

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**IMPACTO DE LA NUTRICIÓN DIFERENCIAL DURANTE LA PREÑEZ Y
LACTANCIA SOBRE EL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DE CELULAS
GLIALES (GDNF) EN TESTÍCULOS DE RATAS ADULTAS**

por

Marta Alejandra DIAZ TRAVERSO

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO aprobado por:

Presidente de Mesa: _____
Danilo Fila

Segundo Miembro (Tutor): _____
Graciela Pedrana

Tercer Miembro: _____
José M. Verdes

Cuarto Miembro (Cotutor): _____
Helen Viotti

Fecha: ___12/10/16_____

Autora: _____
Marta Alejandra Díaz Traverso

AGRADECIMIENTOS

Inmensas gracias a la Dra. Graciela Pedrana por el constante estímulo de superación y paciencia, por su valioso tiempo y excelente predisposición para ser mi guía en este arduo trabajo, en el que también se convirtió en una instancia disfrutable. Y a su hermoso equipo de tesoristas, que compartimos un objetivo en común y juntas aprendimos a complementarnos. A Paula Lombide por sus palabras alentadoras. A mi co-tutora Dra. Helen Viotti. Al Dr. Alejandro Bielli y a todo el personal que integra la Cátedra de Histología Embriología y Desarrollo por permitirme trabajar en el laboratorio y en el Laboratorio de Análisis de imágenes, Área de Histología, Facultad de Veterinaria. También al personal de Biblioteca de la Facultad de Veterinaria.

Agradezco a mi familia, en especial a mi mamá y a mi papá, a mi adorado hermano que me vieron iniciar en este camino, y a mi amor, Pablo que me acompañó en gran parte de este largo camino, brindándome apoyo y compañía. A mis abuelos, a mi cuñada, a mis amigas, a mis queridas compañeras de trabajo por apoyarme durante este recorrido y alentarme a ponerle punto final a este trabajo de Tesis.

TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
RESUMEN	8
SUMMARY	9
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Programación fetal	10
1.2 Nutrición como factor de programación fetal	10
1.3 Efectos de la subnutrición a nivel reproductivo en machos	10
1.4 Espermatogénesis testicular	11
1.5 Los factores de crecimiento a nivel del testículo: GDNF	11
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Programación Fetal y orígenes del desarrollo de la salud y enfermedad	12
2.1.1. Factores de programación fetal	13
2.1.1.1. La nutrición como factor de programación: efectos metabólicos y cardiovasculares	13
2.1.1.2. La nutrición como factor de programación: efectos reproductivos	14
2.2.1. Desarrollo testicular fetal en ratas	17
2.2.2. Desarrollo testicular posnatal y puberal en ratas	18
2.2.3. Espermatogénesis y ciclo del epitelio seminífero en ratas	19
2.3. Factores de crecimiento testiculares	23
2.3.1. Factor Neurotrófico derivado de Células Gliales (GDNF)	23
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	28
Objetivo general	
Objetivos específicos	
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1. Diseño experimental	29

5.2. Animales	29
5.3. Procesamiento histológico	30
5.4. Técnica de inmunohistoquímica	30
5.5. Captura de imágenes de preparaciones de inmunohistoquímica	31
5.6. Análisis digital de imágenes	31
Análisis morfométrico	
Clasificación de estadios del epitelio seminífero	
5.7. Análisis estadístico	32
6. RESULTADOS	
6.1 Resultados de inmunolocalización de GDNF en el testículo de ratas.	33
6.2 Resultados de inmunoexpresión de GDNF en el testículo de ratas.	35
6.3 Resultados de variables morfométricas	36
6.3.1. Resultados de área ocupada por túbulos seminíferos y diámetro de túbulos seminíferos de testículo de ratas.	37
6.3.2. Resultados de altura de epitelio seminífero de testículo de ratas.	38
6.3.3. Resultados del conteo de células de Sertoli por túbulo seminífero en el testículo de ratas	38
6.4. Frecuencias observadas de estadios del ciclo espermatogénico en animales control y comparación con animales subnutridos	39
6.5. Resultados de correlación entre inmunoexpresión de GDNF estadios del ciclo espermatogénico	41
7. DISCUSIÓN	
1- <i>¿Cómo la subnutrición afectó la expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales GDNF en el testículo?</i>	43
2- <i>¿Cómo se modifica la citoarquitectura testicular por la subnutrición durante períodos de desarrollo pre y posnatal?</i>	44
3- <i>¿Cómo afectó la subnutrición a las células de Sertoli?</i>	45
4- <i>Qué ocurrió con la frecuencia de los estadios del ciclo espermatogénico en animales subnutridos?</i>	46
5- <i>¿Cómo se relaciona la inmunoexpresión de GDNF y los cambios en los estadios del ciclo espermatogénico?</i>	46
8. CONCLUSIONES	47
9. BIBLIOGRAFÍA	48

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro comparativo N° 1. Estudios experimentales en ovinos y ratas. Efectos reproductivos en crías con subnutrición materna; p. 16.

Figura 1. A- Diagrama representativo de un sector del túbulo seminífero, detallando las uniones intercelulares de dos células de Sertoli y las células germinales, rodeando el tejido intersticial adaptado de Hai y colaboradores (Hai et al. 2014). **B-** Esquema del ciclo espermatogénico en rata adaptado de Leblond y Clermont (Leblond & Clermont 1952); p. 22.

Figura 2. Esquema ilustrativo de la acción del GDNF en la regulación de la autorrenovación y diferenciación de las células madre espermatogonias (Adaptado de Jan et al. 2012); p. 27.

Figura 3. Esquema ilustrativo del diseño experimental del trabajo de investigación; p. 29.

Figura 4. Imágenes representativas de la localización de la inmunoexpresión de GDNF en el testículo de ratas adultas: **a-** grupo control, **b-** grupo de ratas subnutridas durante la gestación (UNP), **c-** grupo de ratas subnutridas durante la lactancia (UNL), **d-** grupo subnutridas en preñez y lactancia (UNPL), **e-** control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Aumento 40x. Barra de escala: 10 μ ; p. 34.

Figura 5. Cuantificación de la inmunoexpresión de GDNF en el parénquima testicular de ratas adultas subnutridas durante la gestación (UNP), lactancia (UNL), preñez y lactancia (UNPL) comparadas con el grupo control. **a-** Área inmunomarcada (%). **b-** Intensidad de inmunomarcación (media de intensidad de píxeles en unidades arbitrarias); p. 35.

Figura 6. Imágenes representativas de parénquima testicular de ratas adultas. **a-** grupo control, **b-** grupo de ratas subnutridas durante la gestación (UNP), **c-** grupo de ratas subnutridas durante la lactancia (UNL), **d-** grupo de ratas subnutridas preñez y lactancia (UNPL). Obsérvese que la mayor parte de las imágenes se encuentran ocupadas por los túbulos seminíferos (ts), rodeados por tejido intersticial (i). Note que en las imágenes se observa en localización central un túbulo seminífero (ts) en corte transversal. Se evidencia los túbulos seminífero (ts) en **c y d** de menor área y diámetro que los túbulos en **a y b**. Aumento 10x. Barra de escala: 50 μ ; p. 36.

Figura 7. Análisis morfométrico de los túbulos seminíferos de testículos de ratas adultas. Mediciones de: **a-** Área ocupada por los túbulos seminíferos (μm^2). **b-** diámetro de los túbulos seminíferos (μm), **c-** altura del epitelio seminífero (μm), **d-** conteo del número de células de Sertoli por túbulo seminífero(ts), realizadas en grupos de ratas subnutridas durante la gestación (UNP), lactancia (UNL), preñez y lactancia (UNPL) comparadas con el grupo control; p. 38.

Figura 8. Determinación de frecuencias observadas de estadios celulares del I al XIV observados en túbulos seminíferos de ratas adultas (I-XIV) **a-** control (CONTROL) y subnutridas **b-** durante la gestación (UNP), **c-** durante la lactancia (UNL), **d-** preñez y lactancia (UNPL); p. 40.

Figura 9. Análisis comparativo de la inmunexpresión de GDNF según estadio del epitelio seminífero en animales subnutridos durante la gestación (UNP), lactancia (UNL), preñez y lactancia (UNPL) comparadas con el grupo control. Diferentes literales indican diferencias significativas entre grupos para un mismo estadio ($p < 0,05$); p. 42.

RESUMEN

Durante la vida fetal existen factores de programación fetal que pueden alterar el ambiente uterino determinando cambios permanentes en un organismo. La subnutrición es uno de ellos y produce disminución del número de espermatozoides y el volumen testicular en la vida adulta. Sin embargo los mecanismos subyacentes involucrados en la programación fetal son aún tema de investigación. Los factores de crecimiento, como el factor neurotrófico derivado de células gliales, GDNF, promueven la proliferación y la diferenciación de células de Sertoli en la vida postnatal temprana y son esenciales en la auto-renovación y diferenciación de espermatogonias, por lo tanto es candidato a mediar los mecanismos que intervienen en la programación fetal por subnutrición. El objetivo del presente estudio fue determinar si diferentes estatus nutricionales durante los períodos de preñez, lactancia o preñez/lactancia alteran la inmunoexpresión de la proteína GDNF en el testículo. Se utilizaron ratas Wistar (n=40) de 120 días de edad que fueron apareadas y divididas al azar en 4 grupos: control, subnutrido en preñez, subnutrido en lactancia, subnutrido en preñez/lactancia. Las crías macho nacidas fueron destetadas al día 22, y alimentadas con dieta control hasta el día 160 de vida cuando fueron sacrificadas. Sus testículos fueron fijados en formaldehído, procesados histológicamente en parafina, obteniendo cortes en portaobjetos para inmunohistoquímica y análisis morfométricos. Se utilizó anticuerpo primario anti-GDNF y se analizaron las variables: área inmunomarcada (%), intensidad de la inmunoexpresión de GDNF, altura del epitelio seminífero y diámetro de los túbulos seminíferos, número de células de Sertoli y frecuencia de estadio del ciclo espermatogénico, siendo expresadas como medias \pm eem. El porcentaje de área inmunomarcada de GDNF fue mayor en el grupo subnutrido en preñez comparado con subnutrido en lactancia y con el grupo control ($p < 0,001$). El diámetro de los túbulos seminíferos disminuyó en el grupo subnutrido en lactancia y gestación/lactancia en comparación con el grupo control ($p < 0,001$). La altura del epitelio seminífero fue mayor en el grupo subnutrido en lactancia comparando con el grupo control, subnutrido en preñez y subnutrido en preñez/lactancia ($p < 0,002$). El número de células de Sertoli por túbulo seminífero aumentó en los grupos subnutridos ($p < 0,001$) y se registró variaciones importantes en el ciclo espermatogénico. Un aumento de GDNF en condiciones de subnutrición podría generar un desbalance, al estimular la exagerada proliferación de células germinales y por lo tanto desbordando la capacidad de Sertoli de albergar y sostenerlas metabólicamente. En conclusión la expresión de GDNF en testículo de ratas adultas subnutridas aumenta dependiendo del momento de la subnutrición coincidiendo con un aumento del número de células de Sertoli y con disminución del diámetro de los túbulos seminíferos, con posibles repercusiones posteriores en la espermatogénesis. Futuros estudios son esenciales para analizar el efecto de la subnutrición sobre el número de células germinales y en los procesos de apoptosis y diferenciación celular por otros métodos como citometría de flujo que nos permitirá cuantificar dichas poblaciones celulares.

SUMMARY

During fetal life several fetal programming factors can alter the uterine environment determining permanent changes in an organism. Undernourishment during pregnancy decreases the sperm count and testicular volume in adult life. However the underlying mechanisms involved in fetal programming are still subject of research. Growth factors such as glial cell derived neurotrophic factor, GDNF, promote proliferation and differentiation of Sertoli cells in early postnatal life, and are essential in spermatogonial self-renewal and differentiation and therefore are candidates for mediating the mechanisms involved in fetal programming undernourishment. The aim of this study was to determine whether different nutritional status during periods of pregnancy, lactation or pregnancy/lactation alter GDNF protein immune expression in testis. We used Wistar rats (n = 40) of 120 days old that were mated and randomly divided into 4 groups: control; undernourished during gestation; undernourished under lactation, undernourished during pregnancy/lactation. Male offspring were weaned at day 22, and fed with control diet until day 160 of life when they were killed. Their testicles were fixed in formaldehyde, paraffin-processed, and sliced obtained for immunohistochemistry and morphometric analysis. We used GDNF primary antibody and analyzed the variables: immunostaining area (%), intensity of GDNF immune expression, seminiferous epithelium height and diameter of the seminiferous tubules, number of Sertoli cells and frequency in the spermatogenic cycle (expressed as mean \pm SEM). GDNF % of immunostaining area was higher in the group: undernourished in pregnancy compared with breastfeeding and with the control group (p <0.001). The seminiferous epithelium was higher in the undernourished breastfeeding group compared with the control group, undernourished undernourished in pregnancy and in pregnancy / lactation (p <0.002). The diameter of the seminiferous tubules decreased in the group undernourished in pregnancy and pregnancy / lactation compared to the control group (p <0.001). An increase in GDNF in conditions of undernourishment could create an imbalance by stimulating excessive cell proliferation germ and therefore exceed the capacity Sertoli to provide metabolic sustain. In conclusion, the expression of GDNF in testis of adult rats undernourished increases depending on the time of undernourishment coinciding with an increase in the number of Sertoli cells and decrease the diameter of the seminiferous tubules, with possible subsequent impact on spermatogenesis. Future studies are still essential to discuss the effect of undernourishment on the number of germ cells and apoptotic processes and cell differentiation by other methods such as flow cytometry that allow us to quantify these cell populations.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Programación fetal

Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales, han demostrado la asociación entre alteraciones intrauterinas y postnatales con una mayor susceptibilidad en el adulto para desarrollar enfermedades metabólicas, cardiovasculares, del sistema nervioso central y trastornos reproductivos. La teoría de "programación fetal" fue popularizada por Barker (Barker et al. 1990), en la que se establece que los insultos durante períodos críticos o sensibles en la vida fetal y postnatal, predisponen a una mayor susceptibilidad a enfermedades crónicas en la vida adulta. La respuesta fetal a un entorno desfavorable puede ser tan diversa como ser una maduración más rápida, una limitación del crecimiento, o el aborto (Godfrey 1998). El paradigma de los "orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad" (developmental origins of health and disease: DOHaD) establece que el medio ambiente durante los periodos periconcepción, gestación y lactancia da forma a los individuos en desarrollo, lo que conduce, en el caso de un entorno nocivo, a una predisposición a las enfermedades del adulto (Tarrade et al. 2015).

1.2 Nutrición como factor de programación fetal

Diferentes experimentos en diversas especies de mamíferos (rata, ratón, cobaya, cerdo, etc.) demostraron que una reducción de calorías materna o la ingesta de proteínas durante el embarazo y la lactancia afecta la capacidad de crecimiento y la capacidad cognitiva de las crías (Zambrano et al. 2014). Durante la subnutrición materna, el feto en desarrollo detecta el entorno adverso y reprograma el genoma, lo que favorece la supervivencia inmediata pero con resultados en la predisposición a enfermedades metabólicas en la vida adulta. El desarrollo de enfermedades crónicas posteriores en la edad adulta depende del grado de desajuste entre el ambiente pre y postnatal (Lakshmy 2013).

1.3 Efectos de la subnutrición a nivel reproductivo en machos

Se ha reportado la disminución de la esteroidogénesis testicular en fetos de ovejas subnutridas durante la gestación (Rae et al. 2002) y un efecto inhibitor sobre el número de células Sertoli y diámetro de los túbulos seminíferos en animales adultos (Kotsampasi et al. 2009, Evans et al. 2016). La restricción de proteína durante la gestación de ratas, se asocia con disminución en el número de células de Sertoli y altera los parámetros de esperma en crías macho adultas (Toledo et al. 2011). Otros estudios han relacionado la restricción de nutrientes durante el desarrollo con el retraso de la pubertad en machos y hembras (Da Silva et al. 2001) y efecto sobre el eje hipotálamo hipofisario gonadal en ratas (Evans et al. 2016).

1.4 Espermatogénesis testicular

La espermatogénesis es un proceso altamente ordenado que tiene lugar en los túbulos seminíferos de los testículos de mamíferos (Lagos-Cabré & Moreno 2008). Es un proceso complejo en el que la diferenciación de las células madre espermatogonias (SSC) tienen la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse para culminar en la producción de espermatozoides, con el apoyo del nicho, formado por las células de Sertoli, células mioideas peritubulares y componentes de la matriz extracelular (Hai et al. 2014). La complejidad del proceso de espermatogénesis requiere mecanismos de control ajustados y equilibrados, como lo demuestra la duración exacta de la espermatogénesis y la existencia de asociaciones definidas de células germinales (Yang et al. 2010).

1.5 Los factores de crecimiento a nivel del testículo: GDNF

Las células de Sertoli, son las células somáticas en el epitelio seminífero, y un componente importante del nicho, proporcionan soporte físico para las SSC y también expresan proteínas y otros factores que regulan todas las etapas de desarrollo de células germinales (França et al. 1998). Entre estas proteínas, las células de Sertoli producen el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), que regula a las células madre espermatogonias (Rooij & Russell 2000, Jan et al. 2012), regulando su destino celular a través de sus receptores GDNF-Ret y GFR α 1 que juegan un papel importante en la regulación de la auto-renovación y diferenciación de las células madre espermatogonias (Meng et al. 2000).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Programación Fetal y orígenes del desarrollo de la salud y enfermedad

La programación fetal definida por primera vez por Alan Lucas en 1991, en la que se establece que las alteraciones en el estado nutricional y/o hormonal del feto en el medio uterino durante períodos críticos del desarrollo fetal, pueden provocar una alteración en la expresión del genoma fetal resultando en efectos permanentes sobre una serie de procesos fisiológicos (Godfrey 1998). Durante el desarrollo fetal, se suceden una serie de períodos críticos, en especial cuando ocurren la organogénesis y la diferenciación, ambos se caracterizan por ser períodos de rápido crecimiento y son etapas en las que el feto es vulnerable, en las cuales las variaciones producidas en los nutrientes o el suministro de oxígeno, u otras perturbaciones para el medio ambiente, ocasionan un problema inmediato y una respuesta en la que el feto se adapta a las señales ambientales adversas en el útero con ajustes permanentes en los sistemas homeostáticos para ayudar a la supervivencia adaptativa (Torrens et al. 2009). Entre las adaptaciones que experimenta el feto, pueden ocurrir la disminución de la tasa de división celular, ya sea a través de concentraciones alteradas de los factores de crecimiento u hormonas, también se pueden disminuir de forma permanente el número de células de determinados órganos (Abecia et al. 2006). En la actualidad se admite la hipótesis de Barker y sus colaboradores, que considera además a las exposiciones postnatales durante las fases cruciales del desarrollo en la vida temprana, llegando a la teoría de los **"orígenes de la salud y enfermedades del adulto"** dado que el crecimiento durante la lactancia y la primera infancia también está vinculado a enfermedades en la vida adulta, basado en los resultados de sus investigaciones en humanos acerca de disfunciones metabólicas (diabetes tipo 2 y obesidad) y alteraciones cardiovasculares (hipertensión) puede tener origen durante el desarrollo temprano, durante la gestación y la lactancia (Barker & Clark 1997, Langley-Evans 2001, Lakshmy 2013). Estudios recientes en humanos buscan generar conciencia de la importancia de la dieta durante períodos clave del desarrollo durante la gestación y lactancia en poblaciones humanas. Diversas revisiones informan que los mecanismos epigenéticos son el vínculo entre los acontecimientos de la vida temprana y la salud en la vida adulta, con las marcas epigenéticas siendo consideradas como señales ambientales de larga duración. Muchos órganos se ven afectados por este proceso, incluyendo las gónadas, debido a que la gametogénesis se lleva a cabo durante la vida fetal, factores ambientales adversos pueden afectar posteriormente la función del eje reproductivo y entre ellos la subnutrición materna es de central importancia pudiendo afectar a la fertilidad de la descendencia, creando así un efecto transgeneracional (Rhind et al. 2001, Davies & Norman 2002, Dupont et al. 2012).

2.1.1. Factores de programación fetal

Son denominados factores de programación fetal, los factores genéticos y aquellos que alteren el ambiente uterino determinando cambios permanentes en los mecanismos homeostáticos, con efectos perdurables en la vida adulta. Entre los factores que alteran el ambiente uterino e inician la programación fetal, se incluyen la hipoxia y estrés intrauterino, la exposición a hormonas y la nutrición (Thompson & Al-Hasan 2012, Zambrano et al. 2014, Evans et al. 2016).

Estudios previos en animales han demostrado que la hipoxia intrauterina induce a la restricción del crecimiento fetal, y aumenta el riesgo de la enfermedad cardíaca (Thompson & Al-Hasan 2012).

Con respecto a los factores hormonales estos regulan el crecimiento fetal y el desarrollo de tejidos fetales, y tienen un papel central en la programación intrauterina alterando diversos factores de crecimiento, proteínas de unión y los componentes de las vías de señalización intracelulares (Fowden & Forhead 2004). Por ejemplo en ovinos la administración prenatal exógena de glucocorticoide (betametasona) afectó el desarrollo gonadal provocando una reducción en la longitud de los cordones testiculares, el volumen ocupado por tejido intersticial y el peso testicular en fetos (Pedrana et al. 2008). Asimismo en testículos de ovinos en etapa prepuberal se determinó efectos sobre la inmunoexpresión de proteínas apoptóticas por la administración de glucocorticoides prenatales sugiriendo un papel crucial en la futura capacidad reproductiva (Pedrana et al. 2013).

2.1.1.1. La nutrición como factor de programación: efectos metabólicos y cardiovasculares

La nutrición es uno de los principales factores ambientales que intervienen en la programación de la salud y la enfermedad en los seres humanos y otras especies, en múltiples etapas de desarrollo. Diferentes enfoques experimentales han utilizado gran variedad de desafíos nutricionales que incluyen la restricción de nutrientes en general, o dietas hipocalóricas, o con restricción de proteínas, la mayoría de ellos actúan como una forma importante de estrés adrenal (Zambrano et al. 2014).

La restricción del crecimiento fetal intrauterino resulta de la disfunción útero-placentaria durante la última etapa de la gestación, aumentando el riesgo de hipoglucemia en el período neonatal, de enfermedades cardiovasculares y de padecer diabetes mellitus no insulino-dependiente en la vida adulta (Lesage et al. 2002, Fernandez-Twinn & Ozanne 2010). Otro estudio demuestra que la baja exposición de proteínas en ratas gestadas, provoca en la cría la reducción de células β del islote pancreático al nacimiento y reducción de la secreción de insulina en la vida adulta, presumiblemente debido a la reducción inducida por la dieta en la tasa de proliferación y aumento de la apoptosis de las células (Petrik et al. 1999, Brenseke et al. 2013).

Se ha reportado, que en ratas que fueron subnutridas durante la preñez dan origen a crías con restricción en el crecimiento y éstas al ser sometidas a una alimentación ad libitum desarrollan un síndrome metabólico caracterizado por obesidad,

hipertensión, hiperleptinemia e hiperinsulinemia y un adelanto del comienzo de la pubertad (Howie et al. 2009). Por otra parte en humanos, la obesidad y los desórdenes metabólicos asociados son unos de los problemas a nivel de las sociedades actuales, causada por múltiples factores entre ellos el estilo de vida en sociedades desarrolladas en este siglo (Sloboda et al. 2009).

2.1.1.2. La nutrición como factor de programación: efectos reproductivos

Los estudios en ovejas y en ratas han demostrado aumento de los niveles de gonadotropina basales, FSH (Kotsampasi et al. 2009) y LH después de la subnutrición materna, por aumento de la sensibilidad de la hipófisis al GnRH o aumento del GnRH a nivel hipotalámico (Deligeorgis et al. 1996). Una reciente revisión sugiere que la subnutrición materna programa el sistema neuroendocrino reproductivo, y que sistemas múltiples están involucrados o que los efectos se manifiestan en diversos niveles dentro del eje reproductivo (Evans et al. 2016).

Estudios experimentales en ovinos, han demostrado que la subnutrición no altera el inicio de la pubertad (Kotsampasi et al. 2009), sin embargo otros informan de un retraso en la aparición de la pubertad y disminución de la concentración de testosterona y volumen testicular (Da Silva et al. 2001). A nivel testicular, la subnutrición materna desde el apareamiento hasta el día 50 (primer tercio de la gestación) mostraron un aumento de la expresión de ARNm de la proteína reguladora esteroideogénica aguda (StAR) en los testículos fetales, es una proteína implicada en el transporte de colesterol a las mitocondrias para la esteroideogénesis, lo que indica una posible regulación positiva de la esteroideogénesis testicular fetal (Rae et al. 2002). La subnutrición durante la gestación temprana en ovejas, desde el día 1 hasta el día 110 de gestación, (1er y 2do tercio de la gestación, cabe mencionar que la duración de la gestación en ovinos es de 150 días) en testículos fetales no tuvo efecto ni en el número de células de Sertoli ni en la expresión de productos de genes que regulan la apoptosis en la descendencia masculina (Andrade et al. 2013). En cambio en testículos de corderos de 10 meses de edad (adultos) se demostró un efecto inhibitorio sobre el número de células de Sertoli y disminución del diámetro de los túbulos seminíferos (Kotsampasi et al. 2009). Por último, en otro estudio, la subnutrición materna fue impuesta desde las 70 días de gestación hasta el parto (2do y 3er tercio de la gestación) hallando en corderos recién nacidos, una reducción del 20% en el número de células de Sertoli y disminución de los volúmenes de cordones testiculares (Bielli et al. 2002).

Diversas investigaciones en ratas, han demostrado que una restricción de proteínas en la dieta durante la gestación (mencionando que la duración de la gestación en ratas es de 21 días) y/o lactancia, dan lugar a crías que presentan retraso en el descenso testicular, reducción de los niveles de LH y testosterona a los 70 días de vida, así como disminuida la tasa de fecundidad y el conteo de espermatozoides en ratas de 270 días de edad (Zambrano et al. 2005). En otro experimento realizado en similares condiciones y durante el mismo período, se observó en testículos prepuberales la reducción del diámetro de los túbulos seminíferos, del número de

células germinales y de células de Sertoli por túbulo, este último se halló mediante una menor expresión de la proteína del receptor de andrógenos (AR), que se utilizó como marcador de la maduración de células de Sertoli (Rodríguez-González et al. 2012). Una restricción de proteínas durante la gestación, y la lactancia con dieta estándar, se asocia con la reducción del número de células de Sertoli, del conteo y motilidad de espermatozoides, y aumento de las anomalías morfológicas y la retención de gota citoplasmática en la cola del epidídimo y testículos en animales puberales y adultos (Toledo et al. 2011). El estado nutricional de la madre durante la lactancia es equivalente y, posiblemente más importante que la nutrición durante la gestación, se demostró que las crías cuyas madres fueron subnutridas durante la lactancia tuvo consecuencias más drásticas sobre el desarrollo gonadal en comparación con las crías cuyas madres estaban subnutridas sólo durante la gestación o durante la gestación y la lactancia; en el período perinatal, se reduce los niveles circulantes de FSH en las crías macho sin afectar a las concentraciones de LH y testosterona y la restricción de nutrientes durante la lactación de crías macho se asocia con retraso de la pubertad y retraso drástico del crecimiento testicular con reducción del área del diámetro y lumen de los túbulos seminíferos (Leonhardt 2002). En el caso de dietas hipoproteicas e hipocalóricas en madres durante la lactancia, provocan disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos y en el tamaño y número de células de Sertoli de sus crías macho (Ramos et al. 2006). La restricción de proteínas materna durante la lactancia, reduce el peso corporal y peso testicular en las crías de ratas macho en el destete (a los 21 días post parto) mostrando aumento de la concentración de testosterona sérica y de testosterona testicular, reducción de los niveles séricos de estradiol y disminución de la expresión de la enzima aromatasa testicular que indica daño potencial en el desarrollo de células germinales derivando en alteraciones en la función reproductiva futura (Vilanova Teixeira et al. 2007).

Los hallazgos tanto en ovejas y ratas indican que la subnutrición durante la gestación puede reducir el desarrollo testicular en el recién nacido (Mossa et al. 2015). Sin embargo los mecanismos intrínsecos que median dichos cambios aún son desconocidos.

Especie	Dieta maternal	Periodo de subnutrición	Efectos en las crías	Referencia
Ovino	subnutrición	Gestación	Disminución de la concentración de testosterona y volumen testicular. Retraso en el inicio de la pubertad.	Da Silva, 2001
Ovino	subnutrición	Gestación (70d al parto)	Menos células de Sertoli y menor volumen de cordones testiculares al nacer.	Bielli, 2002
Ovino	subnutrición	Gestación 0 - 50d)	Aumenta la expresión de RNA m para la proteína androgénica responsable de la esteirogenesis en el testículo.	Rae, 2002
Ovino	50% de la control	Gestación (31-100d)	No tuvo efecto en la pubertad. Disminución del número de Sertoli y el diámetro de los túbulos seminíferos en corderos adultos.	Kotsompasi, 2009
Ovino	50% de la control	Gestación (0 a 110 d)	No hubo efecto en Sertoli ni en la expresión de genes apoptóticos en testículos fetales.	Andrade, 2013
Rata	50% de la control	Gestación y lactación o Lactación	Durante el período perinatal, reduce los niveles circulantes de FSH en las crías macho sin afectar a las concentraciones de LH y testosterona. Retraso en el inicio de la pubertad. Retraso drástico del crecimiento testicular con reducción del área del diámetro y lumen de los túbulos seminíferos en animales recién destetados.	Leonhardt, 2002
Rata	Hipoproteica	Gestación y/o lactación	Retraso en el descenso testicular, reducción de niveles de LH y testosterona, y baja tasa de fecundidad con conteo disminuido de espermatozoides en adultos.	Zambrano, 2005
Rata	Hipoproteica y hipocalórica	Lactación	Disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos, y en el tamaño y número de células de Sertoli.	Ramos, 2006
Rata	Hipoproteica	Lactación	Aumento de testosterona plasmática y testicular, y reducción de estradiol y aromatasa testicular, enzima indicadora de células germinales en animales recién destetados.	Vilanova Teixeira, 2007
Rata	Restricción proteica (6% proteína)	Gestación	Reducción de número de células de Sertoli y de recuento de espermatozoides, y aumento del número de anomalías morfológicas, en animales puberales y adultos.	Toledo, 2011
Rata	Hipoproteica	Gestación y lactación	Disminución del diámetro de los túbulos seminíferos, células germinales y células de Sertoli en la edad prepuberal.	Rodríguez-González, 2012

Cuadro comparativo N° 1. Estudios experimentales en ovinos y ratas. Efectos reproductivos en crías con subnutrición materna.

2.2.1. Desarrollo testicular fetal en ratas

La embriogénesis testicular en mamíferos, como la rata, puede ser dividida en dos fases. La primera es la fase indiferenciada caracterizada por la aparición de las gónadas bipotenciales que surgen como estructuras pares dentro del mesodermo, a partir de la cresta urogenital, la cual es un engrosamiento del mesodermo en la pared dorsal del celoma embrionario, formado durante la gastrulación del embrión. Desde el punto de vista celular, la gónada bipotencial está conformada por cuatro tipos celulares, las células germinales primordiales (PGC) y tres poblaciones de células somáticas, entre las cuales tenemos los precursores de células de soporte o células de Sertoli que derivan de las células del epitelio celómico, los precursores de células esteroidogénicas (que darán origen a células de Leydig) y finalmente células del tejido conjuntivo (a partir de las cuales se formará el tejido vascular, túnica y células peritubulares mioides) (Veitia et al. 2001). Al día 13 de la gestación de la rata, ocurre la segunda fase, la fase diferenciada, que comprende la expresión del gen determinante del sexo (SRY) de la región Y, y se diferencia la gónada bipotencial en testículo, o en su ausencia, se diferencia en ovario, conduciendo a su vez a la diferenciación de las células de Sertoli, éstas actúan como centro organizador de la gónada masculina orquestando la formación del cordón testicular y la diferenciación de los demás tipos celulares del testículo. Las células germinales primordiales (PGC) migran a la cresta genital y proliferan por mitosis a gonocitos a medida que quedan dentro de los cordones testiculares, hasta el día 18 de gestación que entran en detención mitótica (estado de quiescencia) hasta unos pocos días después del nacimiento (Jan et al. 2012). Las células peritubulares mioides, también migran hacia la gónada masculina para formar una capa de células aplanadas que rodean a los cordones sexuales y contactan con las células de Sertoli (Wilhelm et al. 2007). Hacia el día 20 de la gestación poco antes del nacimiento, el número de células de Sertoli aumenta rápidamente, mostrando en la rata su período de actividad mitótica más intenso, y siguen proliferando hasta después del nacimiento (Hess & França 2005). Las células de Leydig fetales se agrupan cerca de los vasos sanguíneos y aumentan su número a través de la gestación alcanzando el pico máximo antes del nacimiento, su biosíntesis y secreción de andrógenos comienza tempranamente durante el desarrollo, hay un pico de testosterona plasmática a los días 18 y 19 de gestación (Wu et al. 2007).

2.2.2. Desarrollo testicular posnatal y puberal en ratas

En los testículos al nacer se observan cordones sexuales con gonocitos en posición central, que reanudan sus divisiones mitóticas rápidas y continuas en los primeros días de vida con el fin de aumentar la población celular (Zheng et al. 2014). Gradualmente a partir del 5º día de vida, los gonocitos migran del centro a la periferia con la consecuencia que al llegar a la lámina basal se diferencian en células madre espermatogonias o espermatogonias indiferenciadas (SSC), momento en el cual la proliferación cesa (Lagos-Cabré & Moreno 2008). El desarrollo normal de los gonocitos en los primeros días postnatales es crítico para el desarrollo de una espermatogénesis apropiada en el adulto (Rooij & Russell 2000). La supervivencia y el desarrollo de las células madre espermatogonias (SSC) es responsabilidad de un microambiente especializado denominado nicho, que es proporcionado por las células de Sertoli, las células peritubulares mioides y las células intersticiales o de Leydig. Las células de Sertoli, ofrecen nutrientes y factores de crecimiento testicular como mencionaremos posteriormente, y éstas continúan proliferando hasta el día 16 postnatal y luego detienen su multiplicación (Skinner et al. 2005). Las células peritubulares mioides participan en la transducción de las señales entre el intersticio y el compartimiento tubular mediante la secreción de factores de transcripción. Por otra parte, las células de Leydig secretan la testosterona para mantener la espermatogénesis (Zheng et al. 2014). Este nicho logra el equilibrio entre la auto-renovación de las células madre espermatogonias (SSC) y su diferenciación a espermatogonias diferenciadas tipo A. De este modo algunas de las SSC, que comprenden las espermatogonias As (single), espermatogonias Ap (pair), espermatogonias Aal (aligned), inician la espermatogénesis, diferenciándose sucesivamente en espermatogonias A1, A2, A3, A4, AIn y B, de tamaño progresivamente menor y cada vez mayor compactación de la cromatina, para dar lugar finalmente a los espermatocitos primarios (Rooij & Russell 2000). Entre los 17 y 18 días comienza la meiosis de espermatocitos, que comprende a los espermatocitos primarios que surgen de espermatogonias tipo B, las cuales pierden el contacto con la lámina basal de los cordones sexuales, y por dos divisiones meioticas sucesivas, se convertirán en espermatocitos secundarios y luego en espermátidas, las cuales se pueden observar por primera vez entre los 24 y 25 días de edad (Lagos-Cabré & Moreno 2008). En la rata, la aparición de los primeros espermatozoides en el lumen de los cordones sexuales, se observan aproximadamente a los 45 días de edad, momento en el que alcanzan la pubertad, comprendiendo la finalización de la primera onda espermatogénica y la formación de los túbulos seminíferos (Cheng & Mruk 2010). Las células de Sertoli en este momento se someten a una conversión de maduración, incluyendo los cambios morfológicos con nucléolo grande y tripartita, la pérdida de actividad proliferativa, y la formación de la barrera hemato-testicular (Hai et al. 2014) y secretan niveles más altos de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (Meng et al. 2000).

2.2.3. Espermatogénesis y ciclo del epitelio seminífero en ratas

La espermatogénesis es un proceso por el cual se produce la transformación de las espermatogonias en espermatozoides durante un período prolongado de tiempo dentro de los límites de los túbulos seminíferos de los testículos. Inicia unos días después del nacimiento, se completa cuando el individuo alcanza la pubertad, y se continúa durante toda la vida del animal (Hess & De Franca 2008). Consta de tres fases.

Primera fase: espermatocitogenesis o proliferativa o mitótica

En la cual las espermatogonias tipo A1, comienzan las divisiones mitóticas para dar origen a sucesivas generaciones de espermatogonias tipo A2, A3 y A4. Posteriormente continúa la diferenciación a las espermatogonias intermedias (In) y luego a las espermatogonias tipo B. En promedio, la mitad de la población de las células hijas de tipo A en división mitótica, se diferencia hasta transformarse en células de tipo B y con ello pierden su potencialidad para producir espermatogonias A, mientras que la otra mitad de la población de células hijas no pierde sus características de las progenitoras (Leblond & Clermont 1952, Hermo et al. 2010).

Segunda fase: Meiosis

Cuando espermatogonias tipo B, finalmente, se diferencian en espermatocitos primarios o pre-leptoteno, estas células germinales están prontas para entrar en la segunda fase o meiosis, un proceso crucial en la espermatogénesis durante el cual las células germinales diploides se dividen y se diferencian en espermátidas haploides (Jan et al. 2012). Este proceso se lleva a cabo mediante dos divisiones meióticas sucesivas y se denominan primera división meiótica o meiosis I y segunda división meiótica o meiosis II (separación de las cromátidas hermanas en células haploides). La meiosis I involucra procesos complejos que incluyen movimiento de los cromosomas homólogos, cada uno compuesto de un par de cromátidas hermanas, a los polos opuestos de los espermatocitos dando como resultado dos células hijas. Se inicia con la profase I, etapa de larga duración y caracterizada por el apareamiento e intercambio de los segmentos de los cromosomas homólogos (Herme et al. 2010), a su vez está subdividida en cuatro etapas citológicas: leptoteno (condensación de la cromatina), cigoteno (inicio de la unión de los cromosomas homólogos), paquiteno (unión completa) y diacinesis (entrecruzamiento y formación de quiasmas) (Jan et al. 2012). Posterior a la profase I, continúa la metafase I donde los cromosomas homólogos pares se alinean en la placa ecuatorial. En la anafase I, los miembros de cada par migran a polos opuestos de la célula, y la telofase I, las células hijas se separan aunque permanece un puente citoplasmático entre ellas, originándose los espermatocitos secundarios, estas células presentan una vida media muy corta debido a eso es difícil observarlos (O'Donnell et al. 2006). Como resultado, de cada espermatocito primario diploide se obtienen dos espermatocitos secundarios y de estos se originan cuatro espermátidas redondas haploides.

Tercera fase: espermiogénesis

Por último, la tercera fase (espermiogénesis), comprende la diferenciación celular de

las espermátidas redondas que atraviesan una serie de cambios morfológicos hasta llegar a la formación de los espermatozoides. Dichos cambios implican la **fase de Golgi** que implica la formación del acrosoma, a partir del complejo de Golgi prominente en el cual se acumulan pequeños gránulos, que posteriormente se fusionan y forman una vesícula acrosómica, ésta entra en contacto con la envoltura nuclear, se une a ella y así establece el polo anterior del espermatozoide en desarrollo. Le sigue la **fase acrosómica**, donde la vesícula acrosómica se extiende hasta la mitad anterior del núcleo a modo de capuchón y se pasa a llamar acrosoma, que contiene varias enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa entre otras, que le servirá en el inicio de la fecundación para disociar las capas del ovocito. Durante la fase acrosómica el núcleo de las espermátidas se orienta hacia la base y el axonema se proyecta hacia la luz del túbulo seminífero además el núcleo se condensa y se alarga dando origen a las espermátidas elongadas, uno de los centriolos comienza la formación del flagelo, mientras que las mitocondrias se acumulan alrededor de la porción proximal del flagelo, donde se generan los movimientos del espermatozoide. Por último, en la **fase de maduración**, se produce la eliminación del citoplasma de las espermátidas (espermátidas tardías), formándose así los cuerpos residuales que son fagocitados por las células de Sertoli, y formándose finalmente los espermatozoides que son inmóviles y liberados al lumen del túbulo seminífero (espermiación) (Junqueira & Carneiro 2005).

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

Ciclo espermatogénico o ciclo del epitelio seminífero

El ciclo espermatogénico o del epitelio seminífero consiste en una serie de etapas o estadios que se constituyen a medida que las células germinales se diferencian y se desplazan progresivamente hacia el lumen del túbulo, formando asociaciones dinámicas dentro del epitelio seminífero, en cada sección determinada de los túbulos. Después de una serie de cambios en la composición celular de cada zona del epitelio seminífero, la composición celular original de cada área reaparece y se inicia de nuevo (Jan et al. 2012). Las investigaciones de Leblond y Clermont en los años 50's demostraron que hay seis generaciones sucesivas de espermatogonias y el ciclo empieza con espermatogonias de tipo A, y si se examinan las asociaciones celulares en todos los segmentos de un túbulo seminífero, se comprobará una progresión ordenada desde un estadio del ciclo hacia el siguiente (Leblond & Clermont 1952).

En ratas, el ciclo del epitelio seminífero se clasifica en 14 estadios designado en números romanos del I al XIV, dentro de ellas se detalla la espermiogénesis en 19 pasos con números arábigos del 1 al 19, haciendo referencia a la transformación

morfológica de espermátidas en espermatozoides (Leblond & Clermont 1952, O'Donnell et al. 2006, Lagarrigue et al. 2011). Los espermatozoides formados en la última etapa (etapa 19), se localizan en los estadios VII y VIII del ciclo (Kopera et al. 2010). El tiempo para que tenga lugar toda la sucesión de cambios, representa la duración del ciclo del epitelio seminífero, su duración permanece constante según la especie. En la rata, dura alrededor de 12, 5 a 13 días. Una espermatogonia necesita aproximadamente cinco ciclos, o sea, 65 días, para completar su diferenciación a espermatozoide y ser liberado hacia la luz del túbulo seminífero (Hermo et al. 2010).

La organización fundamental y la integridad del epitelio seminífero son proporcionadas por las células de Sertoli (Lagarrigue et al. 2011). Estas células son en la etapa adulta alargadas, de forma cilíndrica, poseen núcleo basal, grande e irregular, de forma triangular u oval, presentando un profundo repliegue en la membrana nuclear, con uno o dos nucléolos. La posición del núcleo varía de acuerdo al estadio del ciclo espermatogénico. Su citoplasma es irregular debido a que emiten numerosas prolongaciones citoplasmáticas laterales entre las células germinales, extendiéndose desde la lámina basal hacia la luz de los túbulos seminíferos, podemos observar en un primer nivel las espermatogonias, en un segundo nivel los espermatocitos y en el tercer nivel cerca del lumen del túbulo a las espermátidas y espermatozoides. Esta organización sitúa a las espermatogonias y espermatocitos jóvenes en el compartimiento basal, mientras que los espermatocitos maduros y espermátidas se encuentran en el denominado compartimiento periluminal. De esta manera, mantiene las asociaciones celulares en todo el proceso de la espermatogénesis (Hess & França 2005).

A continuación, se describen las asociaciones celulares o estadios en la rata (Leblond & Clermont 1952) (Figura 1): el estadio I se caracteriza por presentar las espermatogonias más diferenciadas o tipo A4, estas acumulan más cromatina en la membrana nuclear y el núcleo tiene forma ovoide. También observamos espermatocitos en paquiteno, y espermátidas redondas (en etapa 1) y elongadas (en etapa 15). En los estadios II y III, se observan espermatogonias tipo A1 presentan ausencia de heterocromatina y espermatogonias Intermedias, espermatocitos en paquiteno citoplasma más voluminoso, y espermátidas redondas (en etapa 2 y 3) y elongadas (en etapa 16). En los estadio IV y V, se observan espermatogonias A1, Intermedias y tipo B, espermatocitos en paquiteno, y espermátidas redondas (en etapa 4) y elongadas (en etapa 17). En los estadios VI, se observan espermatogonias tipo A1 y B, comenzándose a observar los espermatocitos pre-leptoténicos y en paquiteno, y espermátidas redondas (en etapa 6) y elongadas (en etapa 18). En los estadios VII y VIII, se observan espermatogonias tipo A1 y espermatocitos en leptoteno y paquiteno, y espermátidas elongadas (en etapa 7 y 8) y espermatozoides (en etapa 19) en la luz del túbulo, en donde ocurre la espermiación. En los estadios IX se observan espermatogonias A1, espermatocitos en leptoteno y paquiteno, y espermátidas redondas (en etapa 9). En los estadios X al XII, se observan espermatogonias tipo A2, espermatocitos en lepto-cigoteno y paquiteno, y espermátidas elongadas (en etapa 10 al 12). En los estadios XIII, se observan espermatogonias tipo A3, espermatocitos en cigoteno y diacinesis, y espermátidas elongadas (en etapa 13). Finalmente el estadio XIV, espermatogonias

tipo A3, espermatoцитos en paquiteno y espermatoцитos secundarios, y espermátidas elongadas (en etapa 14).

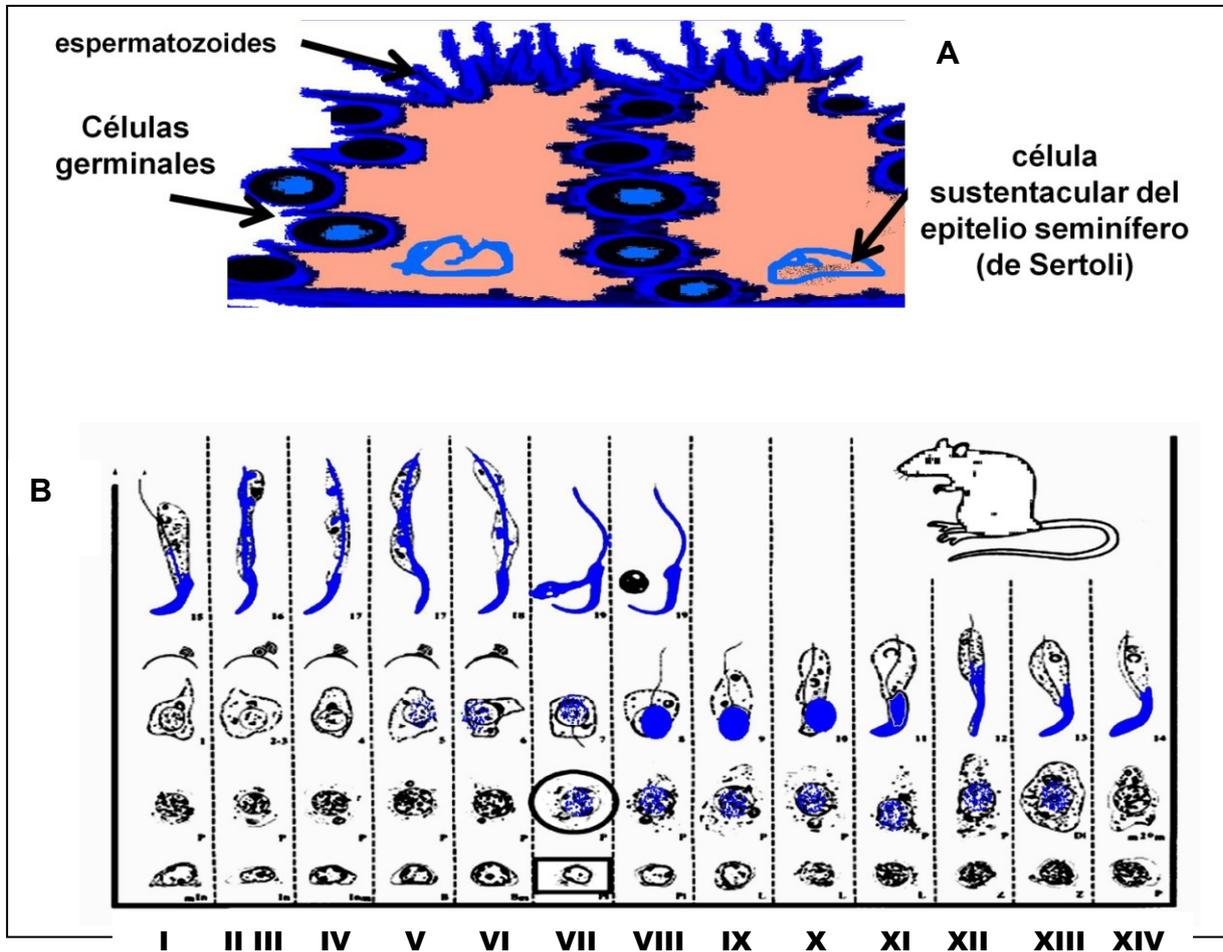


Figura 1. A- Diagrama representativo de un sector del túbulo seminífero, detallando las uniones intercelulares de dos células de Sertoli y las células germinales, rodeando el tejido intersticial adaptado de Hai y colaboradores (Hai et al. 2014). **B-** Esquema del ciclo espermatogénico en rata adaptado de Leblond y Clermont (Leblond & Clermont 1952).

2.3. Factores de crecimiento testiculares

La espermatogénesis es un proceso muy complejo, que incluye miles de genes, que pueden tener un patrón de expresión ubicua o pueden tener una función específica en los tejidos reproductivos o la espermatogénesis (Shima et al. 2004).

Los factores de crecimiento o de transcripción son proteínas especiales que participan en la activación de secuencias reguladoras y promotoras, involucradas en la síntesis de ARN mensajero de un gen dado, regulando a nivel de la transcripción del ADN. Estos factores se clasifican en basales que interactúan con la región promotora del gen, y en específicos que actúan con la región reguladora. Los factores de transcripción pueden actuar reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, uniéndose a otros factores, o uniéndose directamente a la ARN polimerasa. Los factores de transcripción son estimulados por señales citoplasmáticas. Al ser activados adquieren la capacidad de regular la expresión génica en el núcleo celular, bien activando o reprimiendo la transcripción de diversos genes (De Robertis et al. 2000).

Existe una multiplicidad de factores de crecimiento que están implicados en los mecanismos de control local a nivel testicular como ser GDNF (factor neurotrófico de células gliales), ETV 5 (ETS variante 5), FGF2 (factor de crecimiento fibroblástico 2), entre otros (Ishii et al. 2012). Se han descrito en diversas investigaciones, que las células somáticas del testículo están involucradas en la producción de factores de crecimiento, como son GDNF, Activin A y BMP4 (proteína morfo genética ósea 4), con el fin de regular el balance entre la renovación por mitosis de células madre, diferenciación celular y en el ingreso a la meiosis (Hofmann et al. 2005, Jan et al. 2012). Algunos han sido demostrado que actúa directamente en espermatogonias tal como GDNF, que regula la auto-renovación de las células madre espermatogonias (SSC) mientras que la inhibición de su diferenciación la ejerce el BMP4, que tiene tanto un efecto de proliferación y diferenciación en estas células (Rossi & Dolci 2013).

2.3.1. Factor Neurotrófico derivado de Células Gliales (GDNF)

El GDNF es un polipéptido, miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Fue encontrado por primera vez en el medio de cultivo de la línea celular B49 de rata y fue identificado como un polipéptido homodimérico de 211 aminoácidos (aa), altamente conservado (93% de homología entre el gen de la rata con el humano). La estructura del gen GDNF consta de 3 exones pequeños (20 pb, 178 pb y 498 pb) y 2 intrones de gran tamaño (4.8 kb y 8 kb) (Piña Leyva et al. 2014). Los transcritos GDNF (ARNm) se presentan como dos isoformas GDNF α y GDNF β , y la proteína GDNF es producido a partir de ambas isoformas (Trupp et al. 1995).

Los transcritos se han encontrado expresados en neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso y en varios tejidos periféricos, siendo altamente expresado en la

piel, el riñón, el estómago y los testículos, y se detectó baja expresión en el músculo esquelético, ovarios, pulmón y glándula adrenal. En estómago y riñón se justificó su expresión por su inervación simpática. Y en el caso de los testículos, en estos tejidos que no se halla inervado directamente por el tronco simpático, los órganos reproductores reciben inervación simpática del ganglio mesentérico inferior, hallándose un papel no neuronal (Trupp et al. 1995). Estudios más recientes en ratas, reafirmaron concentraciones de GDNF relativamente altas en el riñón y los testículos durante los períodos embrionarios y neonatales, respectivamente, y disminuyeron con la edad. Alcanzando un nivel máximo a alrededor del día 14 postnatal, en el cuerpo estriado, hipocampo y el tallo cerebral. Sin embargo, los niveles cerebrales fueron generalmente inferiores a los de tejidos no neurales (Katoh-Semba et al. 2007).

GDNF a nivel del sistema nervioso

Inicialmente identificado por ser un potente factor trófico que promueve la supervivencia, el mantenimiento y la reparación de las neuronas dopaminérgicas y motoras del mesencéfalo (Kubota et al. 2004). Su investigación se ha centrado en hallar un potencial terapéutico en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas (Piña Leyva et al. 2014).

GDNF a nivel testicular

GDNF fue hallado en testículos de varias especies, incluida ratón (Oatley et al. 2007) y rata (Kubota et al. 2004, Buageaw et al. 2005), bovino y en primates y humanos (Spinnler et al. 2010).

La proteína GDNF y ARNm están presentes en las células de Sertoli de ratas (Fouchécourt et al. 2006, Johnston et al. 2011). La producción de GDNF por las células de Sertoli está regulada por FSH, teniendo un papel principal en el mantenimiento y la auto-renovación de las SSC en el nicho de testículo, al menos en cultivos de células de ratones postnatales (Tadokoro et al. 2002).

Se ha demostrado en diversas investigaciones que las células de Sertoli son las principales productoras de GDNF testicular (Meng et al. 2000, Katoh-Semba et al. 2007, Hofmann 2008).

Transcriptos de GDNF

El transcrito de GDNF (ARNm) se ha encontrado expresado en células Sertoli pero no en espermatocitos ni en espermátidas, indicando que la principal fuente de GDNF en el epitelio seminífero en condiciones fisiológicas es la célula de Sertoli en animales adultos (Johnston et al. 2011). Estudios previos en ratones, demostraron la presencia de GDNF en espermátidas elongadas (Yu et al. 2003) y en las células peritubulares de testículos de ratas recién nacidas (Katoh-Semba et al. 2007).

Estudios en testículos fetales y adultos de humanos, demostraron que la expresión de GDNF puede ser detectada en las células de Leydig y células de Sertoli. Sin embargo, el alto nivel de expresión de GDNF sólo se detectó en espermátidas redondas y algunos tipos de espermatocitos, lo que sugiere que el GDNF puede desempeñar un papel esencial en la espermatogénesis y la maduración testículo; a diferencia que en testículos de rata, el receptor GFR α 1 es detectable sólo hasta día 10 postnatal en células de Sertoli. Estos hallazgos sugieren un papel crítico para GDNF durante la diferenciación de las estructuras testiculares y proporcionan evidencia de una función adicional importante en el testículo adulto de humanos y roedores (Davidoff et al. 2001). Estudios recientes en testículos de humanos, proporciona una evidencia clara de que las células peritubulares del testículo son una fuente de GDNF (Spinnler et al. 2010). A diferencia de los humanos, un estudio experimental reciente en ratones adultos ha detectado ARNm y proteína GDNF en células de Sertoli, células peritubulares pero no en células de Leydig, y la regulación de la expresión de GDNF en las células mioides peritubulares es dependiente de la testosterona, influyendo significativamente en el microambiente o nicho para el mantenimiento de SSC y prevenir la sobrepoblación de SSC en el mismo (Chen et al. 2014).

Efectos del GDNF

El GDNF tiene un marcado efecto autócrino, estimulante sobre la proliferación de las células de Sertoli durante el periodo postnatal temprano del desarrollo de los testículos de ratas, por lo que tiene un papel crucial en la espermatogénesis (Hu et al. 1999). La acción del GDNF es esencial en la regulación parácrina de auto-renovación y diferenciación en espermatogonias (Meng et al. 2000) (Figura 2). Su mecanismo de acción es a través de la señalización de c-Ret tirosina quinasa que se expresa en la espermatogonia indiferenciada A (Naughton et al. 2006) y requiere un co-receptor-ligando específico GFR α 1 (Jing et al. 1996) para promover la auto-renovación de espermatogonias (Chen & Liu 2015).

Ontogenia de la proteína GDNF en testículos durante la etapa fetal, período perinatal, puberal y adulto

Esta regulación ya se lleva a cabo por GDNF desde el período perinatal (Naughton et al. 2006). Durante el período perinatal, el balance es mayor de auto-renovación, ya que el tamaño de los testículos se establece a través de la proliferación de células de Sertoli. Por lo tanto, GDNF permite la primera ola de la espermatogénesis. En el período de la pubertad y de adultos, el tamaño de los testículos y la producción de espermatozoides alcanza una meseta, con un equilibrio entre la diferenciación de células madre y la auto-renovación, como las células de Sertoli ya no se dividen y que soporta un número fijo de células germinales (Hess et al. 2006). Puesto que la relación de las células de Sertoli y las células germinales es constante, el número de células germinales tiene que ser controlado para que coincida con la capacidad de apoyo de las células de Sertoli, que implica tanto la expansión y la muerte de las células germinales (Chiarini-Garcia et al. 2003).

Se ha realizado experimentos con ratones transgénicos que sobreexpresan GDNF, observándose acumulación de espermatogonias indiferenciada en los túbulos seminíferos lo que lleva a tumores seminomas y colapso de la espermatogénesis (Meng et al. 2000). Mientras que la espermatogénesis disminuye gradualmente en los ratones heterocigotos (GDNF+/-, fenotipo salvaje), llegan a la pubertad y son fértiles, y a medida que pasa la edad, solo las espermatogonias logran diferenciarse y el pool de SSC se agotaría, dando síndrome de sólo células de Sertoli "Sertoli cell-only syndrome" (SCOS), mientras va ocurriendo la hipospermatogénesis y la pérdida de espermatogonias, lo que lleva a la infertilidad. Los ratones GDNF-/- , mueren al nacer con insuficiencia renal y neuronal (Ishii et al. 2012, Hai et al. 2014).

Por todo lo anteriormente expuesto es que en el presente trabajo nos planteamos evaluar, en condiciones de subnutrición durante diversos momentos del desarrollo de un individuo, si a nivel testicular el GDNF se modifica y si lo hace de qué manera. Nos preguntamos si la expresión de GDNF media los procesos intrínsecos de la programación por subnutrición en el testículo de ratas.

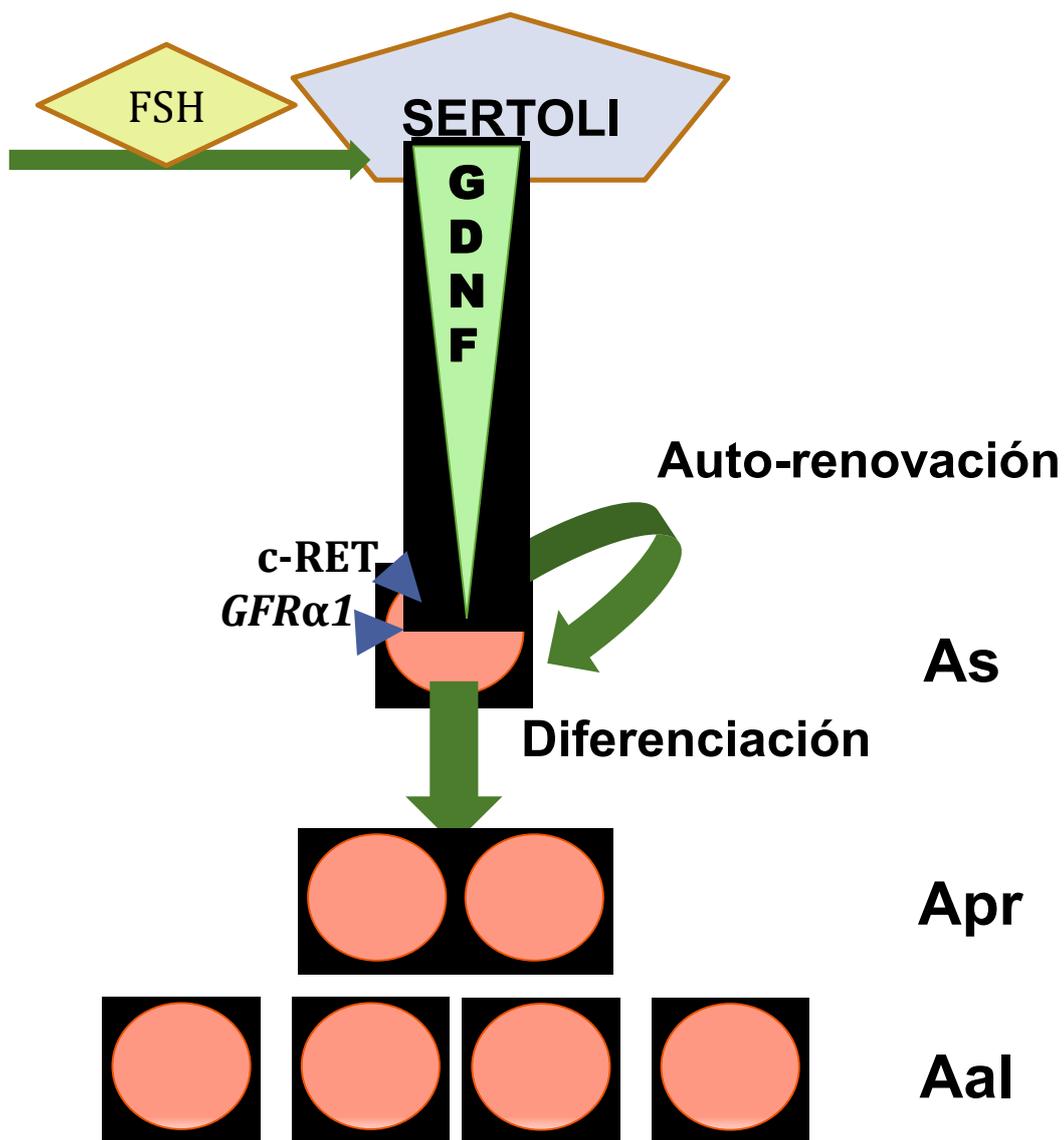


Figura 2. Esquema ilustrativo de la acción del GDNF en la regulación de la auto-renovación y diferenciación de las células madre espermatogonias (Adaptado de Jan et al. 2012).

3. HIPÓTESIS

La subnutrición en etapas claves del desarrollo, disminuye la expresión de GDNF y la espermatogénesis en testículos de animales adultos.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los factores intrínsecos del testículo que intervienen en la programación por subnutrición.

Objetivos específicos

En testículos de ratas adultas cuyas madres fueron subnutridas en la preñez, lactancia o preñez/lactancia

1. Cuantificar la inmunexpresión del Factor Neurotrófico derivado de Células Gliales (GDNF) en el túbulo seminífero.
2. Determinar el número de células de Sertoli.
3. Analizar los cambios en la morfología testicular.
4. Determinar la inmunexpresión de GDNF por estadio del ciclo espermatogénico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño experimental

Los procedimientos y el diseño experimental fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad Mc Master de Canadá.

5.2. Animales

Se utilizaron para conformar harenes hembras Wistar de 120 días de edad (n=24) apareadas con machos Wistar y mantenidos en jaulas de a dos animales, con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad con libre acceso al agua. Los machos fueron alimentados con la dieta estándar durante el período previo al apareamiento. Luego de confirmado el apareamiento, se establecieron 4 grupos de animales: 1- control: hembras mantenidas con dieta estándar durante la preñez y lactancia (proteína 18%, grasa 5%, energía digestible 3.4 kcal/gm, 18% Protein Diet, Diet 2018, Harlan Teklad Global, Blackthorn, Bicester, UK). 2-UNP: subnutridas durante la preñez: hembras alimentadas con el 50% de la dieta control en preñez. 3- UNL: subnutridas en lactancia: hembra alimentadas con el 50% de la dieta control en lactancia. 4- UNPL: subnutridas en preñez y lactancia: hembras alimentadas con el 50% de la dieta control durante preñez y lactancia. Se obtuvieron crías macho (n=40) que fueron destetados al día 22, y luego alimentados con dieta control hasta el día 160 de vida. Al día 160 postnatal los animales machos fueron sometidos al ayuno durante la toda la noche y sacrificados por decapitación luego de ser anestesiados con pentobarbital sódico intraperitoneal.

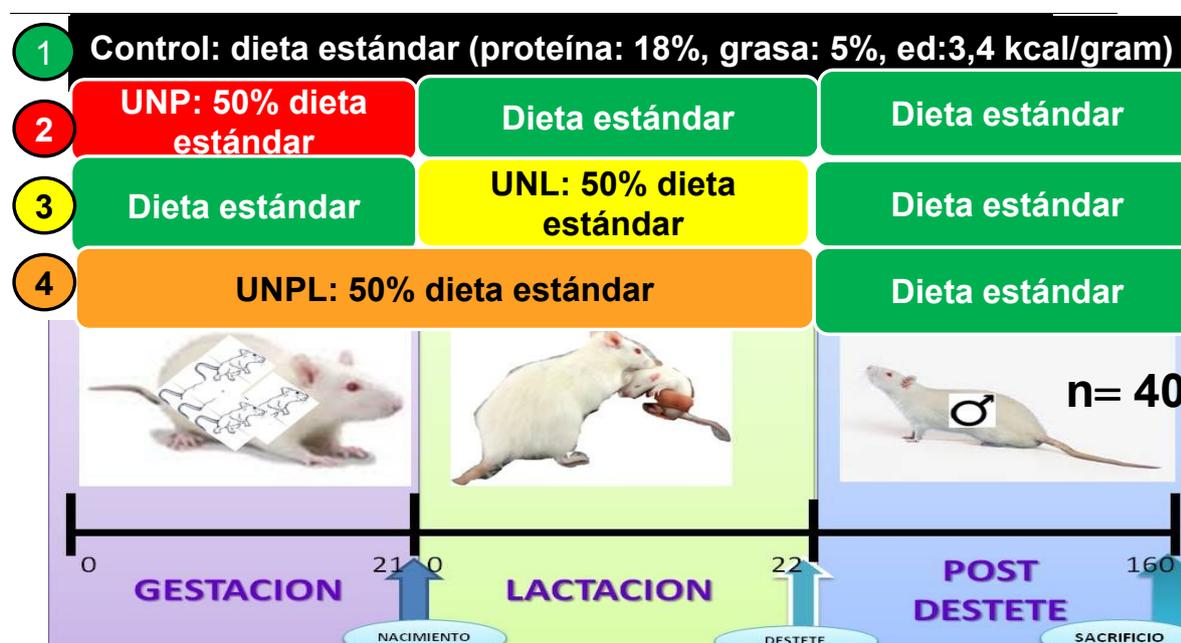


Figura 3. Esquema ilustrativo del diseño experimental del trabajo de investigación.

5.3. Procesamiento histológico

Los testículos fueron disecados, pesados, cortados y fijados en solución de formaldehído al 10% durante 12 horas y sumergidos en etanol (70, 96 y 100%), cloroformo, e incluidos e impregnados en parafinas para la confección de los bloques.

Se realizaron cortes de 5 micrómetros de espesor en micrótopo (Leica Reichert Jung Biocut 2030, Wetzlar, Alemania). Se colocaron en un baño de flotación de agua corriente a 37°C. Luego se levantaron los cortes en portaobjetos. Se procedió al secado de las láminas en estufa para evitar el desprendimiento. Se obtuvieron 20 cortes histológicos por testículo izquierdo por cada animal para el análisis morfométrico de los testículos, así como para las técnicas de inmunohistoquímica.

5.4. Técnica de inmunohistoquímica

Se realizó el desparafinado de los cortes de testículo en estufa a 60° (15 minutos), luego fue inmerso en buffer citrato y Tween 20 para culminar el desparafinado, luego se procedió a la rehidratación y recuperación antigénica en microondas a alta potencia por 3 minutos con solución buffer citrato 0,01 M pH 6.0. Posteriormente se lavó con agua destilada y luego PBS. Se procedió luego a la inactivación de peroxidasa endógenas con peróxido de hidrógeno al 3% (H₂O₂). Para el bloqueo de uniones inespecíficas se colocó sobre la lámina suero normal al 10% (15 min) o suero bloqueante. Luego se cubrieron los cortes con anticuerpo primario policlonal de conejo anti GDNF (rabbit policlonal anti GDNF, concentración 0,2mg/ml, dilución 10-20ug/ml, 1:100, ab 18956, Abcam, EEUU). Se incubó por 18 horas a 4°C en una cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno con PBS y luego colocamos el anticuerpo secundario biotinilado (concentrado, volumen 10 ml, kit mouse monoclonal HRP/DAB, ab 64259 Abcam) durante 30 minutos. Posteriormente se lavó con PBS y se colocó el complejo enzimático estreptavidina-peroxidasa (HRP/DAB detection Kit, ab 64259 Abcam, EEUU) 30 minutos y se lavó con PBS, para luego realizar el revelado con solución de cromógeno de Diaminobencidina (HRP/DAB detection Kit, ab 64259, Abcam, EEUU) de 2 minutos. Posteriormente se lavó con agua destilada y posteriormente se agregó Hematoxilina de Mayer durante 15 segundos para la contracoloración. Luego se realizó el virado en agua corriente y la posterior deshidratación en concentraciones crecientes de etanol 70, 95 y 100 %. Por último se realizó la aclaramiento con xilol, montaje con entelán y se colocaron los cubreobjetos. Para verificar la especificidad de la técnica se realizaron controles negativos reemplazando el anticuerpo primario por suero normal suero no inmune (dilución 1: 500).

5.5. Captura de imágenes de preparaciones de inmunohistoquímica

Se realizó la captura de imágenes mediante un software de captura (DinoCapture 2,0 software, AnMo Electronics Corporation, Taiwan) a través de una cámara digital (Dino-Eyepiece, AM-423X, AnMoElectronicsCorporation, Taiwan) conectada a un microscopio trinocular (Premiere Profesional, modelo MRP-5000, Manassas, EE.UU.).

Se capturaron 30 imágenes de túbulos seminíferos a menor aumento (10x) por testículo. Luego se capturaron 4 imágenes a mayor aumento (40x) del epitelio seminífero del mismo túbulo, obteniendo un total de 120 imágenes por testículo y por animal las cuales se utilizaron para los análisis morfométricos.

5.6. Análisis digital de imágenes

Se realizó el análisis semi-cuantitativo para la inmunoexpresión de GDNF, 120 imágenes por animal y por testículo (controles y tratados). Se analizó el porcentaje de área inmunomarcada e intensidad de inmunopositividad en el parénquima testicular total, intersticio (células de Leydig) y túbulos seminíferos (células Sertoli y células germinales--espermatogonias, espermatoцитos, espermátidas, espermatozoides) mediante software de análisis de imágenes (Image J 1.43m, Wayne Rasband open Source, National Institutes of Health, EEUU, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Dicho procesamiento incluyendo segmentación, binarización, umbralización y creación de macro automatizando el procesamiento de cada imagen con los parámetros de intensidad de coloración marrón (DAB positivos) seleccionados/umbralizados previamente.

Análisis morfométrico

Se midió el área y diámetro de 20 túbulos seminíferos a menor aumento (10x) en corte transversal, y la altura del epitelio seminífero desde la lámina basal a la luz del túbulo por testículo y animal con un total de 120 imágenes a mayor aumento (40x) para la evaluación de la etapa o estadio del ciclo espermatoгогénico mediante la identificación de las asociaciones celulares presentes.

Clasificación de estadios del epitelio seminífero

Las etapas del ciclo espermatoгогénico se determinaron utilizando la clasificación de estadios de I a XIV identificados para el ciclo espermatoгогénico de la rata (Leblond and Clermont, 1952 y Russell et al. (1990).

5.7. Análisis estadístico

Las variables dependientes continuas medidas fueron expresadas como medias (\pm e.e.m), siendo las siguientes: variables de inmunohistoquímica: porcentaje de área inmunomarcada e intensidad de inmunomarcación en el parénquima testicular total; variables morfométricas: área ocupada por túbulo seminífero, diámetro de túbulo seminífero, altura epitelio seminífero, conteo de células de Sertoli por túbulo seminífero. Además se determinó la frecuencia observada (relativa /absoluta) de estadios del ciclo del epitelio seminífero y se correlacionó con la inmunoexpresión de GDNF. Los resultados obtenidos se compararon mediante ANOVA considerando en el modelo el efecto del tratamiento (subnutrición en preñez: UNP, subnutrición en lactancia: UNL, subnutrición en preñez y lactancia: UNPL), Se utilizó para ello el programa estadístico (SAS; v. 9.1; SAS Institute Inc; Cary, NC, EE.UU). También se analizaron las frecuencias para los estadios celulares de la expresión de GDNF y se compararon dentro y entre grupos de subnutrición (UNP, UNL, UNPL). En todos los casos, el nivel de significación fue de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Los resultados del modelo experimental indicaron un efecto de la subnutrición en preñez, lactancia, y preñez y lactancia sobre las variables continuas: porcentaje de área inmunomarcada e intensidad de inmunomarcación en el parénquima testicular total, área y diámetro de túbulos seminíferos, altura del epitelio seminífero, y número de células de Sertoli por túbulo seminífero ($p < 0.0001$).

6.1 Resultados de inmunolocalización de GDNF en el testículo de ratas.

La inmunoexpresión de la proteína GDNF se localizó coincidentemente, tanto en testículos del grupo control y de los grupos tratados, en el parénquima testicular en los túbulos seminíferos, en el citoplasma de las células sustentaculares de Sertoli. En algunos animales de grupo control, se observa inmunoexpresión en espermatogonias, espermátocitos, espermátidas y espermatozoides (Figura 4).

Sin embargo, en los UNP se observó la expresión más intensa de GDNF en el citoplasma de Sertoli cercano a la lámina basal y respecto a las células germinales se expresó con mayor intensidad en espermatogonias y espermátidas elongadas. En cambio, en el grupo UNL, la expresión de GDNF en citoplasma de Sertoli, es uniforme, y en células germinales, se localizó con mayor intensidad en espermátocitos en leptoteno y espermátidas elongadas. Y por último, en el grupo UNPL, la expresión de GDNF en citoplasma de Sertoli, es más intensa a nivel del compartimento basal y adluminal siendo más leve en el intermedio, y respecto a las células germinales, se observó expresión de GDNF, en espermatogonias, espermátocitos en leptocigoteno, espermátidas elongadas y espermatozoides.

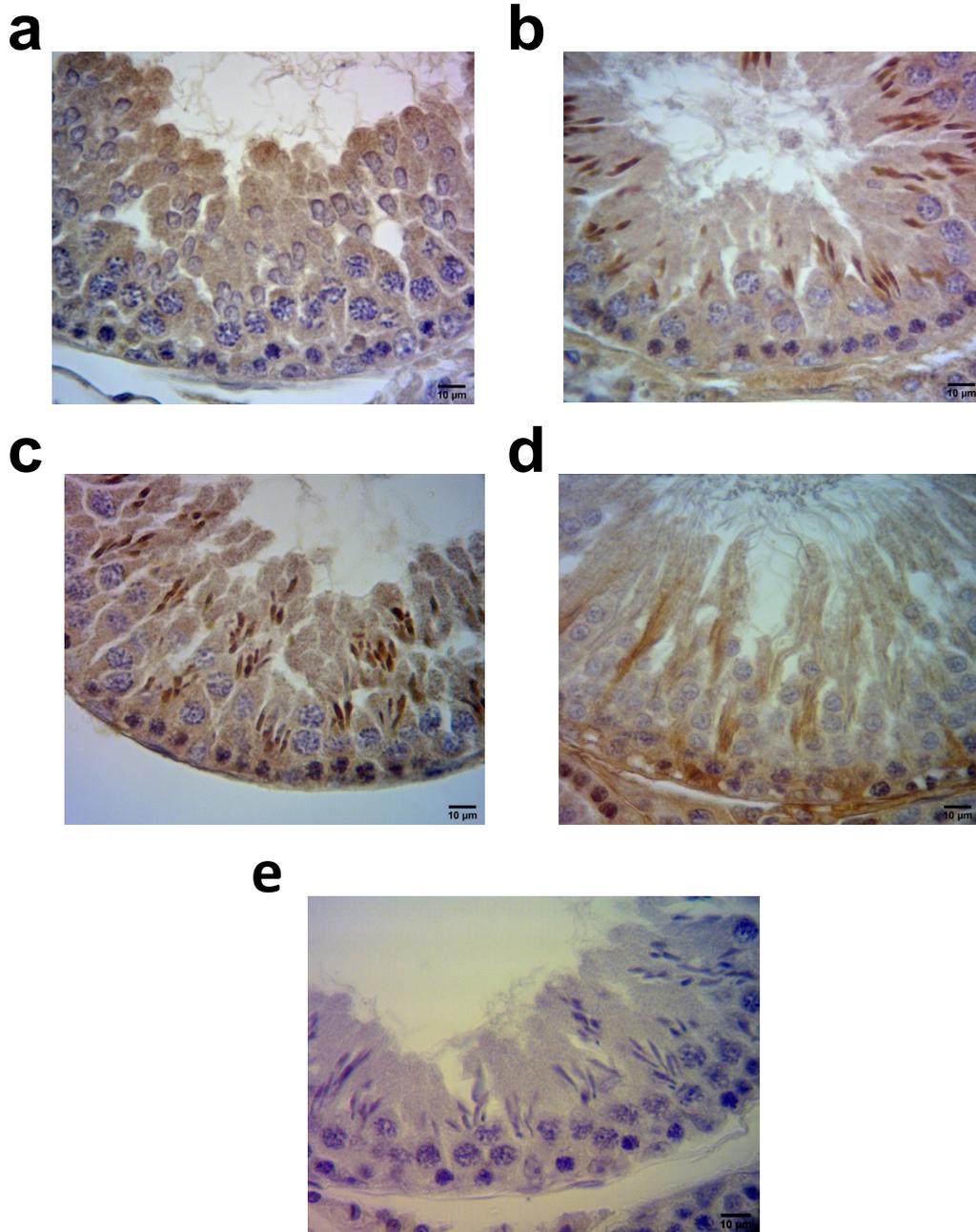


Figura 4. Imágenes representativas de la localización de la inmunoexpresión de GDNF en el testículo de ratas adultas: **a-** grupo control, **b-** grupo de ratas subnutridas durante la gestación (UNP), **c-** grupo de ratas subnutridas durante la lactancia (UNL), **d-** grupo subnutridas en preñez y lactancia (UNPL), **e-** control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Aumento 40x. Barra de escala: 10 μ .

6.2 Resultados de inmunoexpresión de GDNF en el testículo de ratas.

El **porcentaje de área inmunomarcada** de GDNF fue mayor en el grupo subnutrido en preñez (UNP) y lactancia (UNL) comparado con el grupo control ($p < 0,0001$). No se registraron diferencias entre subnutrido en preñez/lactancia (UNPL) y control (Figura 5-a).

En la **intensidad de inmunomarcación** de GDNF se incrementó durante los períodos de subnutrición en preñez (UNP) o en lactancia (UNL) respecto al grupo control, siendo el UNL más intenso que el UNP ($p < 0,0001$). En cambio el grupo UNPL fue menor que el grupo control ($p = 0,0048$) (Figura 5-b).

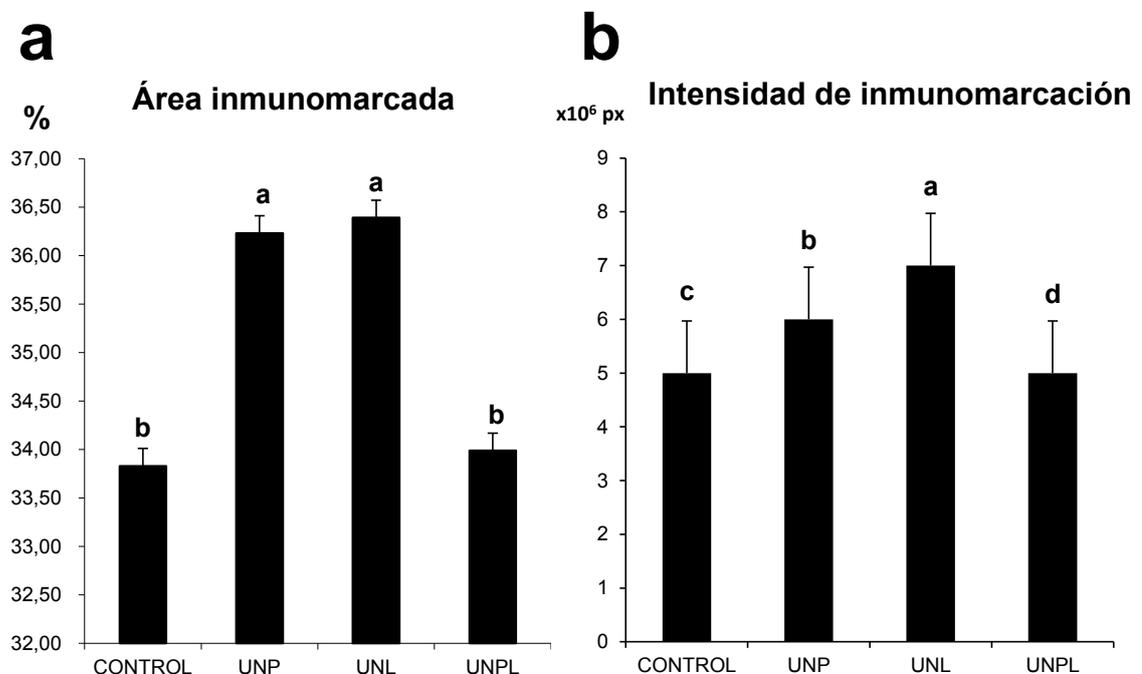


Figura 5. Cuantificación de la inmunoexpresión de GDNF en el parénquima testicular de ratas adultas subnutridas durante la gestación (UNP), lactancia (UNL), preñez y lactancia (UNPL) comparadas con el grupo control. **a-** Área inmunomarcada (%). **b-** Intensidad de inmunomarcación (media de intensidad de píxeles en unidades arbitrarias).

6.3. Resultados de variables morfométricas

El parénquima testicular de ratas adultas tanto en el grupo control como los grupos subnutridos durante la gestación (UNP), lactancia (UNL), preñez y lactancia (UNPL) evidenciaron el desarrollo de los túbulos seminíferos (Figura 6).

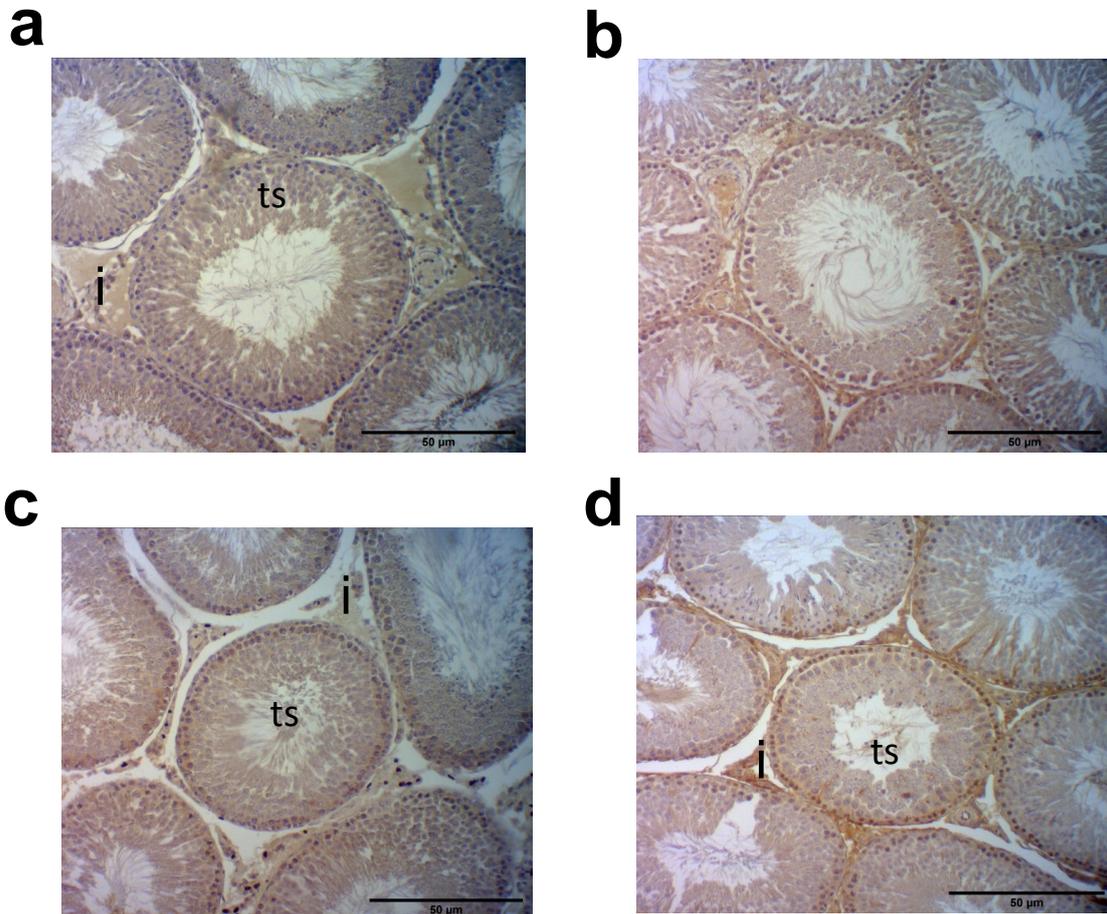


Figura 6. Imágenes representativas de parénquima testicular de ratas adultas. **a-** grupo control, **b-** grupo de ratas subnutridas durante la gestación (UNP), **c-** grupo de ratas subnutridas durante la lactancia (UNL), **d-** grupo de ratas subnutridas preñez y lactancia (UNPL). Obsérvese que la mayor parte de las imágenes se encuentran ocupadas por los túbulos seminíferos (ts), rodeados por tejido intersticial (i). Note que en las imágenes se observa en localización central un túbulo seminífero (ts) en corte transversal. Se evidencia los túbulos seminífero (ts) en **c y d** de menor área y diámetro que los túbulos en **a y b**. Aumento 10x. Barra de escala: 50 µ.

6.3.1. Resultados de área ocupada por túbulos seminíferos

Los grupos subnutridos en lactancia (UNL) y en preñez/lactancia (UNPL), muestran una menor área ocupada por túbulos seminíferos respecto al control ($p < 0,0001$). En el grupo subnutrido en preñez (UNP), no se registraron diferencias respecto al grupo control (Figura 7-a).

6.3.2. Resultados de diámetro de túbulos seminíferos

Los grupos subnutridos UNL y UNPL presentaron un menor diámetro de los túbulos seminíferos comparando con el grupo control y el grupo UNP ($p < 0,0001$), siendo UNL de mayor diámetro que el UNPL ($p < 0,0001$). Entre el grupo UNP y el grupo control no se muestran diferencias (Figura 7-b).

6.3.3. Resultados de altura de epitelio seminífero de testículo de ratas.

La altura del epitelio seminífero fue mayor en el grupo subnutrido en lactancia (UNL) comparado con el grupo control ($p < 0,0212$). Se registró en los grupos subnutridos en preñez (UNP) y en preñez/lactancia (UNPL) un epitelio seminífero más bajo respecto al grupo control ($p < 0,01$) (Figura 7-c).

6.3.4. Resultados del conteo de células de Sertoli por túbulo seminífero en el testículo de ratas.

El total de las células de Sertoli por túbulo seminífero fue mayor en el grupo subnutrido en preñez (UNP) respecto al grupo control (13,4 *versus* 11,9 células de Sertoli/túbulo; $p < 0,0001$), así como el grupo subnutrido en lactación (UNL) (13; $p = 0,0019$) y en el grupo subnutrido en preñez/lactancia (UNPL), siendo este último el más elevado (14,4; $p < 0,0001$) de los grupos subnutridos (Figura 7-d).

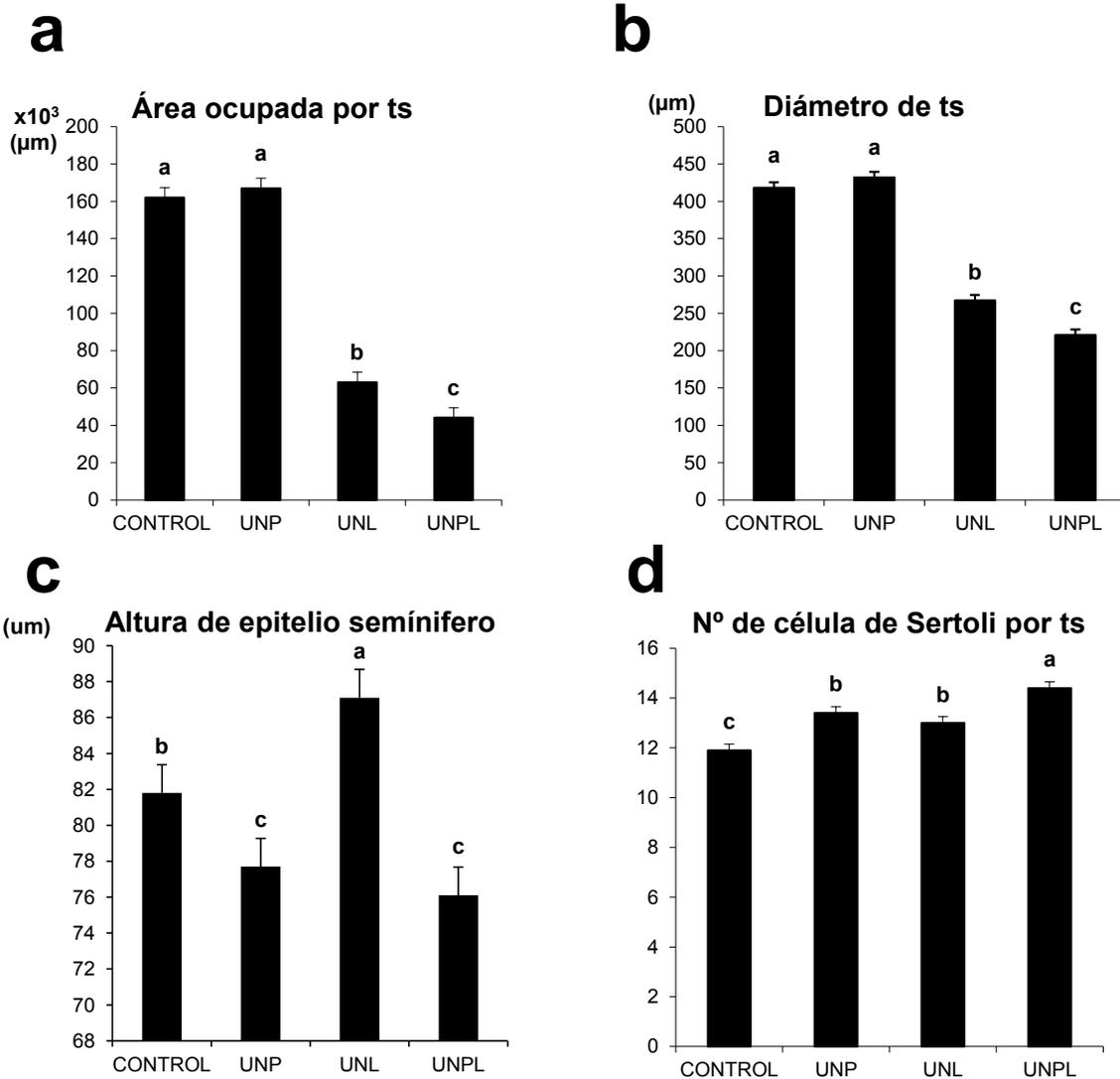


Figura 7. Análisis morfométrico de los túbulos seminíferos de testículos de ratas adultas. Mediciones de: **a-** Área ocupada por los túbulos seminíferos (μm^2). **b-** diámetro de los túbulos seminíferos (μm), **c-** altura del epitelio seminífero (μm), **d-** conteo del número de células de Sertoli por túbulo seminífero (ts), realizadas en grupos de ratas subnutridas durante la gestación (UNP), lactancia (UNL), preñez y lactancia (UNPL) comparadas con el grupo control.

6.4. Frecuencias observadas de estadios del ciclo espermatogénico en animales del grupo control y los grupos en tratamiento

Se observaron asociaciones celulares desde el estadio I al XIV en el grupo control y se los comparó con los grupos subnutridos. Se realizó la prueba de independencia de Chi-Cuadrado. Para ello se realizó el procedimiento de tabulación cruzada - estadio por tratamiento (Variable para Filas: estadio, Variable para Columnas: tratamiento). Puesto que el valor-P fue menor que 0,05 se rechaza la hipótesis de que filas y columnas son independientes con un nivel de confianza del 95,0%. Por lo tanto, el valor observado de estadio para un caso en particular, está relacionado con su valor en tratamiento.

En el grupo control el estadio espermatogénico VII (18%) tuvo la frecuencia más alta y los más bajos fueron I y II (1%), entre los túbulos seminíferos observados (Figura 8-a).

En los grupos subnutridos se registró diferencias comparando con el grupo control, en todos los estadios estudiados del I al XIV, siendo las frecuencias en grupos subnutridos más altas en II, III y IX y XIII, y más baja en VI, VII VIII, XI y XII comparando con el grupo control ($p= 0,0019$).

En el grupo subnutrido en preñez, el estadio espermatogénico V fue el más observado en los túbulos seminíferos (18%) siendo mayor la frecuencia de observación que el grupo control. Las frecuencias observadas disminuyen en los estadios VI, VII y VIII en los grupos subnutridos comparando con el control (Figura 8-b).

En el grupo subnutrido en lactancia, los estadios espermatogénico IV y V (17%) tuvieron las frecuencias más altas en los túbulos seminíferos observados, comparado con el grupo control, registrándose una disminución de la frecuencia en el estadio IV (11%), no marcándose diferencias en el estadio V. Se evidencian entre los aumentados los estadios IV, IX y XIII, y marcadamente disminuidos los estadios VII, VIII, X y XII (Figura 8-c).

En el grupo subnutrido en preñez/lactancia, los estadios espermatogénico V y VII (16%) tuvieron las frecuencias más altas en los túbulos seminíferos observados, comparado con el grupo control no se registro diferencias. No se registró diferencias con las frecuencias más bajas. Entre las frecuencias observadas aumentadas moderadamente el estadio IX, y marcadamente incrementado los estadios XIII y IV, y disminuidos levemente los estadios VII y VIII, y disminuidos los estadios VI y XII (Figura 8-d).

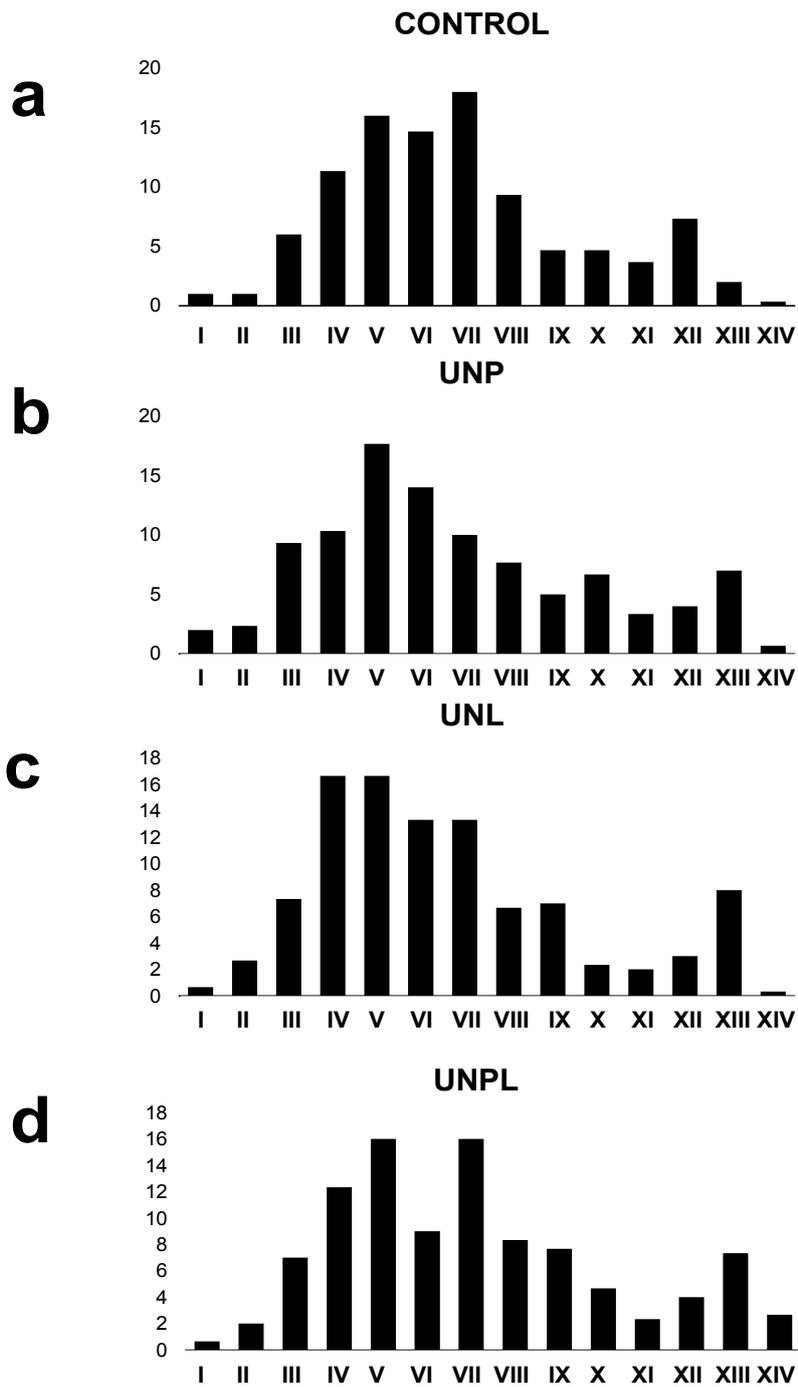


Figura 8. Determinación de frecuencias observadas de estadios celulares del I al XIV observados en túbulos seminíferos de ratas adultas (I-XIV) **a-** control (CONTROL) y subnutridas **b-** durante la gestación (UNP), **c-** durante la lactancia (UNL), **d-** preñez y lactancia (UNPL).

6.5. Resultados de inmunexpresión de GDNF y su correlación con los estadios del ciclo espermatogénico

En los estadios IV, V, VI, VII, IX, XII y XIII, se registraron diferencias significativas entre los grupos subnutridos con el grupo control (Figura 9).

La inmunexpresión de GDNF en el estadio IV fue mayor en los grupos UNP ($p < 0,0049$) y UNL ($p < 0,0025$) respecto al grupo control. En cambio, el grupo UNPL no mostró diferencias significativas con el grupo control. Lo mismo ocurre en el estadio V donde fue mayor la inmunexpresión de GDNF en UNP ($p < 0,0015$) y UNL ($p < 0,0146$) y no se registró diferencias significativas en el grupo UNPL respecto al grupo control.

La inmunexpresión de GDNF en el estadio VI fue mayor en el grupo UNL ($p < 0,0083$) respecto al grupo control. En los grupos UNP y UNPL no mostraron diferencias significativas con el grupo control. Sin embargo, entre los grupos subnutridos, el grupo UNP fue mayor al UNPL ($p < 0,0310$), al igual que UNL ($p < 0,0010$), mientras que UNP y UNL, no evidenciaron variaciones significativas.

La inmunexpresión de GDNF en estadio VII fue mayor en los grupos UNP ($p < 0,0036$), UNL ($p < 0,0001$) y UNPL ($p < 0,0561$) comparando con el grupo control. En ese mismo estadio VII comparando entre los grupos subnutridos la mayor expresión de GDNF fue en el grupo UNL respecto al grupo UNPL ($p < 0,0063$).

La inmunexpresión de GDNF en el estadio IX fue mayor en los grupos UNP ($p < 0,0247$) y UNL ($p < 0,0513$) respecto al grupo control. Mientras el grupo UNPL no mostró diferencias significativas con el grupo control.

La inmunexpresión de GDNF en el estadio XII fue menor en el grupo UNPL ($p < 0,0438$) respecto al grupo control, y también respecto a UNP ($p < 0,0429$) y UNL ($p < 0,0554$). Mientras los grupos UNP y UNL no mostraron diferencias significativas con el grupo control. Lo mismo sucede en el estadio XIII donde fue menor en el grupo UNPL ($p < 0,0066$) respecto al grupo control, y también respecto a UNP ($p < 0,0002$) y UNL ($p < 0,0015$). Mientras los grupos UNP y UNL no mostraron diferencias significativas con el grupo control.

En los estadios I, II, III, VIII, X, XI y XIV, no evidenciaron diferencias significativas con el grupo control.

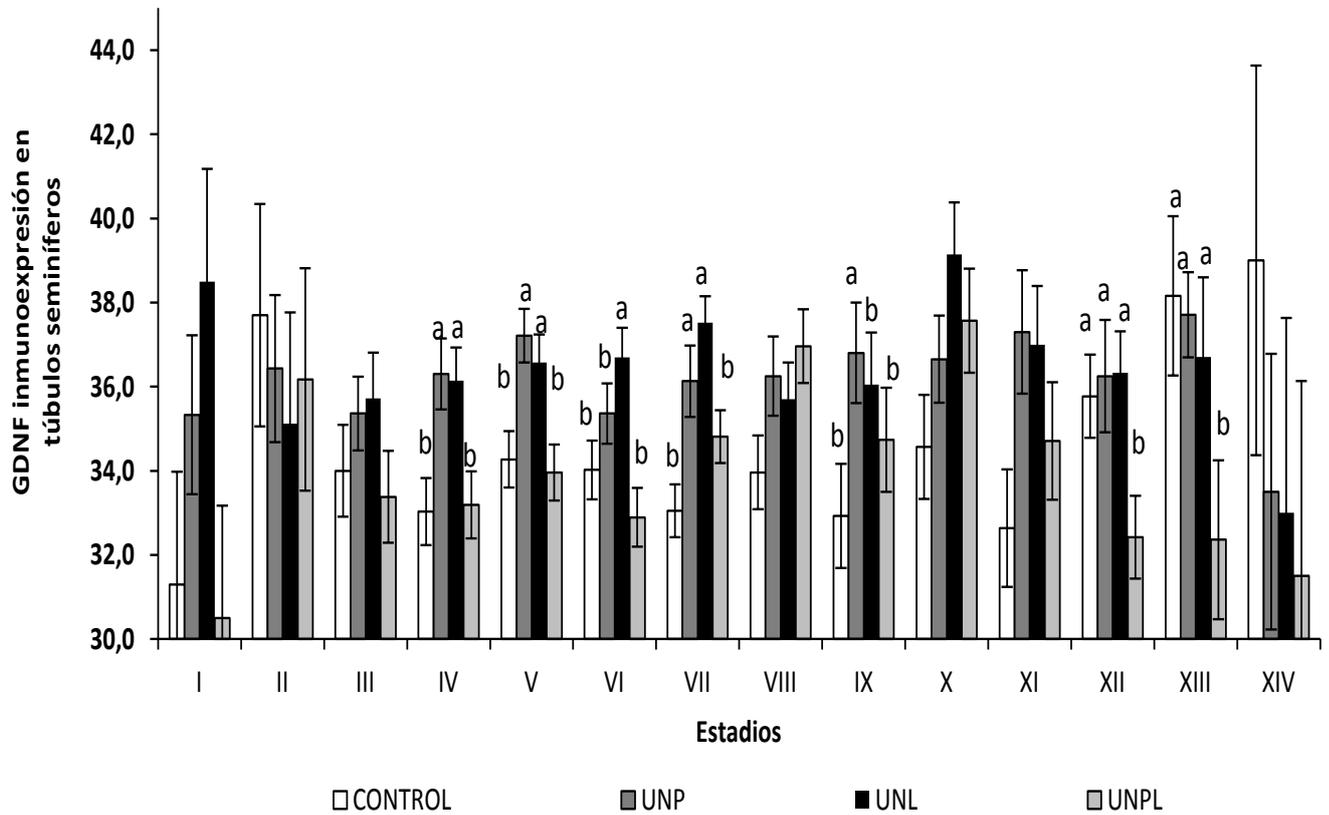


Figura 9. Análisis comparativo de la inmunoexpresión de GDNF según estadio del epitelio seminífero en animales subnutridos durante la gestación (UNP), lactancia (UNL), preñez y lactancia (UNPL) comparadas con el grupo control. Diferentes literales indican diferencias significativas entre grupos para un mismo estadio ($p < 0,05$).

7. DISCUSIÓN

1- ¿Cómo la subnutrición afectó la expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) en el testículo?

La inmuno localización observada coincide con estudios previos donde se localizó al GDNF en células de Sertoli y células germinales como paquitenos y espermátidas (Fouchécourt et al. 2006, Caires et al. 2010). En otras investigaciones, se describe que en condiciones fisiológicas la única fuente de GDNF son las células de Sertoli, sin embargo bajo condiciones de estrés se altera su expresión génica (Johnston et al. 2011).

Nuestros resultados mostraron la sobre expresión de GDNF en testículo de crías de ratas adultas nacidos de madres subnutridas durante la gestación o durante la lactancia. Un aumento de GDNF en condiciones de subnutrición podría generar un desbalance, al estimular la exagerada proliferación de células germinales generando mayor número de células y por lo tanto desbordando la capacidad de Sertoli de albergar y sostenerlas metabólicamente. Estudios previos demostraron que una sobre expresión de GDNF altera la espermatogénesis y causa tumor de células germinales no metastásico por hiperproliferación de espermatogonias (Meng et al. 2000). Nuestros resultados obtenidos coinciden con esta aseveración, dado que en el presente estudio observamos cambios no solo en la expresión de GDNF en crías de madres subnutridas durante diversos períodos del desarrollo, sino que observamos cambios en su morfología y en la frecuencia de asociaciones celulares en el epitelio seminífero, señal que evidencia cambios en la espermatogénesis.

En cuanto a la sobre expresión de GDNF, esta depende del momento de la subnutrición, con posibles repercusiones posteriores en la espermatogénesis. Sin embargo la expresión en animales subnutridos durante todas las etapas parece generar un fenómeno de habituación a dichas condiciones de subnutrición.

Otro experimento mostró resultados en la descendencia de madres que fueron sometidos a subnutrición durante la lactancia presentando aumento en la concentración sérica de leptina, siendo ésta un potente estimulador de la producción de LH y FSH (Teixeira et al. 2007), este dato nos coincide con nuestro aumento de GDNF que actúa en sinergismo con FSH.

2- ¿Cómo afectó la subnutrición durante períodos de desarrollo pre y posnatal a la estructura testicular – citoarquitectura testicular?

La subnutrición materna no afectó el desarrollo normal de túbulos seminíferos en crías adultas.

Las crías de madres subnutridas en lactancia son más afectadas por la nutrición, disminuyendo el diámetro de túbulos seminíferos y por ende el área ocupada por los túbulos. Sin embargo, las crías de madres subnutridas en preñez no ven afectado su diámetro. Por lo que, la madre no compensa su falta de nutrición en ella, por más que su objetivo sea nutrir al lactante, no logra ajustar los requerimientos del crecimiento de sus crías. La producción de leche durante la lactancia en condiciones de subnutrición en la rata afecta quizás la cantidad y la calidad, por lo que las crías no reciben buena nutrición produciéndose por lo tanto un efecto negativo sobre la morfología testicular. Siguiendo la misma línea de interpretación, los animales subnutridos durante preñez y lactancia, muestran una marcada disminución del diámetro de los túbulos seminíferos al igual que los solamente subnutridos en lactancia. Nuestros resultados coinciden con datos de animales prepuberales con restricción de proteína materna, que también produce disminución del diámetro de los túbulos seminíferos (Leonhardt 2002, Ramos et al. 2006, Rodríguez-González et al. 2012). Un estudio reciente sostiene que el diámetro de los túbulos seminíferos en los animales adultos está altamente correlacionado con el número de células germinales (Kotsampasi et al. 2009). Mientras que otra investigación, relacionó la dependencia de la altura del epitelio germinal con los estadios celulares en los túbulos seminíferos de rata en condiciones fisiológicas (Wing & Christensen 1982).

3- ¿Cómo afectó la subnutrición a las células de Sertoli?

Nuestros datos registraron, un aumento del GDNF concomitante con un aumento del número de células de Sertoli, tanto en animales con subnutrición materna durante la gestación y durante la lactancia, coincidiendo con la influencia registrada en otros estudios de GDNF sobre la proliferación de Sertoli (Yang & Han 2010). También se registró en células aisladas de gonadas de ratones que GDNF estimula la mitosis de células de Sertoli (Wu et al. 2005), y otras investigaciones también en ratones detectaron los transcritos (ARNm) de GDNF y a sus receptores (GFR α 1 y Ret) en la cresta urogenital y testículos antes y después del nacimiento por métodos de Hibridación in situ (Golden et al. 1999), registrándose su disminución a partir de la primera semana post-natal (Hu et al. 1999). Luego en el adulto influye en las células de la línea germinal como las espermatogonias indiferenciadas (Meng et al. 2000, Skinner et al. 2005).

Por otra parte es sabido que existe una correlación entre el número de células de Sertoli con el desarrollo de la espermatogénesis normal, descrito en varias especies de animales (Johnston et al. 2008). Solo el aumento del número de las células de Sertoli no es representativo de una adecuada espermatogénesis. Por el contrario estudios diversos indican que en fenotipos de testículos con sólo células de Sertoli se produce alteración de la espermatogénesis, como sucede en animales knockout de GDNF, donde se observa pérdida de espermatogonias, resultando en un fenotipo de “células de Sertoli solamente” (Meng et al. 2000).

Nuestros resultados muestran un aumento del número de células de Sertoli en adultos de los grupos subnutridos en distintos períodos del desarrollo pre y postnatal, lo que indica que hubo una alteración del proceso de multiplicación celular de Sertoli durante la vida, pre o postnatal prepuberal, donde se han descrito el desarrollo de las mismas. Estos datos contrastan con los resultados de disminución del número de células de Sertoli (10.53 ± 0.13 en dieta hipo proteica versus 11.45 ± 0.1 en controles con dieta estándar) en ratas con restricción de proteínas durante la gestación (Toledo et al. 2011), ni con estudios previos en ratas subnutridas (Genovese et al. 2010). Esto podría explicarse probablemente por las diferencias en el modelo experimental utilizado, el número de animales que utilizaron en dichos experimentos y que la edad de los animales, el tiempo, y el tipo de subnutrición fueron otros, y son todos ellos factores importantes que podrían influir en los animales en el número de células de Sertoli finalmente obtenido.

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

4- ¿Qué ocurrió con la frecuencia de los estadios del ciclo espermatogénico en animales subnutridos?

Con respecto a los estadios del ciclo espermatogénico nuestros datos en animales control coinciden con lo observado en ratas adultas, donde el estadio VII es el más frecuentemente observado, por ser el de mayor duración (Hess et al. 1990). Por otra parte también estudios previos demostraron que en condiciones de tratamiento farmacológico, se altera esta frecuencia del estadio VII, tal como ocurre en nuestro presente estudio en los testículos de animales subnutridos (Johnston et al. 2008).

La programación por subnutrición alteró la frecuencia en todos los estadios del ciclo espermatogénico, aumentando unos y disminuyendo otros, según el momento del desarrollo cuando ocurre la subnutrición en ratas, lo que sugiere una alteración en el ciclo espermatogénico.

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

Nuestros resultados de los animales control coinciden con estudios previos donde se observó que la distribución de GDNF en las células de Sertoli está fuertemente relacionado a la expresión de ARNm de GDNF y la distribución de proteína GDNF dentro del citoplasma de las células de Sertoli, variando asimismo con el estadio donde es máxima su expresión entre XIII- I, y va decreciendo hacia el estadio VII (Johnston et al. 2011). También coincidimos con otro estudio, en el que se encontró la expresión de ARNm y la proteína GDNF, secretada por las células de Sertoli es dependiente de la etapa del ciclo espermatogénico, siendo máxima en las etapas II-VI y alcanza un mínimo en las etapas IX-XI (Grasso et al. 2012).

Estos datos apoyan la hipótesis de algunos trabajos de investigación que los cambios cíclicos en la expresión de GDNF por las células de Sertoli son responsables de la etapa específica y de la diferenciación de espermatogonias madre, las células fundamentales de la espermatogénesis.

En base a nuestros resultados de los animales que sus madres fueron subnutridas, podemos sugerir que la subnutrición materna modifica la inmunoexpresión de GDNF en el túbulo seminífero de testículos de crías, y que está vinculado al estadio en que se encuentre el túbulo seminífero, sobreexpresándose durante los estadios III al XI donde normalmente se produce un descenso en la expresión de GDNF.

Por lo tanto nuestros estudios reafirman la hipótesis de programación por subnutrición, en función de las modificaciones en la ***expresión de GDNF, un importante factor de transcripción producido por la célula de Sertoli y que modifica a su vez los estadios del ciclo espermatogénico.***

La importancia de nuestros resultados abarcan un interés amplio tanto en medicina veterinaria como humana, dado que el GDNF está presente en el mantenimiento de espermatogonias de nuestro modelo biológico y el hombre (Chen & Liu 2015).

8. CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que existe efecto de la subnutrición durante la preñez, lactancia y preñez/lactancia sobre la inmunoexpresión de la proteína de GDNF en el parénquima testicular y sobre la estructura testicular afectando el diámetro de los túbulo seminíferos, su epitelio seminífero, sus células sustentaculares y en los estadios del ciclo espermatogénico. Por lo tanto la subnutrición durante diferentes períodos del desarrollo pre y posnatal altera la morfología testicular, así como el proceso de la espermatogénesis.

Estas modificaciones tienen como base, factores moleculares como el factor neurotrófico derivado de células gliales GDNF, modificando su expresión en células testiculares. Por lo tanto se concluye que la subnutrición diferencial en la preñez, lactancia y en ambos períodos regula la expresión del GDNF, siendo este uno de los mecanismos intrínsecos promotores de los cambios observados a nivel de los túbulos seminíferos.

Los avances generados en este estudio de mecanismos moleculares que se producen a nivel testicular por la subnutrición nos permiten identificar al GDNF como biomarcador para la detección de alteraciones en la espermatogénesis en el adulto.

Estudios a futuro cuantitativos a través de otras metodologías como citometría de flujo podrían confirmar si el número de células de Sertoli y de células germinales está también afectado en estas condiciones de subnutrición, a largo plazo de la vida adulta por la subnutrición durante distintas etapas del desarrollo. Resta aún por analizar en su conjunto los procesos de apoptosis y proliferación celular y diferenciación celular y cómo se modifican en condiciones de subnutrición.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Abecia J-A, Sosa C, Forcada F, Meikle A (2006). The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 367–378.
- 2) Andrade LP, Rhind SM, Rae MT, Kyle CE, Jowett J, Lea RG (2013). Maternal undernutrition does not alter Sertoli cell numbers or the expression of key developmental markers in the mid-gestation ovine fetal testis. *J. Negat. Results Biomed.* 12:2: 1–8.
- 3) Barker DJP (2007). The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261: 412–417.
- 4) Barker DJ, Bull a R, Osmond C, Simmonds SJ (1990). Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 301: 259–262.
- 5) Barker DJ, Clark PM (1997). Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev. Reprod.* 2: 105–112.
- 6) Bielli A, Pérez R, Pedrana G, Milton JTB, Lopez A, Blackberry MA, Duncombe G, Rodriguez-Martinez H, Martin GB (2002). Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod. Fertil. Dev.* 14: 333–337.
- 7) Brenseke B, Prater MR, Bahamonde J, Gutierrez JC, Brenseke B, Prater MR, Bahamonde J, Gutierrez JC (2013). Current Thoughts on Maternal Nutrition and Fetal Programming of the Metabolic Syndrome. *J. Pregnancy* 2013: 1–13.
- 8) Bugeaw A, Sukhwani M, Ben-Yehudah A, Ehmcke J, Rawe VY, Pholpramool C, Orwig KE, Schlatt S (2005). GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biol. Reprod.* 73: 1011–1016.
- 9) Caires K, Broady J, McLean D (2010). Maintaining the male germline: Regulation of spermatogonial stem cells. *J. Endocrinol.* 205: 133–145.
- 10) Chen LY, Brown PR, Willis WB, Eddy EM 2014. Peritubular myoid cells participate in male mouse spermatogonial stem cell maintenance. *Endocrinology* 155: 4964–4974.
- 11) Chen SR, Liu YX (2015). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction* 149: R159–R167.
- 12) Cheng CY, Mruk DD (2010). The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365: 1459–1463.
- 13) Chiarini-Garcia H, Raymer AM, Russell LD (2003). Non-random distribution of spermatogonia in rats: Evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* 126: 669–680.
- 14) Davidoff MS, Middendorff R, Koeva Y, Pusch W, Jezek D, Müller D (2001). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptors GFRalpha-1 and GFRalpha-2 in the human testis. *Ital. J. Anat. Embryol.* 106: 173–180.
- 15) Davies MJ, Norman RJ (2002). Programming and reproductive functioning. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 386–392.
- 16) Deligeorgis SG (Agricultural U of A (Greece). D of AB and H, Chadio S, Menegatos J (1996). Pituitary responsiveness to GnRH in lambs undernourished during fetal life. *Anim. Reprod. Sci.* 43: 113–121.
- 17) Dupont C, Cordier AG, Junien C, Mandon-Pépin B, Levy R, Chavatte-Palmer P (2012). Maternal environment and the reproductive function of the offspring.

- Theriogenology* 78: 1405–1414.
- 18) Evans NP, Bellingham M, Robinson JE (2016). Prenatal programming of neuroendocrine reproductive function. *Theriogenology* 86: 1–9.
 - 19) Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE (2010). Early life nutrition and metabolic programming. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212: 78–96.
 - 20) Fouchécourt S, Godet M, Sabido O, Durand P (2006). Glial cell-line-derived neurotropic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis. *J. Endocrinol.* 190: 59–71.
 - 21) Fowden AL, Forhead AJ (2004). Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* 127: 515–526.
 - 22) França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD (1998). Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.* 59: 1371–1377.
 - 23) Genovese P, Núñez ME, Pombo C, Bielli A (2010). Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of sertoli cells in the adult rat. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 233–236.
 - 24) Godfrey KM (1998). Maternal regulation of fetal development and health in adult life. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 78: 141–150.
 - 25) Golden JP, Demaro JA, Osborne PA, Milbrandt J, Johnson EM (1999). Expression of Neurturin, GDNF, and GDNF Family-Receptor mRNA in the Developing and Mature Mouse. *Exp. Neurol.* 158: 504–528.
 - 26) Grasso M, Fuso A, Doveire L, Rooij DG De, Stefanini M, Boitani C, Vicini E (2012). Distribution of GFRA1-expressing spermatogonia in adult mouse testis. *Reproduction* 143: 325–332.
 - 27) Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, He Z (2014). The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 29: 66–75.
 - 28) Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE (2010). Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatocytes. *Microsc. Res. Tech.* 73: 243–278.
 - 29) Hess R a, Cooke PS, Hofmann M-C, Murphy KM (2006). Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle* 5: 1164–1170.
 - 30) Hess RA, França LR 2005. Structure of the Sertoli Cell. In: *Sertoli Cell Biol.*, Elsevier, pp. 19–40.
 - 31) Hess RA, Franca LR De (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv. Exp. Med. Biol.* 636: 1–15.
 - 32) Hess RA, Schaeffer DJ, Eroschenko VP, Keen JE (1990). Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biol. Reprod.* 43: 517–524.
 - 33) Hofmann M-C (2008). Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol. Cell. Endocrinol.* 288: 95–103.
 - 34) Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M (2005). Isolation of male germ-line stem cells; Influence of GDNF. *Dev. Biol.* 279: 114–124.
 - 35) Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH (2009). Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J. Physiol.* 587: 905–915.

- 36)Hu J, Shima H, Nakagawa H (1999). Glial cell line-derived neurotropic factor stimulates sertoli cell proliferation in the early postnatal period of rat testis development. *Endocrinology* 140: 3416–3421.
- 37)Ishii K, Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T (2012). FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. *Development* 139: 1734–1743.
- 38)Jan SZ, Hamer G, Repping S, Rooij DG de, Pelt AMM Van, Vormer TL (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822: 1838–1850.
- 39)Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altroch BW, Fox GM (1996). GDNF-induced activation of the Ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell* 85: 1113–1124.
- 40)Johnston DS, Olivas E, DiCandeloro P, Wright WW (2011). Stage-Specific Changes in GDNF Expression by Rat Sertoli Cells: A Possible Regulator of the Replication and Differentiation of Stem Spermatogonia. *Biol. Reprod.* 85: 763–769.
- 41)Johnston DS, Wright WW, Dicandeloro P, Wilson E, Kopf GS, Jelinsky SA (2008). Stage-specific gene expression is a fundamental characteristic of rat spermatogenic cells and Sertoli cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 8315–8320.
- 42)Junqueira LCU, Carneiro J (2006). *Histología básica : [texto y atlas]*. Barcelona. Elsevier Masson. 415-425.
- 43)Katoh-Semba R, Tsuzuki M, Miyazaki N, Yoshida A, Nakajima H, Nakagawa C, Kitajima S, Matsuda M (2007). Distribution and immunohistochemical localization of GDNF protein in selected neural and non-neural tissues of rats during development and changes in unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Neurosci. Res.* 59: 277–287.
- 44)Kopera I a, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD (2010). Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365: 1593–1605.
- 45)Kotsampasi B, Balaskas C, Papadomichelakis G, Chadio SE (2009). Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Anim. Reprod. Sci.* 114: 135–147.
- 46)Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 16489–16494.
- 47)Lagarrigue M, Becker M, Lavigne R, Deininger S-O, Walch A, Aubry F, Suckau D, Pineau C (2011). Revisiting rat spermatogenesis with MALDI imaging at 20-microm resolution. *Mol. Cell. Proteomics* 10: M110.005991.
- 48)Lagos-Cabré R, Moreno RD (2008). Mitotic, but not meiotic, oriented cell divisions in rat spermatogenesis. *Reproduction* 135: 471–478.
- 49)Lakshmy R (2013). Metabolic syndrome: Role of maternal undernutrition and fetal programming. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 14: 229–240.
- 50)Langley-Evans SC (2001). Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 60: 505–513.
- 51)Leblond C, Clermont Y (1952). Part 1. Spermatogenesis and Sperm Maturation.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 55: 548–573.

- 52) Leonhardt M (2002). Effects of Perinatal Maternal Food Restriction on Pituitary-Gonadal Axis and Plasma Leptin Level in Rat Pup at Birth and Weaning and on Timing of Puberty. *Biol. Reprod.* 68: 390–400.
- 53) Lesage J, Hahn D, Léonhardt M, Blondeau B, Bréant B, Dupouy JP (2002). Maternal undernutrition during late gestation-induced intrauterine growth restriction in the rat is associated with impaired placental GLUT3 expression, but does not correlate with endogenous corticosterone levels. *J. Endocrinol.* 174: 37–43.
- 54) Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, Rooij DG de, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Saini K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Mart S, Sariola H (2000). Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by GDNF. *Science.* 287: 1489–1493.
- 55) Mossa F, Walsh SW, Ireland JJ, Evans ACO (2015). Early nutritional programming and progeny performance: Is reproductive success already set at birth? *Anim. Front.* 5: 18–24.
- 56) Naughton CK, Jain S, Strickland AM, Gupta A, Milbrandt J (2006). Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol. Reprod.* 74: 314–321.
- 57) O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI (2006). Endocrine regulation of spermatogenesis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.* St. Louis, Elsevier. 1: 1017-1069.
- 58) Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL (2007). Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 282: 25842–25851.
- 59) Pedrana G, Sloboda DM, Pérez W, Newnham JP, Bielli A, Martin GB (2008). Effects of Pre-natal Glucocorticoids on Testicular Development in Sheep. *Anat. Histol. Embryol.* 37: 352–358.
- 60) Pedrana G, Viotti M, Souza E, Sloboda D, Martin G, Cavestany D, Ortega H (2013). Apoptosis-Related Protein Expression During Pre- and Post-Natal Testicular Development After Administration of Glucocorticoid *in utero* in the Sheep. *Reprod. Domest. Anim.* 48: 795–802.
- 61) Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet JJ, Hill DJ (1999). A Low Protein Diet Alters the Balance of Islet Cell Replication and Apoptosis in the Fetal and Neonatal Rat. *Endocrinology.* 140: 4861–4873.
- 62) Piña Leyva C, Lara Lozano M, Moreno Sandoval HN, Merino García JL, Thompson Bonilla MR, Rosas Sandoval G, Calderón Rosete G, Guerrero Pasante SIR, Mendoza Pasante EM, Rodríguez Gallegos J, González Barrios JA (2014). Factor neurotrófico derivado de la glía: una promesa terapéutica para la enfermedad de Parkinson. *Rev. Espec. Médico-Quirúrgicas* 19: 88–95.
- 63) Rae MT, Rhind SM, Fowler P a, Miller DW, Kyle CE, Brooks a N (2002). Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses. *Reproduction* 124: 33–39.
- 64) Ramos CDF, Silva AM Da, Costa WS, Sampaio FJB (2006). Stereological evaluation of the seminiferous tubules of rats after maternal undernutrition during the lactation period. *Urol. Int.* 76: 63–66.

- 65) Rhind SM, Rae MT, Brooks AN, Bioscience I, Park A (2001). Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122: 205–214.
- 66) Robertis EDP De, Hib J, Ponzio R (2005). *Biología celular y molecular de De Robertis*. Buenos Aires, Ateneo. 373-390.
- 67) Rodríguez-González GL, Vigueras-Villaseñor RM, Millán S, Moran N, Trejo R, Nathanielsz PW, Larrea F, Zambrano E (2012). Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 3: 321–326.
- 68) Rooij DGDE, Russell LD (2000). All You Wanted to Know About Spermatogonia but Were Afraid to Ask. *J Androl.* 6512: 776–798.
- 69) Rossi P, Dolci S (2013). Paracrine mechanisms involved in the control of early stages of mammalian spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4: 1–8.
- 70) Shima JE, McLean DJ, McCarrey JR, Griswold MD (2004). The Murine Testicular Transcriptome: Characterizing Gene Expression in the Testis During the Progression of Spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 71: 319–330.
- 71) Silva P Da, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM (2001). Influence of placentally mediated fetal growth restriction on the onset of puberty in male and female lambs. *Reproduction* 122: 375–383.
- 72) Skinner MK, Griswold MD, Hess RA, França LR (2005). Structure of the Sertoli Cell. *Sertoli Cell Biology*. Elsevier.
- 73) Sloboda DM, Howie GJ, Pleasants A, Gluckman PD, Vickers MH (2009). Pre- and Postnatal Nutritional Histories Influence Reproductive Maturation and Ovarian Function in the Rat. *Nutrition* 4: 1–8.
- 74) Spinnler K, Köhn FM, Schwarzer U, Mayerhofer A (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum. Reprod.* 25: 2181–2187.
- 75) Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y (2002). Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF / FSH pathway. *Mech Dev.* 113: 29–39.
- 76) Tarrade A, Panchenko P, Junien C, Gabory A (2015). Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. *J. Exp. Biol.* 218: 50–58.
- 77) Teixeira CV, Silandre D, Souza Santos AM de, Delalande C, Sampaio FJB, Carreau S, Fonte Ramos C da (2007). Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J. Endocrinol.* 192: 301–311.
- 78) Thompson LP, Al-Hasan Y (2012). Impact of oxidative stress in fetal programming. *J. Pregnancy* 2012: 582748.
- 79) Toledo FC, Perobelli JE, Pedrosa FPC, Anselmo-Franci JA, Kempinas WDG (2011). In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9: 94.
- 80) Torrens C, Hanson MA, Gluckman PD, Vickers MH (2009). Maternal undernutrition leads to endothelial dysfunction in adult male rat offspring independent of postnatal diet. *Br J Nutr.* 101: 27–33.
- 81) Trupp M, Rydén M, Jörnvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibáñez CF

- (1995). Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J. Cell Biol.* 130: 137–148.
- 82) Veitia RA, Salas-Cortés L, Ottolenghi C, Pailhoux E, Cotinot C, Fellous M (2001). Testis determination in mammals: More questions than answers. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179: 3–16.
- 83) Vilanova Teixeira C, Silandre D, Souza Santos AM de, Delalande C, Sampaio FJB, Carreau S, Fonte Ramos C da (2007). Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and estrogen receptors expression in rat testis at weaning. *J. Endocrinol.* 192: 301–311.
- 84) Wilhelm D, Palmer S, Koopman P (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol. Rev.* 87: 1–28.
- 85) Wing TY, Christensen a K (1982). Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am. J. Anat.* 165: 13–25.
- 86) Wu Z, Templeman JL, Smith RA, Mackay S (2005). Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on isolated developing mouse Sertoli cells in vitro. *J. Anat* 206: 175–184.
- 87) Wu X, Wan S, Lee MM (2007). Key Factors in the Regulation of Fetal and Postnatal Leydig Cell Development. *J. Cell. Physiol.* 213: 429–433.
- 88) Yang Y, Han C (2010). GDNF stimulates the proliferation of cultured mouse immature Sertoli cells via its receptor subunit NCAM and ERK1/2 signaling pathway. *BMC Cell Biol.* 11: 78.
- 89) Yang WM, Kim HY, Park SY, Kim HM, Chang MS, Park SK (2010). Cynomorium songaricum induces spermatogenesis with glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) enhancement in rat testes. *J. Ethnopharmacol.* 128: 693–696.
- 90) Yu Z, Guo R, Ge Y, Ma J, Guan J, Li S, Sun X, Xue S, Han D (2003). Gene Expression Profiles in Different Stages of Mouse Spermatogenic Cells During Spermatogenesis 1. *Biol. Reprod.* 69: 37–47.
- 91) Zambrano E, Guzmán C, Rodríguez-González GL, Durand-Carbajal M, Nathanielsz PW (2014). Fetal programming of sexual development and reproductive function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382: 538–549.
- 92) Zambrano E, Rodríguez-González GL, Guzmán C, García-Becerra R, Boeck L, Díaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW (2005). A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J. Physiol.* 563: 275–284.
- 93) Zheng Y, Zhang Y, Qu R, He Y, Tian X, Zeng W (2014). Spermatogonial stem cells from domestic animals: Progress and prospects. *Reproduction.* 147: 65-74