo es importante resaltar que la desnutrición materna programa a la descendencia a presentar alteraciones en la capacidad reproductiva, ya que quizá para un hombre de 60 años, su prioridad no es tener hijos; sino que la desnutrición materna incrementa desde etapas tempranas (adultos jóvenes) el estrés oxidante en los espermatozoides, lo cual puede tener un efecto biológico ya que estos espermatozoides pueden programar al desarrollo de enfermedades en la siguiente generación vía la línea germinal paterna, la cual es un área que requiere mayor investigación.

Existe un creciente reconocimiento de que la salud y la edad paterna al momento de la concepción puede tener un impacto en la salud de sus descendientes. Se ha sugerido que el estrés oxidante influye en la estructura de la cromatina y en la metilación del ADN. Las alteraciones de la cromatina median una serie de cambios celulares incluyendo, la modulación la expresión génica, la muerte y supervivencia celular, los cuales son mecanismos de programación de enfermedades [218]. Estudios con animales de experimentación resaltan que las crías provenientes de

espermatozoides expuestos a altas concentraciones de ROS, se vuelven intolerantes a la glucosa e incrementan el acumulo de tejido adiposo. Los autores especulan que el fenotipo observado en la descendencia se debió a que el estrés oxidante alteró los patrones de metilación en los espermatozoides [219]. De tal forma que el daño oxidante en el espermatozoide no sólo compromete la función reproductiva, sino que impacta negativamente el desarrollo de la descendencia.

Una de las características más importantes de la programación del desarrollo es la evidencia de que los efectos adversos de la exposición a un ambiente intrauterino inadecuado son heredados de manera transgeneracional [55, 202, 220], por mecanismos que no involucran cambios genéticos sino la expresión alterada de genes (epigenética). Para obtener el fenotipo transgeneracional es necesaria la exposición directa a la condición negativa durante la vida fetal o neonatal; de tal forma que el fenotipo fisiológico o enfermedad es transmitido a través de la línea germinal a las siguientes generaciones, sin que estas hayan sido expuestas directamente al factor ambiental.

La expresión de un gen puede ser modificada por factores ambientales a través de cambios en las proteínas que se unen al ADN, siendo más afectadas las regiones terminales de las histonas, las cuales pueden ser modificadas por acetilación, metilación, fosforilación, glicosilación. Las modificaciones más comunes son la acetilación y metilación de los residuos de lisina en las histonas H3 y H4. El incremento o disminución de la acetilación induce a la activación o represión de la transcripción respectivamente [218]. Otra clase de regulación epigenética es la metilación de residuos de citosina presentes en dinucleótidos citosina-guanosina (CpG), a través de una reacción que transfiere un grupo metilo desde el dador S-adenosil-L-metionina a la posición 5' del anillo de citosina. Esta reacción es catalizada por un grupo de enzimas denominadas metiltransferasas de ADN (DNMT) compuestas por 2 familias DNMT1 y DNMT3 (3a y 3b) [221]. En casi todos los casos la metilación del ADN representa un marcador de silenciamiento de genes a largo plazo [222].

Es bien aceptado que las condiciones intrauterinas como la desnutrición o la sobrealimentación materna puede conducir a modificaciones epigenéticas, las cuales pueden ser transmitidas a las siguientes generaciones [223]. En nuestro grupo hemos reportado que la restricción proteínica materna afecta la conducta exploratoria de la segunda generación proveniente de la línea paterna y que los efectos varían de acuerdo al sexo y al periodo de desnutrición [55]. Los cambios en la metilación del ADN inducido por el consumo de una dieta baja en proteína son un posible mecanismo de transmisión de este fenotipo [223].

Finalmente, el envejecimiento es el resultado de los daños causados por el acumulamiento por especies reactivas de oxígeno, lo que conduce a la disminución progresiva de las funciones fisiológicas [224]. Nuestro estudio proporciona evidencia por primera vez que la tasa de envejecimiento de la función reproductiva masculina está programada durante el desarrollo como lo demuestran cuatro claras observaciones en las crías del grupo R: 1) disminución en las concentraciones de testosterona en la vida adulta, 2) incremento en el estrés oxidante testicular desde etapas tempranas, 3) alteraciones metabólicas y 4) disminución temprana de la fertilidad. Todos estos puntos son marcadores de envejecimiento de la función reproductiva y probablemente quedaron programadas desde etapas tempranas del desarrollo. Nuestros datos son consistentes con el concepto novedoso que la programación juega un papel importante en la trayectoria del envejecimiento. Sin embargo, esta interacción es un área poco estudiada en la biología del envejecimiento que requiere más investigación.

# XI. CONCLUSIÓN

## **XI. CONCLUSIÓN**

El consumo materno de una dieta baja en proteína durante la gestación ocasiona que las crías macho presenten disminución en el número de células germinales, células de Sertoli, en las concentraciones de testosterona, incremento en el estrés oxidante tanto en los testículos como en los espermatozoides, así como deterioro de la calidad espermática. Estas alteraciones observadas ya sea durante la vida fetal, etapa prepuberal y/o edad adulta posiblemente conllevaron al deterioro de la función reproductiva de las crías macho en la edad adulta. Nuestros datos sugieren que la programación del desarrollo como consecuencia de la desnutrición materna juega un papel importante en la trayectoria del envejecimiento de la función reproductiva.

## XII. REFERENCIAS

## XII. REFERENCIAS

1. Allen, L.H., *Global dietary patterns and diets in childhood: implications for health outcomes*. Ann Nutr Metab, 2012. **61 Suppl 1**: p. 29-37.
2. McMullen, S. and A. Mostyn, *Animal models for the study of the developmental origins of health and disease*. Proc Nutr Soc, 2009. **68**(3): p. 306-20.
3. Zambrano, E. and P.W. Nathanielsz, *Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies*. Nutr Rev, 2013. **71 Suppl 1**: p. S42-54.
4. Aerts, L. and F.A. Van Assche, *Intra-uterine transmission of disease*. Placenta, 2003. **24**(10): p. 905-11.
5. Reyes-Castro, L.A., et al., *Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats*. Behav Brain Res, 2012. **227**(2): p. 324-9.
6. Zambrano, E., 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*. J Physiol, 2006. **571**(Pt 1): p. 221-30.
7. Zambrano, E., et al., *A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development*. J Physiol, 2005. **563**(Pt 1): p. 275-84.
8. Nakae, J., Y. Kido, and D. Accili, *Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors*. Endocr Rev, 2001. **22**(6): p. 818-35.
9. Hiort, O., *The differential role of androgens in early human sex development*. BMC Med, 2013. **11**: p. 152.
10. Forhead, A.J. and A.L. Fowden, *The hungry fetus? Role of leptin as a nutritional signal before birth*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 6): p. 1145-52.
11. Newnham, J.P. and T.J. Moss, *Antenatal glucocorticoids and growth: single versus multiple doses in animal and human studies*. Semin Neonatol, 2001. **6**(4): p. 285-92.

12. Reinisch, J.M., et al., *Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth*. Science, 1978. **202**(4366): p. 436-8.
13. Nyirenda, M.J., et al., *Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring*. J Clin Invest, 1998. **101**(10): p. 2174-81.
14. Sloboda, D.M., J.P. Newnham, and J.R. Challis, *Repeated maternal glucocorticoid administration and the developing liver in fetal sheep*. J Endocrinol, 2002. **175**(2): p. 535-43.
15. Drake, A.J., B.R. Walker, and J.R. Seckl, *Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(1): p. R34-8.
16. Fowden, A.L. and A.J. Forhead, *Endocrine mechanisms of intrauterine programming*. Reproduction, 2004. **127**(5): p. 515-26.
17. Bispham, J., et al., *Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development*. Endocrinology, 2003. **144**(8): p. 3575-85.
18. Holemans, K., et al., *Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus*. Am J Obstet Gynecol, 2004. **190**(3): p. 858-65.
19. Abi Salloum, B., et al., *Developmental programming: exposure to testosterone excess disrupts steroidal and metabolic environment in pregnant sheep*. Endocrinology, 2015. **156**(6): p. 2323-37.
20. Barrett, E.S. and S.H. Swan, *Stress and Androgen Activity During Fetal Development*. Endocrinology, 2015. **156**(10): p. 3435-41.
21. Pasquali, R. and A. Gambineri, *Insulin-sensitizing agents in polycystic ovary syndrome*. Eur J Endocrinol, 2006. **154**(6): p. 763-75.
22. Corbould, A., *Effects of androgens on insulin action in women: is androgen excess a component of female metabolic syndrome?* Diabetes Metab Res Rev, 2008. **24**(7): p. 520-32.

23. Lane, R.H., *Fetal programming, epigenetics, and adult onset disease*. Clin Perinatol, 2014. **41**(4): p. 815-31.
24. Perera, F. and J. Herbstman, *Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease*. Reprod Toxicol, 2011. **31**(3): p. 363-73.
25. Bouchard, L., et al., *Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy*. Diabetes Care, 2010. **33**(11): p. 2436-41.
26. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
27. Jansson, T. and T.L. Powell, *Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches*. Clin Sci (Lond), 2007. **113**(1): p. 1-13.
28. Luo, Z.C., L. Xiao, and A.M. Nuyt, *Mechanisms of developmental programming of the metabolic syndrome and related disorders*. World J Diabetes, 2010. **1**(3): p. 89-98.
29. Ong, T.P. and S.E. Ozanne, *Developmental programming of type 2 diabetes: early nutrition and epigenetic mechanisms*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2015. **18**(4): p. 354-60.
30. Blackmore, H.L. and S.E. Ozanne, *Programming of cardiovascular disease across the life-course*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **83**: p. 122-30.
31. Davies, M.J. and R.J. Norman, *Programming and reproductive functioning*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(9): p. 386-92.
32. Ibanez, L., et al., *Low-birth weight children develop lower sex hormone binding globulin and higher dehydroepiandrosterone sulfate levels and aggravate their visceral adiposity and hypoadiponectinemia between six and eight years of age*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(10): p. 3696-9.
33. Boisen, K.A., et al., *Are male reproductive disorders a common entity? The testicular dysgenesis syndrome*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **948**: p. 90-9.
34. Cicognani, A., et al., *Low birth weight for gestational age and subsequent male gonadal function*. J Pediatr, 2002. **141**(3): p. 376-9.

35. Vanbillemont, G., et al., *Birth weight in relation to sex steroid status and body composition in young healthy male siblings*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(4): p. 1587-94.
36. Yarde, F., et al., *Prenatal famine, birthweight, reproductive performance and age at menopause: the Dutch hunger winter families study*. Hum Reprod, 2013. **28**(12): p. 3328-36.
37. Zambrano, E., et al., *Maternal Obesity: Lifelong Metabolic Outcomes for Offspring from Poor Developmental Trajectories During the Perinatal Period*. Arch Med Res, 2016. **47**(1): p. 1-12.
38. Pedrana, G., et al., *Effects of pre-natal glucocorticoids on testicular development in sheep*. Anat Histol Embryol, 2008. **37**(5): p. 352-8.
39. Page, K.C., C.M. Sottas, and M.P. Hardy, *Prenatal exposure to dexamethasone alters Leydig cell steroidogenic capacity in immature and adult rats*. J Androl, 2001. **22**(6): p. 973-80.
40. Piffer, R.C., et al., *Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone*. Reprod Fertil Dev, 2009. **21**(5): p. 634-9.
41. Recabarren, S.E., et al., *Prenatal testosterone excess reduces sperm count and motility*. Endocrinology, 2008. **149**(12): p. 6444-8.
42. Dela Cruz, C. and O.C. Pereira, *Prenatal testosterone supplementation alters puberty onset, aggressive behavior, and partner preference in adult male rats*. J Physiol Sci, 2012. **62**(2): p. 123-31.
43. Goyal, H.O., et al., *Estrogen-induced abnormal accumulation of fat cells in the rat penis and associated loss of fertility depends upon estrogen exposure during critical period of penile development*. Toxicol Sci, 2005. **87**(1): p. 242-54.
44. Goyal, H.O., et al., *Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood*. Biol Reprod, 2003. **68**(6): p. 2081-91.
45. Kotsampasi, B., et al., *Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero*. Anim Reprod Sci, 2009. **114**(1-3): p. 135-47.

46. Rae, M.T., et al., *Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses*. *Reproduction*, 2002. **124**(1): p. 33-9.
47. Leonhardt, M., et al., *Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty*. *Biol Reprod*, 2003. **68**(2): p. 390-400.
48. Toledo, F.C., et al., *In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011. **9**: p. 94.
49. Teixeira, C.V., et al., *Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning*. *J Endocrinol*, 2007. **192**(2): p. 301-11.
50. Rhind, S.M., M.T. Rae, and A.N. Brooks, *Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis*. *Reproduction*, 2001. **122**(2): p. 205-14.
51. Olaso, R. and R. Habert, *Genetic and cellular analysis of male germ cell development*. *J Androl*, 2000. **21**(4): p. 497-511.
52. Guzman, C., et al., *Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny*. *J Physiol*, 2006. **572**(Pt 1): p. 97-108.
53. Zambrano, E., et al., *Fetal programming of sexual development and reproductive function*. *Mol Cell Endocrinol*, 2014. **382**(1): p. 538-49.
54. Rodriguez, G.L., et al. *Transgenerational Effects on Male Sexual Development in Offspring (OFF) of Maternal Protein Restriction (MPR) during Pregnancy and/or Lactation*. in *REPRODUCTIVE SCIENCES*. 2010. SAGE PUBLICATIONS INC 2455 TELLER RD, THOUSAND OAKS, CA 91320 USA.
55. Reyes-Castro, L.A., et al., *Paternal line multigenerational passage of altered risk assessment behavior in female but not male rat offspring of mothers fed a low protein diet*. *Physiol Behav*, 2015. **140**: p. 89-95.

56. Rodriguez-Gonzalez, G.L., et al., *Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility*. Int J Obes (Lond), 2015. **39**(4): p. 549-56.
57. Boulogne, B., et al., *Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development*. Int J Androl, 1999. **22**(6): p. 356-65.
58. Griswold, M.D., *The central role of Sertoli cells in spermatogenesis*. Semin Cell Dev Biol, 1998. **9**(4): p. 411-6.
59. Habert, R., H. Lejeune, and J.M. Saez, *Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **179**(1-2): p. 47-74.
60. Habert, R. and R. Picon, *Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 beta levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat*. J Steroid Biochem, 1984. **21**(2): p. 193-8.
61. Viguera-Villasenor, R.M., et al., *The effect of estrogen on testicular gonocyte maturation*. Reprod Toxicol, 2006. **22**(3): p. 513-20.
62. O'Shaughnessy, P.J. and P.A. Fowler, *Development of the human fetal testis*. Ann Endocrinol (Paris), 2014. **75**(2): p. 48-53.
63. Tilmann, C. and B. Capel, *Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad*. Development, 1999. **126**(13): p. 2883-90.
64. Rodriguez-Gonzalez, G.L. and E. Zambrano, *Sertoli: La Célula "Nodrizza" del Testículo*. Revista de la Escuela de Medicina "Dr. José Sierra Flores", 2008. **22**(2): p. 1-7.
65. Sekido, R., et al., *SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors*. Dev Biol, 2004. **274**(2): p. 271-9.
66. Barrionuevo, F., M. Burgos, and R. Jimenez, *Origin and function of embryonic Sertoli cells*. Biomol Concepts, 2011. **2**(6): p. 537-47.
67. Sharpe, R.M., et al., *Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood*. Reproduction, 2003. **125**(6): p. 769-84.

68. Walker, W.H., *Molecular mechanisms controlling Sertoli cell proliferation and differentiation*. *Endocrinology*, 2003. **144**(9): p. 3719-21.
69. Benton, L., L.X. Shan, and M.P. Hardy, *Differentiation of adult Leydig cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995. **53**(1-6): p. 61-8.
70. Pask, A., *The Reproductive System*. *Adv Exp Med Biol*, 2016. **886**: p. 1-12.
71. Jost, A., *A new look at the mechanisms controlling sex differentiation in mammals*. *Johns Hopkins Med J*, 1972. **130**(1): p. 38-53.
72. Hutson, J.M., et al., *The regulation of testicular descent and the effects of cryptorchidism*. *Endocr Rev*, 2013. **34**(5): p. 725-52.
73. Hughes, I.A. and A. Deeb, *Androgen resistance*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2006. **20**(4): p. 577-98.
74. Prince, F.P., *The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature*. *J Endocrinol*, 2001. **168**(2): p. 213-6.
75. Macleod, D.J., et al., *Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs*. *Int J Androl*, 2010. **33**(2): p. 279-87.
76. Scott, H.M., et al., *Relationship between androgen action in the "male programming window," fetal sertoli cell number, and adult testis size in the rat*. *Endocrinology*, 2008. **149**(10): p. 5280-7.
77. Gnessi, L., A. Fabbri, and G. Spera, *Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(4): p. 541-609.
78. Knobil E, N.J., *The physiology of reproduction* L. Raven Press, Editor. 1994: New York. p. 1365-1368, 1178, 1184.
79. Sofikitis, N., et al., *Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008. **109**(3-5): p. 323-30.
80. Wang, R.S., et al., *Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice*. *Endocr Rev*, 2009. **30**(2): p. 119-32.

81. Romano, F., et al., *The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility*. Contraception, 2005. **72**(4): p. 294-7.
82. Breton, S., et al., *Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis*. Asian J Androl, 2016. **18**(1): p. 3-9.
83. Rato, L., et al., *Blood Testis Barrier: How Does the Seminiferous Epithelium Feed the Developing Germ Cells?* 2012. 137-155.
84. Holdcraft, R.W. and R.E. Braun, *Hormonal regulation of spermatogenesis*. Int J Androl, 2004. **27**(6): p. 335-42.
85. Griswold, M.D., *Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis*. Physiol Rev, 2016. **96**(1): p. 1-17.
86. O'Donnell, L., et al., *Spermiation: The process of sperm release*. Spermatogenesis, 2011. **1**(1): p. 14-35.
87. Wen, Q., C.Y. Cheng, and Y.X. Liu, *Development, function and fate of fetal Leydig cells*. Semin Cell Dev Biol, 2016. **59**: p. 89-98.
88. Stocco, D.M., et al., *A brief history of the search for the protein(s) involved in the acute regulation of steroidogenesis*. Mol Cell Endocrinol, 2017. **441**: p. 7-16.
89. Seeburg, P.H., et al., *The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction*. Recent Prog Horm Res, 1987. **43**: p. 69-98.
90. Thackray, V.G., P.L. Mellon, and D. Coss, *Hormones in synergy: regulation of the pituitary gonadotropin genes*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **314**(2): p. 192-203.
91. Chojnacka, K., M. Zarzycka, and D.D. Mruk, *Biology of the Sertoli Cell in the Fetal, Pubertal, and Adult Mammalian Testis*. Results Probl Cell Differ, 2016. **58**: p. 225-51.
92. Randall D, B.W., French K, *Fisiología animal*, M.-H. Interamericana, Editor. 1998: Madrid p. 507-509.
93. Bellefontaine, N. and C.F. Elias, *Minireview: Metabolic control of the reproductive physiology: insights from genetic mouse models*. Horm Behav, 2014. **66**(1): p. 7-14.

94. Cabler, S., et al., *Obesity: modern man's fertility nemesis*. Asian J Androl, 2010. **12**(4): p. 480-9.
95. Tena-Sempere, M. and M.L. Barreiro, *Leptin in male reproduction: the testis paradigm*. Mol Cell Endocrinol, 2002. **188**(1-2): p. 9-13.
96. Hofny, E.R., et al., *Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males*. Fertil Steril, 2010. **94**(2): p. 581-4.
97. Vannelli, B.G., et al., *Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study*. Fertil Steril, 1988. **49**(4): p. 666-9.
98. Anton, S.D., et al., *Successful aging: Advancing the science of physical independence in older adults*. Ageing Res Rev, 2015. **24**(Pt B): p. 304-27.
99. Basaria, S., *Reproductive aging in men*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2013. **42**(2): p. 255-70.
100. Fulop, T., et al., *Aging, frailty and age-related diseases*. Biogerontology, 2010. **11**(5): p. 547-63.
101. Burton, D.G., *Cellular senescence, ageing and disease*. Age (Dordr), 2009. **31**(1): p. 1-9.
102. Chistiakov, D.A., et al., *Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 238463.
103. Gonzalez-Freire, M., et al., *Reconsidering the Role of Mitochondria in Aging*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015. **70**(11): p. 1334-42.
104. Fougere, B., et al., *Chronic Inflammation: Accelerator of Biological Aging*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2016.
105. Lanza, I.R., et al., *Endurance exercise as a countermeasure for aging*. Diabetes, 2008. **57**(11): p. 2933-42.
106. Bua, E., et al., *Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(3): p. 469-80.
107. Schiff, M., et al., *Mitochondrial response to controlled nutrition in health and disease*. Nutr Rev, 2011. **69**(2): p. 65-75.

108. Boudina, S. and T.E. Graham, *Mitochondrial function/dysfunction in white adipose tissue*. *Exp Physiol*, 2014. **99**(9): p. 1168-78.
109. Bonomini, F., L.F. Rodella, and R. Rezzani, *Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress*. *Aging Dis*, 2015. **6**(2): p. 109-20.
110. Gunes, S., et al., *Effects of aging on the male reproductive system*. *J Assist Reprod Genet*, 2016. **33**(4): p. 441-54.
111. Yang, H., et al., *The effects of aging on testicular volume and glucose metabolism: an investigation with ultrasonography and FDG-PET*. *Mol Imaging Biol*, 2011. **13**(2): p. 391-8.
112. Zitzmann, M., *Effects of age on male fertility*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2013. **27**(4): p. 617-28.
113. Neaves, W.B., et al., *Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984. **59**(4): p. 756-63.
114. Morley, J.E., et al., *Longitudinal changes in testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in healthy older men*. *Metabolism*, 1997. **46**(4): p. 410-3.
115. Johnson, L., C.S. Petty, and W.B. Neaves, *Influence of age on sperm production and testicular weights in men*. *J Reprod Fertil*, 1984. **70**(1): p. 211-8.
116. Ozkosem, B., et al., *Advancing age increases sperm chromatin damage and impairs fertility in peroxiredoxin 6 null mice*. *Redox Biol*, 2015. **5**: p. 15-23.
117. Aitken, R.J. and B.J. Curry, *Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(3): p. 367-81.
118. Lavranos, G., et al., *Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways*. *Reprod Toxicol*, 2012. **34**(3): p. 298-307.
119. Aitken, R.J., et al., *Oxidative stress and male reproductive health*. *Asian J Androl*, 2014. **16**(1): p. 31-8.

120. Agarwal, A., S.A. Prabakaran, and T.M. Said, *Prevention of oxidative stress injury to sperm*. J Androl, 2005. **26**(6): p. 654-60.
121. Sharma, R., J. Masaki, and A. Agarwal, *Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay*. Methods Mol Biol, 2013. **927**: p. 121-36.
122. Kao, S.H., et al., *Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility*. Fertil Steril, 2008. **89**(5): p. 1183-90.
123. Halliwell, B., *Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease*. Am J Med, 1991. **91**(3C): p. 14S-22S.
124. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
125. Preiser, J.C., *Oxidative stress*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2012. **36**(2): p. 147-54.
126. Agarwal, A. and S.S. Allamaneni, *Free radicals and male reproduction*. J Indian Med Assoc, 2011. **109**(3): p. 184-7.
127. Diamanti-Kandarakis, E., et al., *MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Nutrition as a mediator of oxidative stress in metabolic and reproductive disorders in women*. Eur J Endocrinol, 2017. **176**(2): p. R79-R99.
128. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
129. Rashid, K., K. Sinha, and P.C. Sil, *An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology*. Food Chem Toxicol, 2013. **62**: p. 584-600.
130. Chandrasekaran, A., M.D. Idelchik, and J.A. Melendez, *Redox control of senescence and age-related disease*. Redox Biol, 2016. **11**: p. 91-102.
131. Genestra, M., *Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants*. Cell Signal, 2007. **19**(9): p. 1807-19.
132. Vlassara, H. and M.R. Palace, *Diabetes and advanced glycation endproducts*. J Intern Med, 2002. **251**(2): p. 87-101.
133. Ramasamy, R., S.F. Yan, and A.M. Schmidt, *Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go*. Amino Acids, 2012. **42**(4): p. 1151-61.

134. Pisoschi, A.M. and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. Eur J Med Chem, 2015. **97**: p. 55-74.
135. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Exp Physiol, 1997. **82**(2): p. 291-5.
136. Davies, K.J., *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*. Biochem Soc Symp, 1995. **61**: p. 1-31.
137. Halliwell, B., *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. Plant Physiol, 2006. **141**(2): p. 312-22.
138. Hicks, J.J.T., R.Y.; Sierra,V., *Estrés oxidante. Concepto y clasificación*. Revista de Endocrinología y Nutrición 2006. **14**: p. 223-226.
139. Song, J.H., K. Fujimoto, and T. Miyazawa, *Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils*. J Nutr, 2000. **130**(12): p. 3028-33.
140. Dennerly, P.A., *Oxidative stress in development: nature or nurture?* Free Radic Biol Med, 2010. **49**(7): p. 1147-51.
141. Browne, S.E., R.J. Ferrante, and M.F. Beal, *Oxidative stress in Huntington's disease*. Brain Pathol, 1999. **9**(1): p. 147-63.
142. Ambrosio, G., J.L. Zweier, and J.T. Flaherty, *The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 1991. **23**(12): p. 1359-74.
143. Agarwal, A., et al., *Effect of oxidative stress on male reproduction*. World J Mens Health, 2014. **32**(1): p. 1-17.
144. Ford, W.C., *Regulation of sperm function by reactive oxygen species*. Hum Reprod Update, 2004. **10**(5): p. 387-99.
145. Agarwal, A., K. Makker, and R. Sharma, *Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update*. Am J Reprod Immunol, 2008. **59**(1): p. 2-11.
146. Chenoweth, P.J., *Influence of the male on embryo quality*. Theriogenology, 2007. **68**(3): p. 308-15.

147. Prakash, S., et al., *Morphological diversity of sperm: A mini review*. Iran J Reprod Med, 2014. **12**(4): p. 239-42.
148. Tomlinson, M.J., et al., *The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes?* Hum Reprod, 1992. **7**(4): p. 517-22.
149. Zini, A., et al., *Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa*. Fertil Steril, 2000. **74**(3): p. 461-4.
150. Bansal, A.K. and G.S. Bilaspuri, *Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions*. Vet Med Int, 2010. **2010**.
151. Gharagozloo, P. and R.J. Aitken, *The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy*. Hum Reprod, 2011. **26**(7): p. 1628-40.
152. Zribi, N., et al., *Sperm DNA fragmentation and oxidation are independent of malondialdehyde*. Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 47.
153. Chen, S.J., et al., *Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches*. Arch Gynecol Obstet, 2013. **288**(1): p. 191-9.
154. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, Jr., *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. J Nutr, 1993. **123**(11): p. 1939-51.
155. Quinn, R., *Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years?* Nutrition, 2005. **21**(6): p. 775-7.
156. Vega, C.C., et al., *Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism*. Int J Obes (Lond), 2015. **39**(4): p. 712-9.
157. Kruger, N.J., *The Bradford method for protein quantitation*. Methods Mol Biol, 1994. **32**: p. 9-15.
158. Barker, D.J., et al., *Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis*. Int J Epidemiol, 2002. **31**(6): p. 1235-9.

159. Galjaard, S., R. Devlieger, and F.A. Van Assche, *Fetal growth and developmental programming*. J Perinat Med, 2013. **41**(1): p. 101-5.
160. Gluckman, P.D., M.A. Hanson, and A.S. Beedle, *Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective*. Am J Hum Biol, 2007. **19**(1): p. 1-19.
161. Heindel, J.J., *Animal models for probing the developmental basis of disease and dysfunction paradigm*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2008. **102**(2): p. 76-81.
162. Nathanielsz, P.W., *Animal models that elucidate basic principles of the developmental origins of adult diseases*. ILAR J, 2006. **47**(1): p. 73-82.
163. Portha, B., A. Chavey, and J. Movassat, *Early-life origins of type 2 diabetes: fetal programming of the beta-cell mass*. Exp Diabetes Res, 2011. **2011**: p. 105076.
164. Ingelfinger, J.R. and A.M. Nuyt, *Impact of fetal programming, birth weight, and infant feeding on later hypertension*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2012. **14**(6): p. 365-71.
165. Sarr, O., K. Yang, and T.R. Regnault, *In utero programming of later adiposity: the role of fetal growth restriction*. J Pregnancy, 2012. **2012**: p. 134758.
166. Reyes-Castro, L.A., et al., *Pre- and/or postnatal protein restriction in rats impairs learning and motivation in male offspring*. Int J Dev Neurosci, 2011. **29**(2): p. 177-82.
167. Gluckman, P.D., et al., *Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease*. N Engl J Med, 2008. **359**(1): p. 61-73.
168. Godfrey, K.M., P.D. Gluckman, and M.A. Hanson, *Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives*. Trends Endocrinol Metab. **21**(4): p. 199-205.
169. Nathanielsz, P.W., et al., *Interventions to prevent adverse fetal programming due to maternal obesity during pregnancy*. Nutr Rev, 2013. **71 Suppl 1**: p. S78-87.

170. Vega, C.C., et al., *Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism*. Int J Obes (Lond), 2013.
171. Zambrano, E., et al., *Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 10): p. 1791-9.
172. Pi-Sunyer, F.X., *The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity*. Obes Res, 2002. **10 Suppl 2**: p. 97S-104S.
173. Derby, C.A., et al., *Body mass index, waist circumference and waist to hip ratio and change in sex steroid hormones: the Massachusetts Male Ageing Study*. Clin Endocrinol (Oxf), 2006. **65**(1): p. 125-31.
174. Chimento, A., et al., *Role of Estrogen Receptors and G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Regulation of Hypothalamus-Pituitary-Testis Axis and Spermatogenesis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 1.
175. Bonavera, J.J., et al., *In the male brown-Norway (BN) male rat, reproductive aging is associated with decreased LH-pulse amplitude and area*. J Androl, 1997. **18**(4): p. 359-65.
176. Walczak-Jedrzejowska, R., J.K. Wolski, and J. Slowikowska-Hilczer, *The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility*. Cent European J Urol, 2013. **66**(1): p. 60-7.
177. Stocco, D.M., J. Wells, and B.J. Clark, *The effects of hydrogen peroxide on steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells*. Endocrinology, 1993. **133**(6): p. 2827-32.
178. Allen, J.A., et al., *Bacterial endotoxin lipopolysaccharide and reactive oxygen species inhibit Leydig cell steroidogenesis via perturbation of mitochondria*. Endocrine, 2004. **25**(3): p. 265-75.
179. Conceicao, E.P., et al., *Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition--role of insulin resistance*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(1): p. 81-7.
180. Thompson, L.P. and Y. Al-Hasan, *Impact of oxidative stress in fetal programming*. J Pregnancy, 2012. **2012**: p. 582748.

181. Zambrano E, T.N., Long N. M., Guo C, Sun K, Cox L. A., Ford S. P., Nathanielsz P. W. and Li C, *Increased Central and Peripheral Glucocorticoid Synthesis Act As an Orchestrator of Developmental Programming*, in *Stress and Developmental Programming of Health and Disease: Beyond Phenomenology*, P.D. Zhang L, and Longo L.D, M.D., Editor. 2014, Nova Science Publishers, Inc. p. 463-486.
182. Bernal, A.B., et al., *Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15558.
183. Mutsaers, H.A. and R. Tofighi, *Dexamethasone enhances oxidative stress-induced cell death in murine neural stem cells*. Neurotox Res, 2012. **22**(2): p. 127-37.
184. Tarry-Adkins, J.L., et al., *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 J, 2010. **24**(8): p. 2762-71.
185. Vega, C.C., et al., *Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring*. J Physiol, 2016. **594**(5): p. 1483-99.
186. Stylianopoulou, F., *Effect of maternal adrenocorticotropin injections on the differentiation of sexual behavior of the offspring*. Horm Behav, 1983. **17**(3): p. 324-31.
187. Anderson, R.H., et al., *Relationships between sexual activity, plasma testosterone, and the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in prenatally stressed and non-stressed rats*. Brain Res, 1986. **370**(1): p. 1-10.
188. Selvaratnam, J., C. Paul, and B. Robaire, *Male Rat Germ Cells Display Age-Dependent and Cell-Specific Susceptibility in Response to Oxidative Stress Challenges*. Biol Reprod, 2015. **93**(3): p. 72.

189. Li, Y., et al., *Protective effects of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 on whole body heat stress-induced oxidative damage in the mouse testis*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2013. **11**: p. 23.
190. Agarwal, A., R.A. Saleh, and M.A. Bedaiwy, *Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction*. *Fertil Steril*, 2003. **79**(4): p. 829-43.
191. Sikka, S.C., *Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function*. *Front Biosci*, 1996. **1**: p. e78-86.
192. Omu, A.E., *Sperm parameters: paradigmatic index of good health and longevity*. *Med Princ Pract*, 2013. **22 Suppl 1**: p. 30-42.
193. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage*. *Lancet*, 1984. **2**(8411): p. 1095.
194. O'Flaherty, C., N. Beorlegui, and M.T. Beconi, *Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm*. *Int J Androl*, 2003. **26**(2): p. 109-14.
195. Ray, P.D., B.W. Huang, and Y. Tsuji, *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. *Cell Signal*, 2012. **24**(5): p. 981-90.
196. Savini, I., et al., *Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(5): p. 10497-538.
197. Michalakis, K., et al., *The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review*. *Metabolism*, 2013. **62**(4): p. 457-78.
198. Aitken, R.J. and M.A. Baker, *Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma*. *Int J Androl*, 2002. **25**(4): p. 191-4.
199. Zambrano, E., et al., *Fetal programming of sexual development and reproductive function*. *Mol Cell Endocrinol*, 2014. **382**: p. 538-49.
200. Aggerholm, A.S., et al., *Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile?* *Fertil Steril*, 2008. **90**(3): p. 619-26.

201. Landry, D., F. Cloutier, and L.J. Martin, *Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction*. *Reprod Biol*, 2013. **13**(1): p. 1-14.
202. Zambrano, E., 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*. *J Physiol*, 2005. **566**(Pt 1): p. 225-36.
203. Gorbachinsky, I., H. Akpinar, and D.G. Assimos, *Metabolic syndrome and urologic diseases*. *Rev Urol*, 2010. **12**(4): p. e157-80.
204. Yassin, A.A., F. Saad, and L.J. Gooren, *Metabolic syndrome, testosterone deficiency and erectile dysfunction never come alone*. *Andrologia*, 2008. **40**(4): p. 259-64.
205. Kapoor, D. and T.H. Jones, *Androgen deficiency as a predictor of metabolic syndrome in aging men: an opportunity for intervention?* *Drugs Aging*, 2008. **25**(5): p. 357-69.
206. Hokao, R., et al., *[The change with age of the copulatory behavior of the male rats aged 67 and 104 weeks]*. *Jikken Dobutsu*, 1993. **42**(1): p. 75-82.
207. Meeker, J.D., L. Godfrey-Bailey, and R. Hauser, *Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic*. *J Androl*, 2007. **28**(3): p. 397-406.
208. Hardy, M.P. and P.N. Schlegel, *Testosterone production in the aging male: where does the slowdown occur?* *Endocrinology*, 2004. **145**(10): p. 4439-40.
209. Gruenewald, D.A., et al., *The Brown Norway rat as a model of male reproductive aging: evidence for both primary and secondary testicular failure*. *J Gerontol*, 1994. **49**(2): p. B42-50.
210. Luo, L., H. Chen, and B.R. Zirkin, *Leydig cell aging: steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cholesterol side-chain cleavage enzyme*. *J Androl*, 2001. **22**(1): p. 149-56.
211. Won, Y.J., et al., *Pectinase-treated Panax ginseng extract (GINST) rescues testicular dysfunction in aged rats via redox-modulating proteins*. *Exp Gerontol*, 2014. **53**: p. 57-66.

212. Vazquez-Memije, M.E., et al., *Analysis of age-associated changes in mitochondrial free radical generation by rat testis*. Mol Cell Biochem, 2008. **307**(1-2): p. 23-30.
213. Crosnoe, L.E. and E.D. Kim, *Impact of age on male fertility*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2013. **25**(3): p. 181-5.
214. Kovac, J.R., et al., *The effects of advanced paternal age on fertility*. Asian J Androl, 2013. **15**(6): p. 723-8.
215. Singh, N.P., C.H. Muller, and R.E. Berger, *Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm*. Fertil Steril, 2003. **80**(6): p. 1420-30.
216. Syntin, P. and B. Robaire, *Sperm structural and motility changes during aging in the Brown Norway rat*. J Androl, 2001. **22**(2): p. 235-44.
217. Weir, C.P. and B. Robaire, *Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat*. J Androl, 2007. **28**(2): p. 229-40.
218. Kreuz, S. and W. Fischle, *Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease*. Epigenomics, 2016. **8**(6): p. 843-62.
219. Lane, M., et al., *Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e100832.
220. Skinner, M.K., *What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2*. Reprod Toxicol, 2008. **25**(1): p. 2-6.
221. Goll, M.G. and T.H. Bestor, *Eukaryotic cytosine methyltransferases*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 481-514.
222. Klose, R.J. and A.P. Bird, *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(2): p. 89-97.
223. Soubry, A., et al., *A paternal environmental legacy: evidence for epigenetic inheritance through the male germ line*. Bioessays, 2014. **36**(4): p. 359-71.
224. Ivanova, D.G. and T.M. Yankova, *The free radical theory of aging in search of a strategy for increasing life span*. Folia Med (Plovdiv), 2013. **55**(1): p. 33-41.

XIII. ARTÍCULOS  
GENERADOS

### **XIII. ARTÍCULOS GENERADOS DURANTE EL DOCTORADO**

#### ***Artículo de titulación***

1) Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. Rodríguez-González GL, Reyes-Castro LA, Vega CC, Boeck L, Ibáñez C, Nathanielsz PW, Larrea F, Zambrano E. *Age (Dordr)*. 2014;36(6):9721.

El artículo obtuvo el segundo lugar en investigación básica en la convocatoria al Premio en Investigación en Nutrición 2016. Funsalud-Nestlé.

#### ***Otros artículos generados***

1) Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. Rodríguez-González GL, Viguera-Villaseñor RM, Millán S, Moran N, Trejo R, Nathanielsz PW, Larrea F, Zambrano E. *J Dev Orig Health Dis*. 2012 Oct;3(5):321-6.

2) Fetal programming of sexual development and reproductive function. Zambrano E, Guzmán C, Rodríguez-González GL, Durand-Carbajal M, Nathanielsz PW. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jan 25;382(1):538-49.

3) Paternal line multigenerational passage of altered risk assessment behavior in female but not male rat offspring of mothers fed a low protein diet. Reyes-Castro LA, Rodríguez-González GL, Chavira R, Ibáñez C, Lomas-Soria C, Rodriguez JS, Nathanielsz PW, Zambrano E. *Physiol Behav*. 2015 Mar 1;140:89-95.

4) Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring. Vega CC, Reyes-Castro LA, Rodríguez-González GL, Bautista CJ, Vázquez-Martínez M, Larrea F, Chamorro-

Cevallos GA, Nathanielsz PW, Zambrano E. *J Physiol*. 2016 Mar 1;594(5):1483-99.

5) Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats. Santos M, Rodríguez-González GL, Ibáñez C, Vega CC, Nathanielsz PW, Zambrano E. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015 Feb 1;308(3):R219-25.

6) Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. Rodríguez-González GL, Vega CC, Boeck L, Vázquez M, Bautista CJ, Reyes-Castro LA, Saldaña O, Lovera D, Nathanielsz PW, Zambrano E. *Int J Obes (Lond)*. 2015 Apr;39(4):549-56.