



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis presentada para optar al grado de Doctor
de la Facultad de Ciencias Exactas

“MODIFICACIÓN NEONATAL DE LA
ACTIVIDAD ANDROGÉNICA: IMPACTO
SOBRE LA PROGRAMACIÓN ENDOCRINO-
METABÓLICA EN LA RATA HEMBRA”

Lic. Luisina Ongaro Gambino

Director: Dr. Eduardo Spinedi

Co-Director: Dr. Andrés Giovambattista

2014

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL DE LA PLATA, HA SIDO REALIZADO BAJO LA DIRECCIÓN
DEL DR. EDUARDO SPINEDI Y LA CO-DIRECCIÓN DEL DR. ANDRÉS
GIOVAMBATTISTA EN EL LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA
DEL INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA CELULAR
LA PLATA, ABRIL DE 2014.

AGRADECIMIENTOS

Mi primer día en el IMBICE llegué con una carpeta improvisada donde tenía los papeles de una beca CIC en su último día de convocatoria. Después de hablar con Eduardo y conocer el laboratorio, subí al segundo piso, toqué la puerta en administración, salió Betty, agarró los papeles, los miró y me dijo “Ah, es la beca de Guille”. Esas palabras me hicieron pensar que iba a ser el primer y último día que estaría en el instituto, quién iba a decir que esa misma Guille iba a terminar siendo mi gran amiga y compañera de aventuras...

Agradezco a las autoridades del IMBICE, a la CIC y al CONICET por darme la posibilidad de comenzar mis primeros pasos en la investigación;

A Eduardo por la oportunidad, su apoyo y guía durante el desarrollo de la tesis;

A Bamba por ser una gran persona, estar siempre disponible frente a cualquier inconveniente, por acompañarme hasta en los pequeños detalles, por permitirme construir a partir de mis ideas enseñándome a darle forma y superar obstáculos;

A mis amigas del laboratorio, Amandis, Anita y Guille, por compartir el día a día, las risas, los llantos, las facturas por algún festejo, los mates, los chocolates de los viernes, las reuniones alrededor de la computadoras por resultados inexplicables, gracias! No hubiese sido igual sin ustedes;

A toda la gente del IMBICE: Mariel, Javi, Lau, July, Agus, Sil, Nati, Bel, Spring, Fran... bueno, somos como 40 becarios, gracias a todos!. A Daniel Castrogiovanni, por colaborar en muchos de los experimentos de la tesis. A Rita, Myriam, Myrta, Silvia, Vero, Gi y Miguel... por la buena onda, su predisposición para ayudarme en lo que necesite. Al servicio de Lavado, Bioterio y Cultivos del Instituto. Además, quiero agradecer especialmente a Mario, Jesica, Jorge y Hebe, por creer en mi futuro y apoyarme a seguir en carrera;

Al Dr. Ortega y su equipo por su colaboración en los resultados histológicos del presente trabajo;

Al laboratorio del Dr. Calandra por su colaboración en las determinaciones plasmáticas de 5 α Diol y gonadotrofinas;

A mis amigas de la vida, July y Fla, por adaptarse a mis viajes relámpagos, siempre hacerse un tiempo para verme, escribirme, llamarme, acompañarme... para que nuestros 22 años de amistad se perpetúen por siempre;

A mis amigos de la Facultad, 10 locos que caímos en una misma mesada para armar un grupo muy unido y tan importante para mí. A Beti y a Lucy, por nuestras reuniones de descarga de tensiones, de reflexión y de empuje. A Poli, Luis, Facu, Yani, Soli, Colo y Agus (y sus cónyuges, jaja!) por toda su alegría, su compañerismo, su preocupación por mis problemas, las reuniones en las que nos reímos, bailamos, cantamos... es difícil poner en palabras la conexión que tenemos... los quiero mucho!

A toda mi familia por su apoyo, mis papás, mis hermanos, mi sobrino, mis cuñados, mis suegros, mis tíos y primos. A Ámbar, mi hijita de cuatro patas por darme todo su amor y compañía. Principalmente, a Jony, mi compañero de ruta incondicional, mi gran amor desde que nos encontramos alguna vez, allá por el 2001, y a partir de ahí mi fuiste mi consejero, mi guía, mi sostén... Terminé la tesis Toto! Y ahora?...

ÍNDICE

Agradecimientos	3
Índice	5
Abreviaturas	8
Introducción	11
Fisiología e interrelación de los ejes hipotálamo-hipofiso-adrenal e hipotálamo-hipofiso-gonadal	12
Los esteroides sexuales como moduladores de la ingesta alimentaria y el metabolismo basal: participación del tejido adiposo blanco (TAB)	16
Programación endocrino-metabólica del individuo: modificación temprana de la función androgénica	21
La adrenarca en la rata.....	26
Interacción de los glucocorticoides con la función reproductiva.....	28
Desarrollo prepuberal y evaluación de la gametogénesis	31
El ciclo estral de la rata y su programación neonatal	36
Hipótesis y Objetivos	40
Hipótesis	41
Objetivo General.....	41
Objetivos Específicos.....	42
Materiales y Métodos.....	43
Animales Experimentales.....	44
Diseño experimental.....	44
Modelos animales	44
Descripción general del diseño experimental	45
Metodología.....	47
Registros antropométricos y determinación de marcadores bioquímicos periféricos	47
Evaluación de ARN mensajeros en glándulas adrenales y ováricas por RT-PCR Tiempo Real.....	53
Contenido de 17OHP4 ovárico y adrenal.....	55
Histología de las glándulas ováricas.....	55

Estudios in vivo.....	57
Respuesta al estímulo de hCG a edad adulta.....	57
Estudios in vitro.....	58
Incubado de células de corteza adrenal enriquecidas.	58
Cultivos de células ováricas provenientes de animales pre-púberes.	59
Análisis estadístico de los resultados.....	60
Resultados.....	62
Capítulo 1: Edad Prepuberal.....	63
Impacto de la intervención neonatal sobre la ingesta de alimento y el crecimiento de la rata hembra durante el período prepuberal.....	63
Efecto de la intervención neonatal sobre el estado metabólico de la rata a edad prepuberal.....	65
Determinación de los niveles plasmáticos y tisulares de esteroides sexuales y de intermediarios de su biosíntesis.....	66
Estudio de expresión enzimática en la cadena esteroidogénica adrenal y ovárica.....	69
Análisis morfológico de la foliculogénesis ovárica.....	71
Respuesta ovárica luego de la administración de un xenoestrógeno: función de las células de la granulosa aisladas.....	73
Capítulo 2: Edad Adulta.....	75
Las alteraciones en la programación neonatal endocrino-metabólica permanecen en la edad adulta.....	75
Impacto de las alteraciones neonatales sobre el estado metabólico a la edad adulta.....	76
Análisis de la función corticoadrenal <i>in vitro</i> en los animales adultos.....	77
Apertura vaginal y análisis del ciclo estral.....	78
Niveles de esteroides sexuales plasmáticos y tisulares a la edad adulta.....	80
Efecto del tratamiento neonatal sobre la expresión ovárica de enzimas esteroidogénicas.....	82
Análisis morfológico de la foliculogénesis ovárica.....	83
Respuesta <i>in vivo</i> a la hCG.....	85
Discusión.....	87
Efecto de la actividad androgénica neonatal sobre el crecimiento y el metabolismo de la rata hembra.....	88
Alteraciones en los niveles de glucocorticoides por exceso o bloqueo androgénico	91

Modificaciones en la programación de la vía de síntesis de esteroides por exceso o bloqueo androgénico. Análisis de la funcionalidad ovárica	94
Conclusiones.....	105
1. Sobre la actividad neuroendocrino-metabólica.....	106
2. Sobre la función corticoadrenal.....	107
3. Sobre la función reproductiva	107
Referencias Bibliográficas	110

ABREVIATURAS

17OHP4: 17-hidroxiprogesterona

5 α DHT: 5-alfa-dihidrotestosterona

5 α Diol: 5-alfa-androstenediol

ACTH: Hormona adrenocorticotropa

Akt: Proteína quinasa B

ANOVA: Análisis de varianza

ARNm: Acido ribonucleico nuclear mensajero

AVP: Hormona arginina vasopresina

AVPV: Núcleo anteroventral periventricular

B: Corticosterona

BSA: Albumina bobina sérica

CRH: Hormona liberadora de corticotrofina

CYP17: gen P450c17

DES: Dietilestilbestrol

DHT: Dihidrotestosterona

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2

E2: Estradiol

EEM: Error estándar medio

EPI: Epinefrina

FM: Flutamida

Foxo3: Factor O3 de transcripción de la familia Foxhead

FSH: Hormona folículo estimulante

GDF9: Factor 9 de crecimiento y diferenciación

GH: Hormona de crecimiento

Glu: Glucosa

hCG: Hormona gonadotrófica humana

HHA: Hipotálamo-hipofiso-adrenal

HHG: Hipotálamo-hipofiso-gonadal

IGF-1: Factor de crecimiento similar a insulina tipo 1

IMC: Índice de masa corporal

Ins: Insulina

IR: Insulino-resistencia

Kiss-1: Kisspeptina 1

LC: Locus Coeruleus

Lep: Leptina

LH: Hormona luteinizante

NE: Norepinefrina

NEFA: Ácidos grasos no esterificados

NPV: Núcleo paraventricular

NPY: Neuropeptido Y

Ob: gen de leptina

P4: Progesterona

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1

PC: Peso corporal

PEG: Polietilenglicol

PGE2: Prostaglandina E2

PI3K: Fosfatidil-inositol-3-quinada

POMC: Pro-opiomelanocortina

PRL: Prolactina

PBS: Buffer Fosfato Salino

PT: Propionato de testosterona

RA: Receptor de andrógenos

RE: Receptor de estrógenos

RIA: Radioinmunoanálisis

RT-PCR: Reacción de polimerasa en cadena por tiempo real

SM: Síndrome metabólico

SNC: Sistema nervioso central

SOP: Síndrome de ovario poliquístico.

TAB: Tejido adiposo blanco

TAP: Tejido adiposo parametrial

TG: Triglicéridos

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta 1

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TT: Testosterona total

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

Δ 4A: Delta 4 androstenediona

INTRODUCCIÓN

FISIOLOGÍA E INTERRELACIÓN DE LOS EJES HIPOTÁLAMO- HIPOFISO-ADRENAL E HIPOTÁLAMO-HIPOFISO-GONADAL

El sistema neuroendocrino genera respuestas adaptativas frente a determinados estímulos donde es clave la participación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (HHA)¹. El eje HHA provee una primera línea de defensa frente al “estrés” buscando mantener la homeostasis del individuo². El sistema nervioso central (SNC) a partir de la liberación de hormonas en las terminaciones neuronales presentes en la eminencia media modulan la liberación de las hormonas hipofisarias encargadas de estimular sus tejidos blanco. Estos mecanismos de regulación son de acción recíproca, la retroalimentación periférica y central son claves para el normal funcionamiento del eje³.

Los principales factores involucrados en el funcionamiento del eje HHA y sintetizados por neuronas hipotalámicas (hipofisotropas) son la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP). Estos neuropéptidos son sintetizados por el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) y liberados desde las terminales nerviosas presentes en la eminencia media para luego, a través del sistema porta hipofisario, ejercer sus acciones en la células corticotropas adenohipofisarias⁴. Desde el punto de vista anatómico y funcional, se distinguen dos glándulas que conforman la hipófisis, las cuales poseen distinto origen embriológico: la adenohipófisis o hipófisis anterior, y la neurohipófisis o hipófisis posterior⁵. La neurohipófisis es una extensión del cerebro anterior ya que, durante la embriogénesis, parte del hipotálamo atraviesa el diafragma selar y se sitúa en la silla turca. La adenohipófisis deriva de una invaginación ectodérmica de la primitiva cavidad oral. Luego de su desarrollo, se establece como una unidad

fisiológica, funcional y anatómica, que está unida al hipotálamo a través del tallo hipofisario⁶. Específicamente, en la adenohipófisis, la CRH se une a sus receptores en las células corticotropas estimulando la síntesis de pro-opiomelanocortina (POMC) y la liberación de péptidos generados por el clivaje de POMC, como las hormonas adrenocorticotropa (ACTH) y β endorfina, entre otras⁷.

La ACTH actúa directamente sobre receptores de la corteza adrenal con la consecuente liberación de, fundamentalmente, glucocorticoides que ejercen una retroalimentación negativa de la secreción de CRH hipotalámico y de ACTH hipofisaria⁷. A su vez, la ACTH es capaz de regular la liberación de CRH por un mecanismo directo sobre la eminencia media así como de zonas extra hipotalámicas (médula espinal, mesencéfalo, sistema límbico) acción fundamental para determinar el ritmo circadiano de los glucocorticoides⁸.

La glándula adrenal está formada por dos partes embriológica y funcionalmente diferentes: a) la médula suprarrenal, constituida por células cromafines secretoras de catecolaminas y b) la corteza suprarrenal, formada por tres zonas altamente especializadas y denominadas glomerulosa, fasciculata y reticularis. La glomerulosa es la encargada de sintetizar y liberar mineralocorticoides, mientras que las zonas fasciculata/reticularis poseen como principal acción la liberación de corticosterona en la rata⁹.

Los efectos de los glucocorticoides sobre el metabolismo son diversos, entre los que se pueden destacar el aumento de la gluconeogénesis hepática, estimular la proteólisis en tejidos periféricos con el fin de generar precursores para la gluconeogénesis, a su vez, inhiben la captación de glucosa por el músculo y el tejido

adiposo¹⁰. Sobre este último tejido además, estimulan la lipólisis en forma aguda, pero pueden ser lipogénicos cuando la estimulación es crónica y en combinación con insulina¹⁰. De hecho, los glucocorticoides han sido utilizados desde hace tiempo para estimular la adipogénesis *in vitro*¹¹.

El dimorfismo sexual observado en la liberación de glucocorticoides indica que el sistema reproductivo modula la función del eje HHA, no de forma unidireccional sino que ambos sistemas interaccionan entre sí¹².

El eje hipotálamo-hipofiso-gonadal (HHG) involucra a nivel central la síntesis de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). En el hipotálamo, neuronas parvicelulares neurosecretoras de GnRH se encuentran en el núcleo arcuato, el núcleo periventricular, el paraventricular y el área preóptica. Desde estas zonas la GnRH es transportada neuronalmente hacia la eminencia media, donde resulta liberada al sistema portal hipotálamo-hipofisario¹³.

Las células de la hipófisis anterior (gonadotropas) poseen receptores específicos de GnRH, y responden con la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), éstas finalmente impactan a nivel gonadal estimulando la síntesis de esteroides sexuales en mayor medida estradiol y progesterona en hembras, y testosterona en machos¹³.

La LH y FSH son secretadas por las células basófilas de la adenohipófisis (gonadotropas) y tienen una estructura glicoproteica de doble cadena (α y β). En condiciones normales, la LH y la FSH poseen un ciclo de secreción pulsátil ultradiano y semanal que genera el ciclo estral en la rata. En las células del ovario el receptor de FSH se encuentra en las células de la granulosa, mientras que el

receptor de LH se ubica principalmente en las células tecales, luteínicas e intersticiales, y también se expresa en las células de la granulosa cuando éstas son estimuladas por FSH¹².

Al igual que el eje HHA, el HHG presenta una autorregulación a través de la retroalimentación negativa de los esteroides sexuales en la liberación de FSH, LH y GnRH, por parte de la hipófisis y del hipotálamo, respectivamente¹⁴.

Diversos estudios de interacción entre los ejes HHA y HHG se basan en las modificaciones que genera el estrés en la función reproductiva (**Figura A**). Se ha demostrado en roedores que la administración central de CRH inhibe la síntesis de GnRH y por consiguiente la liberación de LH. A su vez, las hormonas sexuales modulan la liberación de glucocorticoides. La testosterona regula negativamente al eje mientras que los estrógenos estimulan los niveles de las hormonas asociadas al estrés¹⁵. Se ha observado, que animales macho castrados, a edad adulta, presentan una mayor liberación de glucocorticoides circulantes la cual es revertida por la administración de testosterona o 5 alfa dihidrotestosterona (5 α DHT)¹⁶. Esto permitió demostrar que el efecto de los andrógenos sucedería a través del receptor de andrógenos (RA) y no a través de su aromatización a estrógenos¹⁶. Por su parte, las ratas hembra presentan mayores niveles de CRH dados por la mayor expresión del mismo en las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo. Sin embargo, las células hipofisarias productoras de ACTH en la rata no expresan RA y muestran bajos niveles de expresión de aromatasa¹⁷.

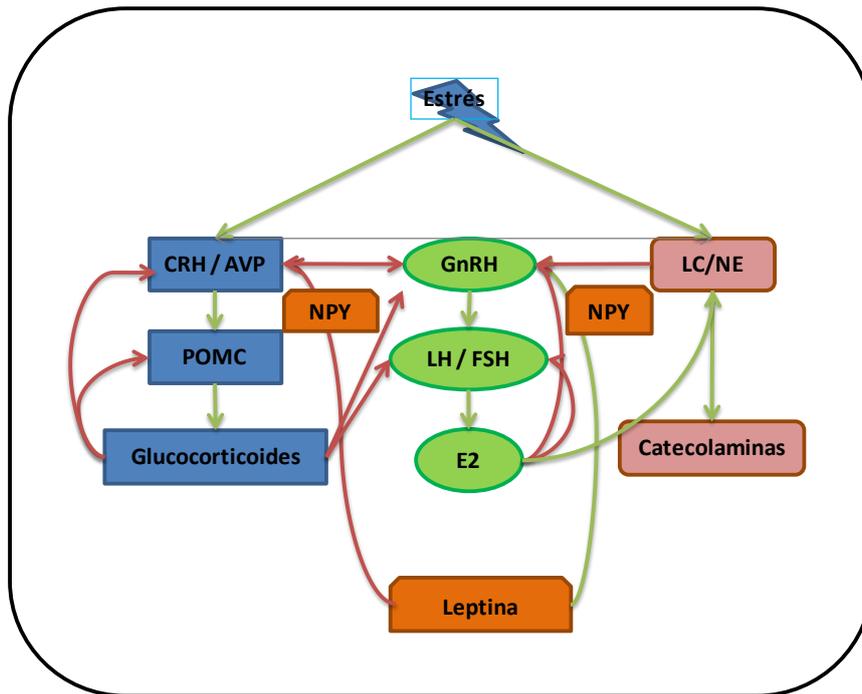


Figura A: Interacción de los ejes HHA y HHG. Efectos del estrés agudo en el sistema reproductivo. (Modificado de Brann, FASEB Journal, 1991)

LOS ESTEROIDES SEXUALES COMO MODULADORES DE LA INGESTA ALIMENTARIA Y EL METABOLISMO BASAL: PARTICIPACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO (TAB)

Los ejes HHA y HHG son modulados según el balance energético del individuo. Un balance energético negativo estimula el eje HHA mientras que inhibe la reproducción. Por otro lado, se ha observado que el estado de obesidad está asociado a problemas de fertilidad. El TAB es el principal nexo entre los sistemas endócrinos involucrados¹⁸.

El TAB se encuentra ampliamente distribuido en el organismo, principalmente los depósitos subcutáneo y visceral son los encargados de modular el metabolismo a través de la secreción de hormonas llamadas adipocinas, entre las que se encuentran: leptina, adiponectina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α),

inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), resistina, entre otras (**Figura B**)¹⁹.

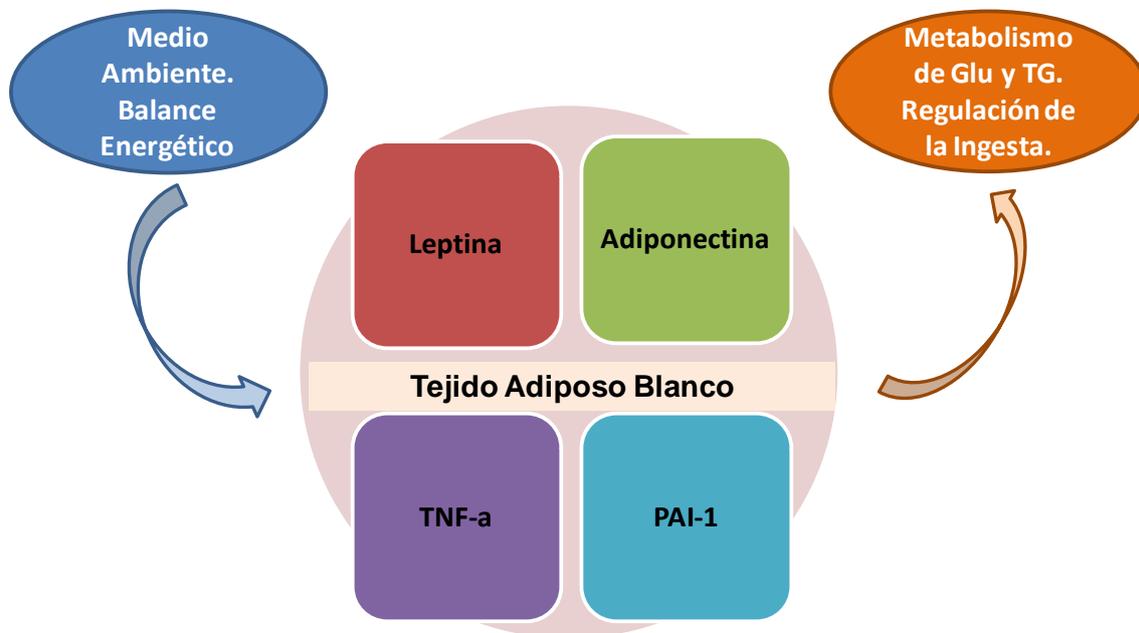


Figura B: Esquema representativo de la actividad endócrina del TAB

La leptina es liberada en mayor proporción por los adipocitos a partir de la expresión del gen *ob*, aunque se ha hallado la expresión del mismo en otros tejidos tales como intestino, placenta y músculo esquelético²⁰. Los niveles de leptina son variables y dependen de la cantidad de tejido adiposo, el género y la edad de un individuo, así como del balance energético del mismo. Por lo tanto es posible correlacionar la leptinemia con la cantidad de tejido adiposo, la masa corporal o el denominado índice de masa corporal (IMC)¹⁹. En roedores, se ha demostrado que los estrógenos estimulan la liberación de leptina encontrándose mayores niveles plasmáticos de leptina en hembras que en machos²⁰.

La leptina inhibe neuronas específicas del hipotálamo encargadas de liberar péptidos orexigénicos (NPY, MCH) por lo que ejerce una señal de saciedad a nivel

central²¹. Esta adipoquina se encuentra regulada por la insulinemia de allí que los niveles plasmáticos de leptina varían según el estado energético del organismo, disminuyendo durante el ayuno y aumentando en el estado postprandial, estados en los que varían paralelamente con los niveles circulantes de insulina. Este mecanismo (interacción leptina-insulina) ocurre directamente a nivel de los adipocitos, donde la insulina se une a su receptor aumentando la expresión del ARNm de *ob*, tanto en humanos como en rata. Esta interrelación no siempre ocurre de forma aguda, es posible encontrar una asociación luego de un tiempo de hiperinsulinemia y es dependiente también de los valores de glucocorticoides circulante^{21,22}.

La leptina modula la función adrenal y reproductiva¹². Es conocido su efecto dual, por un lado en concentraciones normales inhibe la liberación de CRH y por lo tanto la secreción de glucocorticoides, a la vez que estimula la función gonadal aumentando los niveles de GnRH. Por otro lado, niveles menores de leptinemia están asociados a una inhibición de la función gonadal y una activación del eje HHA. Este último efecto sería a través de la acción estimuladora de NPY sobre las neuronas liberadoras de CRH y por una deficiencia para inhibir el efecto de ACTH a nivel corticoadrenal^{22,23}.

El receptor de leptina se encuentra distribuido en todos los niveles del eje HHG regulando la función reproductiva, el ovario modifica su expresión de receptores de leptina en función a los niveles de la hormona en sangre permitiendo o inhibiendo la ovulación²⁴. Estudios *in vitro* muestran que un estímulo agudo de leptina es capaz de actuar directamente sobre el ovario disminuyendo la expresión de los

receptores de andrógenos, estrógenos y gonadotrofinas mecanismo por el cual condiciona la función ovárica²⁵.

A su vez, el TAB posee receptores para estrógenos, andrógenos y progesterona, y la expresión de los mismos varía según la localización del tejido, el género y la edad del individuo²⁶. Alteraciones en los niveles de las hormonales sexuales conllevan a modificaciones en la liberación de adipoquinas del TAB. En el caso de mujeres que sufren de Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) con altos nivel de andrógenos circulantes, se observa hirsutismo y una disminución del tejido graso en los depósitos asociados con el fenotipo femenino de obesidad, presentando un aumento de la masa corporal incluso en presencia de niveles normales de estrógenos, enmascarando su acción²⁷. La hiperandrogenemia que puede estar asociada al SOP, resulta en el desarrollo de TAB del fenotipo androide, de hecho, éste fenotipo puede asociarse a dos síndromes: el de SOP y el de Síndrome Metabólico (SM)^{28,29}.

El adipocito expresa la enzima aromatasas que permite convertir andrógenos en estrógenos, esta conversión periférica contribuye a los niveles de estrógenos circulantes³⁰. A su vez, el TAB regula los niveles locales de andrógenos y estrógenos a través de la acción de la 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa debido a la conversión de androstenediona y testosterona a estrona y estradiol, respectivamente³¹. Se ha demostrado la importancia de los estrógenos para la homeostasis del organismo, ya que ratones de ambos sexos knock-out para los receptores de estrógenos alfa (RE α) poseen características asociadas al SM. Además, la micro-inyección de bajas dosis de estradiol a nivel central/periférico produce una inhibición aguda de la ingesta alimentaria; contrariamente, a la de testosterona que resulta en una hiperfagia reactiva^{32,33,34,35}. Estas observaciones

permiten sugerir que las hormonas sexuales son capaces de modular la ingesta alimentaria y el depósito adiposo a nivel local, por receptores en los adipocitos, así como también actuando sobre la función del circuito hipotalámico controlador del apetito/saciedad, representando el mecanismo por el cual los esteroides sexuales regulan la ingesta alimentaria, el peso corporal y la distribución adipocitaria³⁶.

En individuos susceptibles al desarrollo de SM y Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2), las alteraciones asociadas a dichas patologías se manifiestan frecuentemente a edad post-puberal, ya que el pico hormonal de gonadotrofinas que se genera en la pubertad participa en el inicio de enfermedades renales y hepáticas. Estudios en ratas macho prepuberales, tratadas con estreptozotocina, a las cuáles se les indujo un aumento transitorio de testosterona, permitieron demostrar que las modificaciones hormonales presentes durante la pubertad aceleran las alteraciones funcional y morfológica del tejido renal, interfiriendo en la reabsorción de diversos metabolitos³⁷. A su vez, cuando las ratas hembra comienzan a presentar los ciclos hormonales característicos de la edad reproductiva, se observan variaciones en los niveles de estradiol que alcanzan sus niveles máximos alrededor de la ovulación, generando una disminución en el apetito. La adiposidad en las hembras está condicionada por los niveles circulantes de estradiol, por lo que las hembras que entran en menopausia modifican sus depósitos adipocitarios aumentando la grasa intraabdominal en detrimento de la grasa subcutánea glúteo-femoral³⁸.

PROGRAMACIÓN ENDOCRINO-METABÓLICA DEL INDIVIDUO:
MODIFICACIÓN TEMPRANA DE LA FUNCIÓN ANDROGÉNICA

El entorno del individuo durante el desarrollo perinatal (prenatal y postnatal temprano) impacta sobre su adaptación al mismo y lo predispone al desarrollo de características particulares que se mantienen a edad adulta. Es conocido que el estado metabólico de la madre durante la gestación o la lactancia condiciona el metabolismo de las crías generando, en la vida adulta de éstas, una mayor susceptibilidad al desarrollo de obesidad, DMT2 y SM³⁹.

La plasticidad del organismo durante el periodo perinatal permite que factores extrínsecos modifiquen su crecimiento, la función metabólica y reproductiva. La maduración de las conexiones neuronales durante esta ventana crítica del desarrollo permite demostrar que el sistema nervioso central es determinante en el mecanismo a través del cual las alteraciones permanecen hasta edad adulta⁴⁰.

La diferenciación sexual en la rata hembra se completa durante la edad posnatal donde los esteroides sexuales son capaces de modular la función hipotalámica. En 1961, fue demostrado por Barraclough⁴¹ que la inyección de propionato de testosterona al día 5 de vida de la rata hembra genera una masculinización hipotalámica que afecta su desarrollo reproductivo. Durante la edad neonatal, el hipotálamo de la rata macho sufre tanto una masculinización como una defeminización donde los estrógenos juegan un rol primordial. El hipotálamo de la rata hembra permite el desarrollo sexual femenino evidenciado en el comportamiento y ciclos reproductivos a la edad adulta. Este desarrollo se ve alterado cuando el hipotálamo está expuesto a altos niveles de estrógenos

neuronales durante los primeros 10 días de vida de la rata⁴². Por lo tanto, la intervención con altos niveles de propionato de testosterona al día 5 de vida genera un aumento de los niveles neuronales de esteroides permitiendo tanto la masculinización como la defeminización del hipotálamo, que se evidencia a edad adulta por un comportamiento sexual masculino y una pérdida en la respuesta central a los niveles de estradiol y progesterona⁴². No es conocido si estas alteraciones se dan principalmente por la aromatización de los andrógenos y su acción sobre los receptores de estrógenos o si los mismos actúan por sus propios receptores (RA) directamente sobre el hipotálamo.

Uno de los principales estados patológicos asociados al desequilibrio en los niveles de los esteroides sexuales en la mujer es el síndrome de ovario poliquístico (SOP). En base a caracterizar si el SOP podría asociarse a modificaciones en la programación endocrino-metabólica del individuo durante su desarrollo, se ha abordado el estudio del síndrome a través de diversos modelos animales⁴³.

El SOP es un desorden reproductivo que afecta entre 4 y 8 % de las mujeres en edad reproductiva, constituyéndose una causa frecuente de trastornos del ciclo menstrual^{44,45}. El mismo está caracterizado fundamentalmente por oligomenorrea, hiperandrogenismo (con o sin hiperandrogenemia), una alteración en la relación de los niveles circulantes de gonadotrofinas (LH/FSH) y sobrepeso. Esta multi-entidad también se encuentra asociada al estado de insulino-resistencia (IR) y al desarrollo de SM, DMT2 y enfermedades cardiovasculares⁴⁶. Existe un constante avance en lo que se refiere a consensos internacionales para el mejor diagnóstico de SOP. La Sociedad de Exceso de Andrógeno recomienda para la definición de SOP: a) la ausencia de: desórdenes hiperandrogénicos de causa conocida, IR severa, disfunción

tiroidea e hiperprolactinemia; b) la presencia de: hiperandrogenismo clínico (o hiperandrogenemia de causa no conocida), y c) oligomenorrea o morfología poliquística ovárica⁴⁷, diferenciándose de lo consensuado en Rotterdam⁴⁸ en el año 2003, es decir, la imagen poliquística del ovario puede o no ser observada. Gran cantidad de pacientes con fenotipos variables puede cumplimentar los criterios requeridos para SOP, generándose entonces una inconsistencia en lo que respecta a la etiología del síndrome; esto incluye si la causa primaria del SOP es i) el defecto neuroendocrino (aumento en la frecuencia y amplitud de los picos de secreción de LH), ii) la falla ovárica-adrenal en la biosíntesis de esteroides sexuales (desplazándose al estado hiperandrogénico), y/o iii) una alteración los mecanismos de acción de insulina, sea por modificaciones de la secreción pancreática o aquellos relacionados a su acción a nivel tisular⁴⁹.

La anovulación crónica inducida por la androgenización neonatal en la rata hembra es un modelo que ha sido utilizado para estudios de SOP, aunque posee limitaciones de relevancia ya que no aumentan las concentraciones de gonadotrofinas y esteroides sexuales (estradiol y testosterona) circulantes⁵⁰. Sin embargo, ha sido descrito un aumento en la relación LH:FSH plasmática y modificaciones de la respuesta gonadotropa al GnRH⁵¹. Otro modelo animal de SOP es el generado por la administración de bajas dosis hCG combinado con insulina⁵², teniendo como desventaja el inmediato establecimiento de hiperinsulinemia. Sin embargo presenta resultados semejantes a los observados en mujeres con el síndrome: anovulación, ovarios de tamaño aumentado y folículos poliquísticos, con altos niveles circulantes de andrógenos. Modelos más recientes se basan en la androgenización de la rata hembra normal entre las edades infantil y juvenil (día 21 de edad) utilizando dihidrotestosterona (DHT) o letrozole (inhibidor de

aromatasa)⁵³. Los estudios realizados indican que la utilización de letrozole induce un modelo apto para estudios de cambios en la morfología ovárica. La utilización directa de DHT resulta en un modelo aceptable para el estudio de cambios de la morfología del ovario y del metabolismo. Aunque ninguno de ellos todavía ha podido esclarecer completamente la etiología del SOP.

Numerosas evidencias muestran una clara interacción entre los esteroides sexuales y cambios en la insulino-sensibilidad. Ha sido descrito que el tratamiento de mujeres sanas con andrógenos induce la aparición de un estado de IR⁵⁴. En estudios realizados en rata, se ha observado que el tratamiento con andrógeno induce IR a nivel muscular^{55,56} y adipocitario^{57,58}, sugiriendo entonces que un aumento transitorio del andrógeno podría ser la causa de posteriores modificaciones tanto en la acción como en la secreción de insulina. En la actualidad, es aceptado que el desarrollo de SOP puede empezar tempranamente, incluso en la vida intrauterina. La exposición a un exceso de andrógeno en la etapa fetal podría inducir cambios en los tejidos blanco de los andrógenos que se encuentren en diferenciación, finalizando entonces con el establecimiento del fenotipo SOP a la edad reproductiva^{59,60}. Adicionalmente, recientemente ha sido propuesta la hipótesis de la “fosforilación de serina”⁶¹, la cual podría explicar dos de las más relevantes observaciones bioquímicas del SOP: hiperandrogenemia e IR. Esta hipótesis se fundamenta en una modificación génica (heredada en forma autosómica) responsable de alterar la actividad de una quinasa, de forma directa o través de sus reguladores, que fosforilaría en posición serina (en lugar de posición normal: tirosina) tanto en P450c17 como en la sub-unidad β (intramembranal) del receptor de insulina, desencadenándose co-temporáneamente hiperandrogenemia e IR.

A su vez, estudios previos en nuestro laboratorio permitieron demostrar que las ratas hembra androgenizadas al día 5 de vida presentan a edad adulta un aumento del peso corporal, hipoadiponectinemia e hiperleptinemia. Así como una mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades asociadas al SM, como IR u obesidad cuando se las alimenta con una dieta rica en fructosa⁶².

Seale y colaboradores demostraron además un impacto sobre la glándula suprarrenal. Ellos observaron que las ratas androgenizadas neonatalmente muestran una disminución en la frecuencia y amplitud de los pulsos de liberación de corticosterona, según el estado hormonal de la rata hembra adulta, ya que los patrones de liberación de las hormonas relacionadas con el eje HHA se normalizan cuando la rata recibe estradiol en concentraciones fisiológicas⁶³.

Las modificaciones reproductivas que las ratas neonatalmente androgenizadas presentan a edad adulta (anovulación y quistes ováricos) se darían por un aumento en la relación LH:FSH circulantes, con una mayor amplitud en los pulsos de FSH al día 100 de vida⁵¹. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales el exceso de andrógeno, durante periodos críticos de desarrollo, conlleva a cambios en la programación metabólica y reproductiva de un fenotipo SOP a edad adulta (IR, hiperleptinemia y anovulación) son aún desconocidos.

Es crítica la acción de los andrógenos (testosterona y DHT) y la hormona anti-Mulleriana, en la diferenciación sexual de los roedores macho, ya que la pérdida de ambas señales genera el fenotipo femenino. La utilización de antiandrógenos durante períodos perinatales puede lograr distintos grados de feminización, los que

se mantienen a edad adulta⁶⁴. Sin embargo, resulta de interés analizar la función androgénica durante el desarrollo de un individuo femenino.

La flutamida es un antagonista del RA que se utiliza actualmente en el tratamiento del cáncer de próstata andrógeno-dependiente⁶⁵. Ha sido observado que la flutamida es capaz de bloquear la acción androgénica en el ovario, regulando la atresia folicular por los andrógenos a través de su RA. Diversos estudios muestran que la inyección perinatal de flutamida en cerdos, genera una función folicular y luteal alterada a edad reproductiva. Por lo que, la acción del antiandrógeno también modifica la programación ovárica, hecho que se traduce en una mayor cantidad de folículos antrales por una disminución de su apoptosis^{66,67}.

A su vez, estudios con ratones hembra knock-out para el RA muestran que los mismos son fértiles a edad adulta pero presentan una disminución en el número de folículos y por lo tanto en el número de crías. Sin embargo, a edad adulta tardía es posible identificar una disminución precoz de los folículos, demostrando la función fisiológica del RA en la reproducción de los ratones hembra⁶⁸. Respecto al uso de antiandrógenos, diversos estudios muestran que la administración de flutamida durante etapas tempranas de desarrollo posnatal generan cambios que afectan el comportamiento sexual de ratas de ambos sexos^{64,69}.

LA ADRENARCA EN LA RATA

Durante las páginas anteriores se analizó (al menos parcialmente) la participación de la adrenal en el desarrollo del eje HHG, sin embargo el mecanismo a través del cual sucede todavía es incierto. Las hormonas adrenales actuarían directamente sobre receptores asociados a las gónadas y a nivel del SNC, facilitando el desarrollo

de interconexiones neuronales encargadas de la liberación y pulsatilidad de las gonadotrofinas⁷⁰.

La maduración adrenal en el humano está descrita por un pico de expresión de P450c17 (gen CYP17) acompañado de un aumento en el tamaño glandular, esto produce la liberación de los andrógenos de fuente adrenal alrededor de los 7 a 9 años de vida⁷¹. En los roedores, la expresión de P450c17 (ver Figura C) en la corteza adrenal ha sido descrita sólo a edad fetal, lo que explicaría la correspondiente liberación de corticosterona⁷².

No obstante, la bibliografía es contradictoria respecto a la activación del gen CYP17 en la rata. Por un lado, se han hallado productos 17-hidroxilados, incluso picos de secreción de cortisol y androstenediona alrededor del día 15 a 17 de vida donde diversos autores señalan la adrenarca en la rata, acompañado por un aumento de la zona reticularis⁷³. Contradictoriamente, otros autores demuestran por el análisis inmunohistoquímico de la glándula adrenal que no se encuentra la expresión de la enzima P450c17 durante la edad postnatal en la rata, por lo tanto, no se ha podido corroborar la vía enzimática asociada⁷⁴.

Durante esta etapa en la vida de la rata están asociados temporalmente: 1) el momento del destete, 2) el aumento en los niveles circulantes de androstenediona y glucocorticoides, 3) el engrosamiento de la zona reticularis, 4) la mayor utilización de la glucosa por el SNC y 5) el desarrollo del sistema nervioso simpático; aunque no se ha podido demostrar el mecanismo vinculado a estos eventos⁷⁵.

INTERACCIÓN DE LOS GLUCOCORTICOIDES CON LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA.

Fue discutido previamente que los niveles plasmáticos de corticosterona son mayores en ratas hembra respecto a ratas macho de la misma edad. Los esteroides sexuales son los responsables de esta diferencia ya que cuando los animales son sometidos a una gonadectomía bilateral a edad adulta presentan niveles circulantes similares de glucocorticoides⁷⁶.

La glándula adrenal posee receptores para esteroides sexuales. Se ha demostrado, a través de estudios *in vitro* de células adrenales enriquecidas en la fracción fasciculata/reticularis provenientes de animales castrados, que la unión de 17- β -estradiol a su receptor activa la enzima P450_{scc} (gen CYP11A) favoreciendo el clivado de la cadena lateral del colesterol en su conversión a pregnenolona. Por otro lado, la testosterona inhibe la formación de pregnenolona en las células adrenales en cultivo bloqueando la acción de enzimas iniciales como posteriores de la cadena esteroidogénica (**ver Figura C**)⁷⁷.

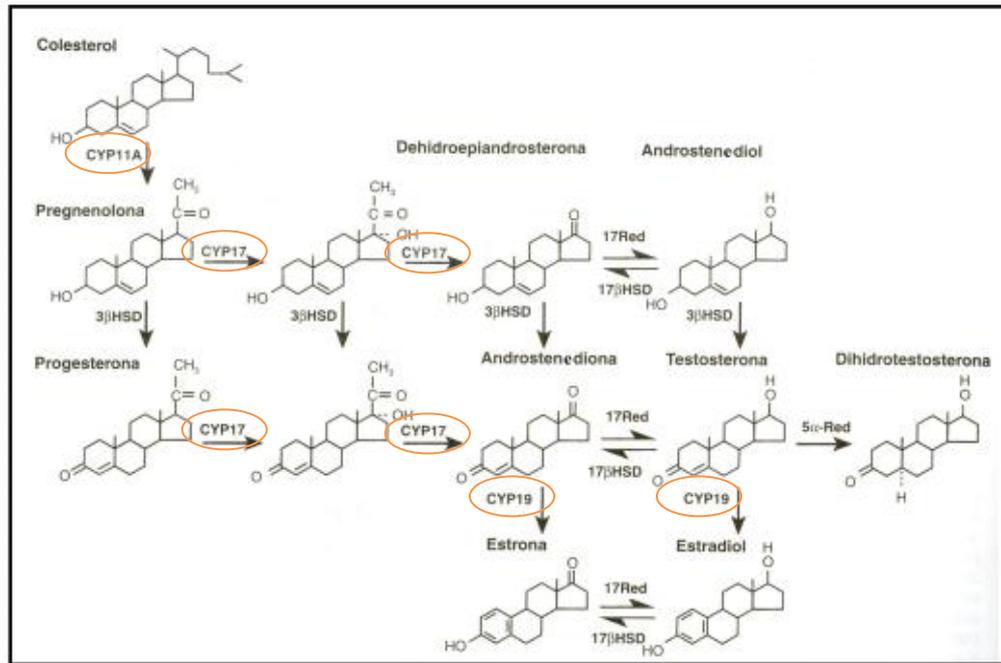


Figura C: Vía de síntesis de esteroides: precursores y enzimas involucradas.

(Modificado de Williams Textbook of Endocrinology, Edición 11, 2008)

El desarrollo sexual en la rata está vinculado a la presencia de la glándula adrenal. Para que la pubertad pueda ocurrir los niveles de corticosterona se deben encontrar dentro de los valores plasmáticos normales (10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ aproximadamente), y los animales no deben estar sometidos a situaciones de estrés crónico⁷⁸.

Las ratas hembra nacen con el canal vaginal cerrado y la canalización de la vagina se produce por el aumento de los estrógenos asociados a la pubertad. Por lo tanto, la apertura vaginal es un parámetro sencillo que nos permite evaluar el tiempo de la pubertad y del desarrollo de la rata hembra⁷⁹. Se ha podido demostrar la interrelación entre el eje adrenal y reproductivo al observarse un retraso en la apertura vaginal cuando las ratas son adrenalectomizadas antes de los 25 días de vida. Esto ocurriría como consecuencia de la falta de la retroalimentación positiva de los glucocorticoides sobre la hipófisis en la secreción de FSH⁸⁰. Aunque, la

adrenalectomía luego del día 25 de vida no modifica la apertura vaginal ni el inicio de la pubertad (alrededor del día 38 de vida), estos resultados nos permiten inferir que la presencia de glucocorticoides es imprescindible, durante una ventana crítica de la vida, posibilitando el desarrollo puberal en la rata hembra. La administración de glucocorticoides también modifica el desarrollo puberal generando un retraso en la apertura vaginal así como un menor peso corporal a edad adulta⁸¹, por lo tanto las hormonas corticoadrenales son capaces de alterar la programación de un individuo, tanto a nivel metabólico como reproductivo.

Cuando la rata hembra adulta es sometida a una adrenalectomía bilateral, las alteraciones se evidencian en el ciclo estral, ya que la ausencia de glucocorticoides genera una atenuación del pico pre-ovulatorio de gonadotrofinas, una inhibición del desarrollo folicular y la posterior ovulación⁸². No sólo la ausencia total de glucocorticoides modifica el ciclo estral, la pérdida del ritmo circadiano de los niveles circulantes de glucocorticoides, también inducen alteraciones reproductivas. Se ha observado que ratas sometidas a una situación de estrés crónico, o por la exposición a luz en forma constante, presentan una detención del ciclo estral en estadio de estro debido a una falla hipotalámica y pineal. Estos eventos se traducen en la falta de desarrollo apropiado del pico pre-ovulatorio de LH, y por lo tanto los folículos pre-ovulatorios se encaminan a la atresia⁸³. Los resultados demuestran que las hormonas adrenales y su ritmo circadiano de secreción están íntimamente asociadas a los picos secreción de FSH y LH, que permiten el desarrollo del ciclo estral. A nivel ovárico, los glucocorticoides generan una inhibición de la actividad de la enzima aromatasa, mientras que estimulan la liberación de progesterona por las células de la granulosa cultivadas *in vitro*⁸⁴.

DESARROLLO PREPUBERAL Y EVALUACIÓN DE LA GAMETOGÉNESIS

La foliculogénesis es el proceso a través del cual las células germinales, junto con las células de sostén ováricas, generan oocitos capaces de ser fecundados⁸⁵. Los folículos son unidades funcionales del ovario que, no sólo contienen al oocito que podrá ser ovulado, además poseen las células encargadas de secretar las hormonas sexuales involucradas en la pubertad y en los ciclos estrales de la rata en edad reproductiva.

Los folículos ováricos comienzan a desarrollarse durante la gestación en las mujeres y durante el desarrollo postnatal en los roedores⁸⁶. El crecimiento del folículo es complejo e involucra la integración de señales de distintos sistemas. En etapas tempranas es imprescindible la regulación paracrina del ovario y posteriormente comienza el desarrollo dependiente de gonadotrofinas⁸⁷.

La clasificación de los folículos utilizada con mayor frecuencia es la de Pedersen y Peters que se basa en el tamaño, número de células de granulosa, la presencia de células de la teca y la morfología folicular. Se utilizan para clasificarlos los nombres de folículo primordial, primario, secundario, antral y pre-ovulatorio o de Graff según su avance en el desarrollo (**Figura D**)⁸⁸. Sin embargo, se ha realizado la búsqueda de marcadores moleculares que permitan diferenciar el estadio folicular de forma precisa, principalmente para poder diferenciarlos en los estados de transición morfológica^{89,90,91}.

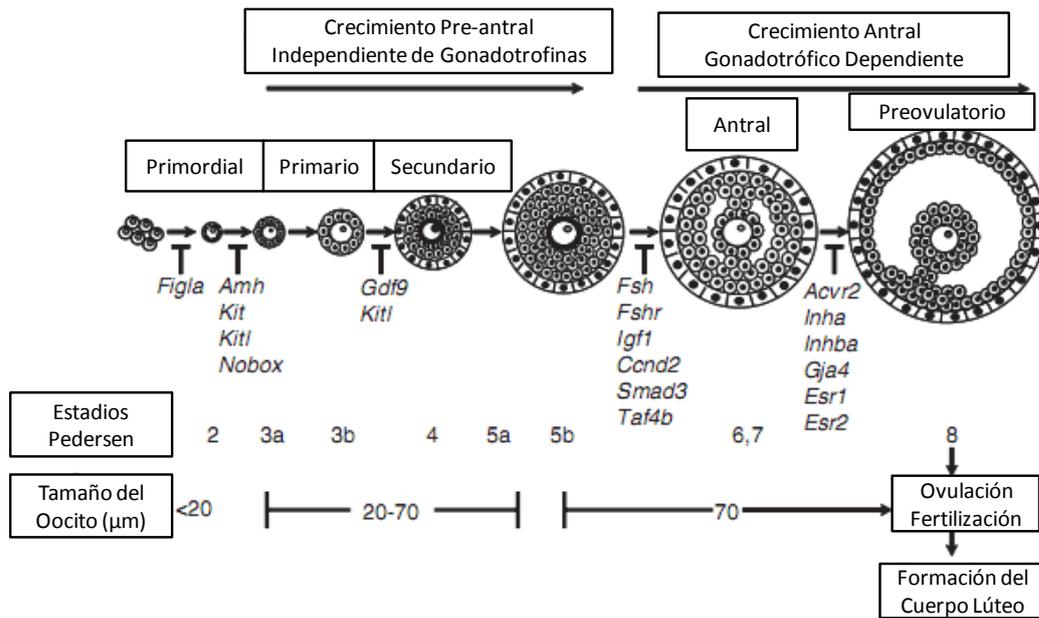


Figura D: Foliculogénesis en la rata. (Modificado de Rajkovic, Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Tercera edición, 2006)

Al nacimiento las ratas presentan oocitos en cordones rodeados por células somáticas y durante los primeros días de vida se desarrolla la foliculogénesis⁸⁶.

Al día 7 de vida comienzan a observarse folículos primarios y secundarios en la región medular ovárica. Los folículos secundarios son capaces de ser distinguidos por una capa más de células de la granulosa respecto a los primarios y la aparición de las células de la teca. Éstas se van diferenciando durante el crecimiento del folículo secundario, junto con el inicio de la angiogénesis tecal, necesaria para la nutrición del oocito el cual no posee irrigación propia⁹².

El desarrollo folicular se mantiene con estas características durante la lactancia de los individuos, donde la proporción de folículos primordiales es predominante; sin embargo, se encuentran folículos en estadios primarios y secundarios que se dirigen a atresia debido a los bajos niveles de gonadotrofinas a edad prepuberal⁸⁶. Al

destete, se identifican folículos antrales con capas concéntricas de células de la granulosa y células de la teca, formando la pared del folículo; y aparecen células del cúmulus, estas son células de la granulosa que se ubican en contacto directo con el oocito y que expresan marcadores diferenciales a las células de la granulosa de la pared folicular⁸⁶.

En el estadio antral, los folículos requieren la presencia de FSH para continuar su maduración, por lo tanto, durante la edad prepuberal los folículos antrales se vuelven atrésicos⁹³. Los oocitos, quedan bloqueados en la profase de la primer división meiótica hasta el momento de la ovulación, en que se reanuda la meiosis y se elimina el primer corpúsculo polar formándose un oocito que podrá ser fecundado⁹².

La apertura vaginal en la rata hembra luego del pico gonadotrófico previo a la primer ovulación determina el desarrollo de la pubertad⁹⁴. La misma se origina por una interacción compleja que involucra al SNC, el eje HHG, las hormonas relacionadas con el estrés y el balance energético del individuo. Diversos factores de transcripción (TGF β , IGF-1, PGE2, entre otros) actúan sobre el hipotálamo y generan una modificación en los perfiles pulsátiles de GnRH que estimulan el pico de liberación de gonadotrofinas marcando el tiempo de inicio de la pubertad⁹⁵. La prolactina y el IGF-1 también actúan a nivel ovárico aumentando el número de receptores de LH y generando un ovario capaz de responder a gonadotrofinas⁹⁶.

Respecto a los esteroides sexuales, los niveles de estrógenos a edad neonatal no generan una retroalimentación negativa a nivel hipofisario debido a los elevados niveles de α -feto proteína que los mantienen unidos y por lo tanto no son capaces de

unirse a su receptor nuclear⁹⁷. Sin embargo, dicha retroalimentación se da a través de los andrógenos aromatizables a estrógenos actuando a nivel de los receptores de estrógenos hipofisarios⁹⁸. A edad peripuberal, la acción inhibitoria de los andrógenos se mantiene constante, sin embargo, la disminución de los niveles de α -feto proteína permiten que los estrógenos biodisponibles participen fundamentalmente en la retroalimentación negativa de la liberación de FSH y LH. El aumento de los niveles de estrógenos, influenciado por diversos factores, entre ellos la dieta y el balance energético, permiten una liberación del pico gonadotrófico por estímulos transitorios de GnRH a nivel hipotalámico⁹⁹.

La pulsatilidad de LH comienza a modificarse a partir de los 30 días de vida de la rata hembra, a su vez, los niveles de prolactina aumentan generando una mayor sensibilidad del ovario a través de la mayor expresión de receptores de LH, permitiendo el inicio de la pubertad alrededor de los 38 días de vida. Aquí el ovario comienza a ser capaz de ovular y de secretar los niveles hormonales circulantes que caracterizan a la rata hembra en edad reproductiva, modificándose el ciclo estral según los estímulos nerviosos y hormonales¹⁰⁰.

A partir de la pubertad aumentan los valores de testosterona, progesterona y estradiol en circulación, mientras que los de 5- α -androstenediol (5 α Diol) disminuyen considerablemente, por la disminución de la actividad enzimática 5- α -reductasa¹⁰¹.

A su vez, se debe tener en cuenta que la pubertad depende del estado metabólico. Ciertos autores determinan que el inicio de la pubertad no se refiere a una edad determinada sino que es importante correlacionarla con el peso corporal de la

hembra. Se ha observado en ratas que la ingesta calórica durante la pubertad es la misma aunque sean sometidas a distintas dietas demostrando que el balance energético debe permitir que se desarrolle la pubertad¹⁰².

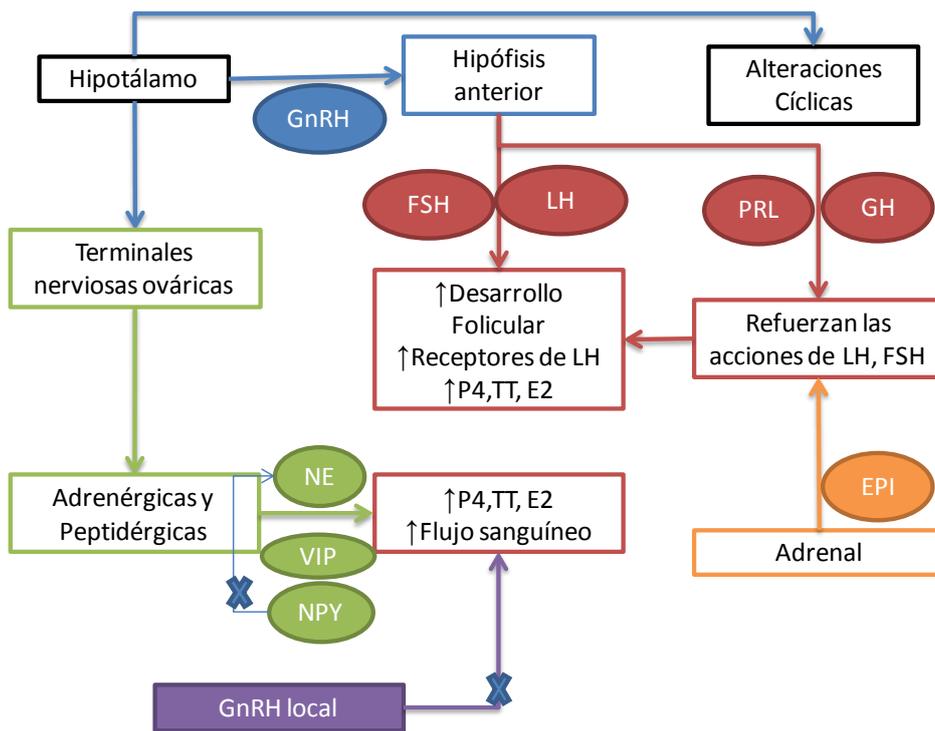


Figura E: Modificaciones neuroendócrinas en la pubertad. (Modificado de Chrousos, Annals of Internal Medicine, 1998).

La pubertad está dada por una serie de eventos complejos interrelacionados (**Figura E**), donde el SNC controla la función hipofisaria a través de factores hipotalámicos y por descargas neurales directas sobre el ovario. Los gonadotrofinas por su parte tienen importancia en el desarrollo sexual, excepto durante las etapas fetales y neonatales de la hembra donde la maduración folicular ovárica es independiente de gonadotrofinas¹⁰³. Luego de la edad neonatal existen tres períodos de activación de gonadotrofinas sobre el ovario. La primera ocurre a la edad

infantil (día 7 a 14 de vida) y se encuentra manifestado por un aumento esporádico de la secreción de FSH debido a modificación en los aferentes GABAérgicos y glutamaérgicos sobre las neuronas GnRH, generando un aumento de la actividad neuronal. En el inicio de la pubertad tiene lugar la segunda activación del ovario finalizando la edad juvenil, el pico gonadotrófico se desarrolla por una inhibición coordinada de neuronas productoras de GABA y opiodes, con un aumento de la acción de los estímulos excitatorios (glutamato, noradrenalina, NPY, KiSS-1) sobre la conexión neuronal de GnRH, resultando en un aumento de la liberación de LH. Finalmente, el tercer período de activación ovárica está determinado por el aumento de la secreción de estradiol posterior a la descarga pre-ovulatoria de GnRH/gonadotrofinas^{104,105}.

La primer ovulación, la cual ocurre durante el inicio del primer estro, está acompañada por la canalización de la vagina por el estímulo estrogénico sobre las células epiteliales de la misma, a través de esta manifestación se considera el inicio de la edad reproductiva de la rata hembra¹⁰⁵. A partir de la apertura vaginal, el ciclo hormonal de la rata puede ser estudiado analizando la morfología celular de la vagina.

EL CICLO ESTRAL DE LA RATA Y SU PROGRAMACIÓN NEONATAL

La transformación del epitelio de la vagina de la rata hembra refleja las variaciones endometriales dadas por las modificaciones de las concentraciones de estrógenos durante el ciclo estral. La citología exfoliativa permite analizar los cambios hormonales del ciclo, principalmente la acción directa de los estrógenos sobre la mucosa vaginal¹⁰⁶. La rata es un animal poliéstrico, no estacional, y su

ciclo estral varía entre 4 a 5 días de duración. Durante el mismo, es posible diferenciar cuatro etapas que se caracterizan por diferencias en los niveles plasmáticos de las hormonas reproductivas: proestro, estro, metaestro, y diestro **(Figura F)**^{107,108}.

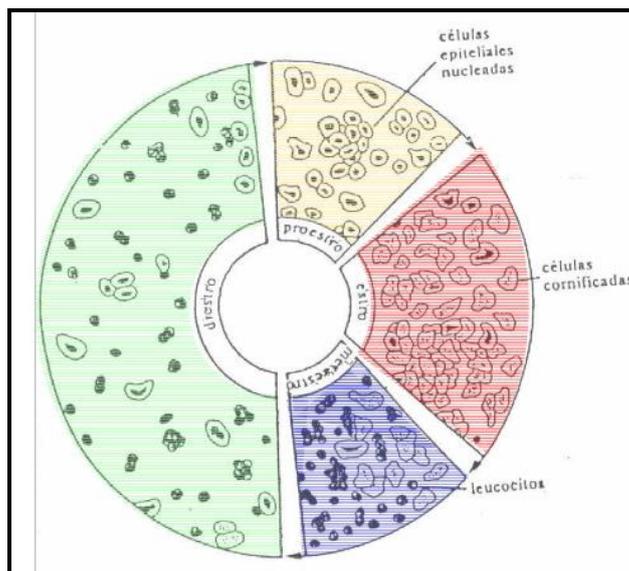
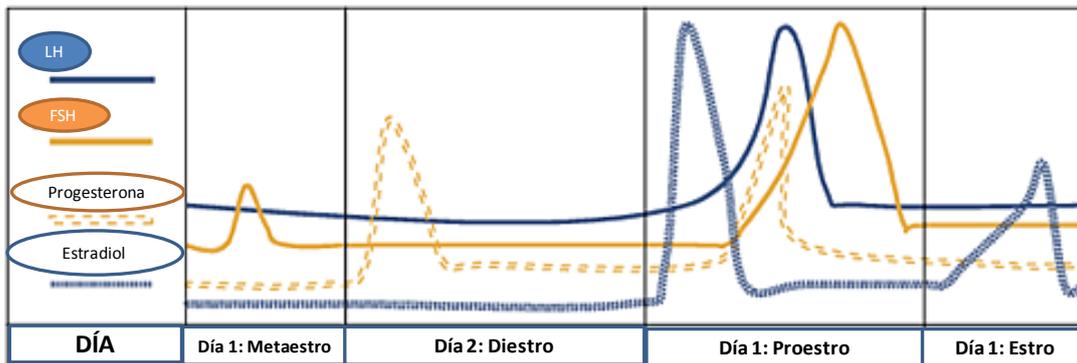


Figura F: Modificaciones hormonales durante el ciclo estral de la rata hembra. Alteraciones en la citología vaginal dependientes de las concentraciones de estrógenos. (Modificado de Radi, J Toxicol Pathol, 2009; Fernandez Guasti, Psychoneuroendocrinology, 1992)

El proestro dura aproximadamente 12 horas y a nivel ovárico se encuentran folículos antrales en expansión que secretan estrógenos, promueven la proliferación

y el engrosamiento del epitelio vaginal. Al final del proestro, comienza el aumento en la frecuencia de la liberación de GnRH y en consecuencia el aumento de LH y FSH. En la citología vaginal observamos durante este estadio, células epiteliales nucleadas con escasa o nula presencia de linfocitos¹⁰⁹.

A continuación, comienza el estro, período en el que ocurre la ovulación, la recepción del macho, la lordosis y es cuando la hembra se encuentra sexualmente activa. Se observa que la hembra posee hinchazón de la vulva y despliega comportamientos de receptividad sexual. El estro dura 13 horas (aproximadamente) y se liberan entre 10 a 15 óvulos por ovulación. Debido a la caída de los niveles de estrógenos, las células de la vagina se descaman, observándose al microscopio una gran cantidad de células queratinizadas o cornificadas, irregulares y sin la presencia del núcleo¹⁰⁹.

Luego, se da el metaestro, etapa caracterizada por la presencia del cuerpo lúteo, el cual secreta progesterona y los pequeños folículos antrales comienzan su crecimiento. Al microscopio, se observan células queratinizadas o cornificadas y linfocitos que comienzan a migrar hacia el lumen vaginal. El metaestro tiene una duración aproximada de 21 horas¹⁰⁹.

Finalmente, ocurre el diestro que puede durar entre 48 a 56 horas. Durante esta fase continúa el crecimiento folicular por el aumento de la FSH y por lo tanto también el aumento de estradiol. En el lavado vaginal se observan gran cantidad de linfocitos, y es posible encontrar pocas células epiteliales nucleadas^{107,108}.

Es conocido que una alteración de los niveles de los esteroides sexuales durante etapas tempranas de vida pueden modificar la programación neonatal de la rata

hembra observándose modificaciones de su ciclo estral en la edad reproductiva¹¹⁰. Por lo tanto, el análisis del ciclo estral es una herramienta que nos permite identificar la ventana temporal crítica de acción de los esteroides sexuales en la programación de la función reproductiva en la rata hembra¹¹¹.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

“La modificación neonatal de la acción androgénica impacta sobre la programación metabólica y la función reproductiva de la rata hembra, induciendo alteraciones que se perpetúan a edad prepuberal y adulta temprana”

Objetivo General.

El objetivo general de este estudio es avanzar en el esclarecimiento de mecanismos fisiopatológicos responsables del desarrollo de cambios en el metabolismo y la función esteroidogénica adrenal y ovárica como consecuencia de una modificación de la acción androgénica, ya sea por una hiperandrogenemia temprana como por un bloqueo de los receptores de andrógeno a edad neonatal. Está postulado que la androgenización pre-o neonatal en el sexo femenino interaccionaría con factores genéticos, el medio ambiente (dieta, etc.) o la combinación de ellos, afectándose la programación en la diferenciación de tejidos blanco para andrógenos y modificando la insulino-sensibilidad durante la edad reproductiva. Sin embargo, aún no existe consenso internacional sobre los mecanismos involucrados en las alteraciones inducidas por el temprano exceso androgénico, se infiere que las modificaciones estarían vinculadas a la producción adrenal/ovárica de andrógenos, y las modificaciones endócrinas adipocitarias que puedan afectar el estado metabólico del individuo. Estos estudios podrían aportar al esclarecimiento del desarrollo de insulino-resistencia y la contribución androgénica al desarrollo sexual de la rata hembra, dependientes de una temprana alteración de la actividad de los esteroides sexuales.

Objetivos Específicos

1. Estudiar *in vivo* las alteraciones en la programación metabólica en la rata hembra inducidas por el tratamiento neonatal con propionato de testosterona (PT) o flutamida (FM), a través de medidas antropométricas, del análisis del tejido adiposo parametrial y del perfil metabólico de los animales a edades prepuberal y adulta.
2. Investigar la glándula adrenal como fuente esteroidogénica, determinando la secreción *in vitro* de corticosterona y testosterona por células adrenales enriquecidas (zonas fasciculata y reticularis) provenientes animales CT, PT y FM.
3. Estudiar los mecanismos involucrados en la síntesis de esteroides, analizando la expresión de las enzimas claves en la vía esteroidogénica en las glándulas adrenales y ováricas en todos los grupos de estudio.
4. Examinar la función reproductiva de los animales PT y FM a: i) la edad prepuberal estudiando la foliculogénesis y la respuesta ovárica por el tratamiento con un xenoestrógeno y posterior cultivo de células de la granulosa y, ii) la edad adulta, analizando el ciclo estral, la morfología ovárica y el rol indirecto del SNC por la inducción de la secreción de estradiol debido al estímulo *in vivo* de hCG/LH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales Experimentales

En todos los experimentos realizados, se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley, generadas por el Servicio de Bioterio del IMBICE. Las ratas se mantuvieron en cuartos con ciclos de luz (12 hs) y oscuridad (12 hs) controlado (período de luz de 07:00 hs a 19:00 hs), temperatura constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y libre acceso a bebida y alimento balanceado comercial para rata/ratón (marca Ganave). Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por la Comisión Institucional de Uso de Animales para Experimentación del IMBICE y el uso de animales se realizó de acuerdo a las normas internacionales/nacionales aceptadas¹¹².

Diseño experimental

MODELOS ANIMALES

Con el propósito de evaluar el impacto del exceso de andrógenos sobre la función metabólica y esteroidogénesis (adrenal y ovárica), se trabajó con un modelo de androgenización neonatal previamente utilizado en este laboratorio⁵⁷. Brevemente, a un grupo de animales hembra, de 5 días de vida, se les administró una única inyección subcutánea (s.c.) de 50 μl de aceite de maíz sólo (grupo CT) o conteniendo 1,25 mg de propionato de testosterona (grupo PT). Los animales se estudiaron a los 30 y 60 días de vida. Adicionalmente, con el objetivo de bloquear los andrógenos endógenos, se generó un tercer grupo experimental (grupo FM) administrando vía s.c 1,75 mg de un antiandrógeno no esteroideo (Flutamida), a los 5 días de vida disuelto en aceite de maíz¹¹³.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

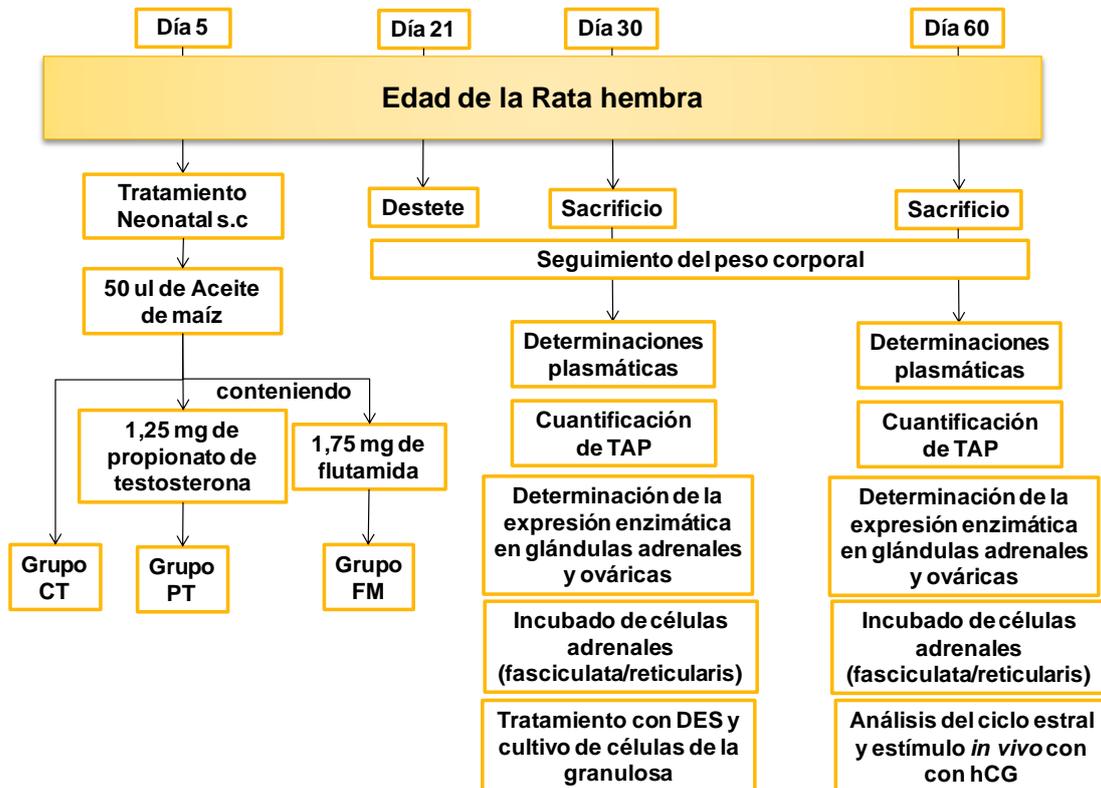
Los animales CT,PT y FM fueron destetados al día 21 de vida, a partir del cual se registró el consumo diario de alimento y su peso corporal hasta el día de su sacrificio en edad prepuberal (30 días) o adulta (60 días).

Al día del sacrificio se recolectó la sangre corporal y se analizó el perfil plasmático de diferentes metabolitos y hormonas de la función reproductiva. Además, en ambas edades, se cuantificó el depósito de tejido adiposo parametrial (TAP) y se disecaron las glándulas ováricas y adrenales con el objetivo de estudiar la función esteroidogénica por medidas de la expresión enzimática de P450scc y P450c17 por PCR real time.

A su vez, se estudió la participación de las glándulas adrenales y ováricas como fuentes de liberación de esteroides. Se evaluó la función de la corteza adrenal *in vitro* por la incubación de células aisladas de la zona fasciculata-reticularis en ausencia o presencia de ACTH, determinando la secreción de corticosterona y testosterona. Respecto a la función reproductiva, ratas hembra pre-púberes de los tres grupos de estudio, CT, PT y FM, fueron sometidas a la inyección subcutánea de 1 mg de dietilestilbestrol (DES) entre los días 25 a 27 de vida, por tres días consecutivos, con el fin de estimular el desarrollo de folículos antrales. A partir de éstos, se aislaron y cultivaron las células de la granulosa analizando la secreción de estradiol espontánea o estimulada con hCG.

A partir de los 50 días de vida, se realizó el seguimiento diario de los ciclos estrales de las ratas a través del análisis en fresco del extendido vaginal pertenecientes a los tres grupos de estudio durante un mes, observando la presencia o ausencia de

las distintas etapas pertenecientes al ciclo estral. Finalmente, con el fin de evaluar indirectamente el rol del SNC en el desarrollo de la función reproductiva de las ratas CT, PT y FM, se realizó un estímulo *in vivo* por la administración aguda de hCG en los animales adultos, estudiando la secreción de estradiol a la periferia, permitiendo inferir si el ovario de los animales tratados neonatalmente es capaz de responder a hCG/LH.



Esquema del diseño experimental

Metodología

REGISTROS ANTROPOMÉTRICOS Y DETERMINACIÓN DE MARCADORES BIOQUÍMICOS PERIFÉRICOS

Se registró diariamente en todos los animales desde el destete y hasta el día experimental inclusive (30 o 60 días): el peso corporal y el alimento ingerido. Los animales fueron sacrificados por decapitación (08:00-10:00 hs), se recolectó sangre corporal (EDTA-FNa).

El plasma obtenido fue almacenado (-20 °C) y se utilizó para la determinación de glucosa, triglicéridos, corticosterona¹¹⁸, insulina⁵⁷, leptina¹¹⁴, testosterona total (TT)¹¹⁵, 5-alfa-androstenediol (5 α Diol)¹¹⁶, delta-4-androstenediona (Δ 4A), estradiol (E₂)¹¹⁵ y 17-hidroxiprogesterona (17OHP4).

Determinación de glucosa (Glu).

Se utilizó un reactivo comercial del laboratorio Wiener Argentina. Este es un ensayo enzimático para la determinación de glucosa que utiliza dos reacciones acopladas, dando lugar a la formación final de un cromógeno con absorbancia máxima a 505 nm. Esta absorbancia resulta directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

Determinación de triglicéridos (TG).

Se utilizó también un reactivo del Laboratorio Wiener. En forma similar a la determinación de glucosa, se trata de un ensayo enzimático, que utiliza cuatro reacciones acopladas, dando lugar a la formación de un cromógeno

con absorbancia máxima a 505 nm. Esta absorbancia es directamente proporcional a la concentración de TG en la muestra.

Determinación de leptina (Lep).

La determinación de leptina en las muestras se realizó por un RIA desarrollado en el laboratorio. El buffer utilizado consiste en EDTA 0,025 M, NaCl 0,9 % (p/v), Tritón (100x) 0,05 % (v/v) y Albúmina Sérica Bovina (BSA) 0,5 % (p/v), disuelto en buffer fosfato (PBS) 0,05 M, pH = 7,4. Para este ensayo se utilizó un antisuero anti-leptina de ratón obtenido en conejo desarrollado en nuestro laboratorio, este anticuerpo reconoce de manera específica leptina de rata y ratón y presenta una reactividad cruzada menos al 1% con leptina humana¹¹⁷.

La hormona con marca radiactiva, utilizada como trazador, se generó en el laboratorio. Para ello se utilizó el método de Cloramina T que permite la iodinación de residuos tirosina de la hormona peptídica. Esta reacción implica un primer paso de activación del ¹²⁵INa (1 mCi, Amersham Biosciences) con 10 µg/10 µl de cloramina T durante 15 segundos, luego se contacta con 5 µg/5 µl de leptina (Pre Pro Tech, Inc.) por 30 segundos. La reacción se detiene con el agregado de 80 µg/10 µl de Metabisulfito de Sodio. La separación de la hormona iodinada del yoduro radiactivo no incorporado se realiza en una columna de 75 cm de Sephacryl S-300, utilizando un buffer: 0,5% BSA; 0,025 M EDTA; 0,1% Azida sódica; 0,05 M PBS; 0,9 % NaCl.

Para el protocolo específico del RIA se realizó una incubación durante toda la noche a temperatura ambiente de las muestras o estándares (200 µl) con

50 µl del antisuero anti-leptina de ratón (policlonal, desarrollado en conejo en el IMBICE, cruza menor al 1% con leptina humana). Posteriormente se agrega 50 µl del trazador (aproximadamente 30.000 cpm) y se deja otras 24 hs de incubación a temperatura ambiente. La separación de la fracción de hormona libre, de la unida al anticuerpo se realiza por precipitación de los complejos hormona-anticuerpo utilizando un antisuero anti-γ-globulina de conejo obtenido en oveja diluído 1/50, Suero Normal de Caballo 1/10 en PBS y de PEG 6000 (10% en PBS). Se incuba 30 min. a temperatura ambiente, se centrifuga 30 min a 3.500 rpm a 4°C y se aspiran los sobrenadantes.

La radiactividad γ emitida por los precipitados se registra en un contador adecuado. Las cpm de las muestras fueron convertidas en concentración utilizando una curva estándar. El ensayo posee un rango de detección entre 0,2 y 25 ng/mL.

Determinación de corticosterona (B).

La medida de corticosterona total se realizó por un RIA desarrollado en este laboratorio¹¹⁸. En este caso se requiere una extracción previa del analito de la muestra, que se realiza a partir de 10 µl de plasma al que se le agrega 1 ml de diclorometano, y se agita en vortex durante 1 min. Luego la fase orgánica se trasvasa a un tubo limpio donde se la evapora a 40°C. El extracto seco se resuspende en un volumen apropiado de buffer de trabajo (gelatina 0,1 % (p/v), en PBS 0,05 M, (pH= 7,4)).

Para la detección de B en plasma utilizamos un antisuero de conejo anti-corticosterona de rata desarrollado en el IMBICE. La hormona utilizada como trazador es de origen comercial y está marcada con tritio (³H-

Corticosterone, Perkin Elmer, Life Sciences, Inc). La curva estándar posee un límite de detección de 0,975 µg/dl. La mezcla de reacción se incubó a 4°C toda la noche y la separación de la fracción libre de la unida se realiza por agregado de una mezcla de 1% carbón – 0,1% sulfato de dextrán en buffer de trabajo. Se incubó en baño de hielo 10 min., se centrifugó a 4.000 rpm (a 4°C). Los sobrenadantes se recuperaron en tubos conteniendo líquido de centelleo (EcoLite™, ICN). Las cpm de las muestras fueron convertidas en concentración utilizando una curva estándar adecuada y un programa de computación para tal fin.

Determinación de insulina (Ins)

Para esta determinación se utilizó un RIA específico semi-desarrollado¹¹⁹. El buffer utilizado está compuesto por PBS 0,05 M, pH=7,4, conteniendo 0,5% BSA. El anticuerpo primario fue de origen comercial (Sigma Chemical Co.), que consiste en un anticuerpo policlonal obtenido en cobayo.

La hormona radiactiva (trazador) se generó en este laboratorio, para ello se utilizó el método de Cloramina T, ya descrito anteriormente. El sustrato de iodinación fue insulina comercial obtenida de páncreas porcino (Sigma Chemical, Co.). Luego, la separación de la hormona marcada y el ¹²⁵Iodo no incorporado se realizó en una columna de 50 ml conteniendo un empaquetado de Sephadex G-50, utilizando como buffer de corrida: Acetato de sodio 50 mM; BSA 0,01% (p/v); Azida sódica 0,1%; pH=6,5.

Las muestras o estándares (50 µl) se incubaron con el antisuero anti-Insulina de rata (Sigma Chemical, Co) a 4°C durante 16-24 hs, y la

separación de la fracción libre de la unida se realizó por el agregado de una mezcla de carbón 2,5% y sulfato de dextrán al 0,25% disueltos en buffer RIA para insulina. Luego los tubos se colocaron 10 min. en baño de hielo, se centrifugó 10 min. a 4.000 rpm y se aspiraron los sobrenadantes. La radiactividad y emitida por los precipitados se mide en un contador adecuado. Las cpm de las muestras fueron convertidas en concentración utilizando una curva estándar con un límite de detección de 0,18 ng/ml.

Determinación de estradiol (E₂)

La determinación de estradiol total se realizó por un RIA desarrollado en este laboratorio¹¹⁵. En este caso se requiere una extracción previa del analito de la muestra, que se realiza a partir de 250 µl de plasma al que se le agregan 2,5 ml de éter di etílico, y se agita en vortex durante 1 min. Luego la fase acuosa se congela 10 minutos a -80°C y la fase orgánica se trasvasa a un tubo limpio donde se la evapora a 40°C. El extracto seco se resuspende en un volumen apropiado de buffer de trabajo (gelatina 0,1 % (p/v), en PBS 0,05 M, pH= 7,4).

Para la detección de estradiol en plasma utilizamos un antisuero de conejo anti-estradiol desarrollado en el IMBICE. La hormona utilizada como trazador es de origen comercial y está marcada con tritio (³H-Estradiol, Perkin Elmer, Life Sciences, Inc). La curva estándar posee un límite de detección de 19,53 pg/mL. La mezcla de reacción se incuba a 4°C toda la noche y la separación de la fracción libre de la unida se realiza por agregado de una mezcla de 1% carbón – 0,1% sulfato de dextrán en buffer de trabajo. Se incuba en baño de hielo 10 min., se centrifuga a 4.000 rpm (a 4°C). Los

sobrenadantes se recuperaron en tubos conteniendo líquido de centelleo (EcoLite™, ICN). Las cpm de las muestras fueron convertidas en concentración utilizando una curva estándar adecuada y un programa de computación para tal fin.

Determinación de testosterona total (TT).

La medida de testosterona total se realizó por un RIA específico desarrollado en este laboratorio¹¹⁵. Se requiere una extracción previa del analito de la muestra, que se realiza a partir de 100 µl de plasma al que se le agrega 1 ml de éter di etílico, y se agita en vortex durante 1 min. Luego la fase acuosa se congela 10 minutos a -80°C y la fase orgánica se trasvasa a un tubo limpio donde se la evapora a 40°C. El extracto seco se resuspende en un volumen apropiado de buffer de trabajo (gelatina 0,1 % (p/v), en PBS 0,05 M, pH= 7,4).

Para la detección de testosterona en plasma utilizamos un antisuero de conejo anti-testosterona desarrollado en el IMBICE. La hormona utilizada como trazador es de origen comercial y está marcada con tritio (³H-Testosterone, Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Inc). La curva estándar posee un límite de detección de 0,01 ng/mL. La mezcla de reacción se incuba a 4°C toda la noche y la separación de la fracción libre de la unida se realiza por agregado de una mezcla de 1% carbón – 0,1% sulfato de dextrán en buffer de trabajo. Se incuba en baño de hielo 10 min., se centrifuga a 4.000 rpm (a 4°C). Los sobrenadantes se recuperaron en tubos conteniendo líquido de centelleo (EcoLite™, ICN). Las cpm de las muestras

fueron convertidas en concentración utilizando una curva estándar adecuada y un programa de computación para tal fin.

Determinación de $\Delta 4A$, 5 α Diol y 17OHP4.

La medida de $\Delta 4A$, se realizó con el kit de RIA comercial Belckman Coulter. La determinación de 5 α Diol se realizó a través de un RIA semi-desarrollado utilizando el anticuerpo específicamente purificado 5 α -androstane-3 α -17 β -diol-15-CMO-HSA de Immunotech Diagnostic (Montreal, Canada)¹¹⁶ El dosaje de 17OHP4 se realizó con un kit RIA comercial de Immunotech (Belckman Coulter).

EVALUACIÓN DE ARN MENSAJEROS EN GLÁNDULAS ADRENALES Y OVÁRICAS POR RT-PCR TIEMPO REAL

Los respectivos tejidos provenientes de los diferentes grupos de animales según cada tratamiento neonatal, fueron rápidamente congelados, por inmersión de Nitrógeno líquido, y mantenidos a -80°C hasta su posterior homogeneización, extracción y semi cuantificación, por RT-PCR, de los diferentes ARNm. El aislamiento del ARN total se realizó utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen); para la técnica en un solo paso, versión mejorada de la desarrollada por Chomczynski¹²⁰. Posteriormente, se cuantificó midiendo la absorbancia a 260, 280 y 230 nm. Una vez obtenido el ARN, se utilizó 1 μg de ARN total para realizar la transcripción reversa usando random primers (250 ng) y la enzima Superscript™ III Reverse Transcriptase (200 U/ μL , Invitrogen, Life tech). Una vez obtenido el producto, se utilizó 1 μl para ser amplificado con 0,5 μM de los primers específicos (Detallados en la **Tabla 1**) utilizando el kit para PCR tiempo real 5x Hot FirePol

EvaGreen qPCR (Solis BioDyne) en un ciclador MJ Mini Opticon (Bio Rad), teniendo en cuenta el siguiente esquema de ciclado: un ciclo de 15 min. a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 seg. a 95°C, 30 seg. a 50-60°C (dependiente de la temperatura de annealing de cada par de primers utilizado), y 30 seg. a 72°C. Es válido aclarar que todos los primers utilizados fueron diseñados con el software primer 3.

	Primers (5'-3')	GBANK	pb
B-Actina	se, GGTCCACACCCGCCACCAG	NM_031144.3	200
	as, GGGCCTCGTCGCCACGTA		
P450scc	se, TGGCAGGAGGGGTGGACACG	NM_017286.2	113
	as, GCGCCGGGCAGCTAGAACTT		
P450c17	se, AGCTGGCCAGGGAGGTGCTC	NM_012753.2	101
	as, GGCCACGCCTTTCCCTTGGT		
Aromatasa	se, TGGCCTCAACCTCACCACGGA	NM_017085.2	100
	as, CCCGGCTCTCTGGATGGATGC		

Tabla 1. Primers utilizados en las reacciones de PCR tiempo Real. se, sentido; as, antisentido; GBAN, Número de acceso a GenBank; pb, longitud del amplificado en pb.

La eficiencia de la PCR fue cercana a 1. Las muestras se ensayaron por duplicado, en tubos separados. La identidad y pureza del producto amplificado se chequeó mediante el análisis de la curva de melting realizada al final de la amplificación. Para determinar las expresiones relativas en cada grupo experimental se utilizó el método de cálculo de la diferencia entre los Cts (ΔC_t), de la siguiente manera: Ct del gen de interés – Ct del gen de referencia. En nuestro caso, el gen de referencia

utilizado fue β -actina, dado que sus niveles de ARNm no difieren entre el grupo control y el experimental. Finalmente, los cambios relativos en el nivel de expresión fueron calculados según la diferencias de Cts del grupo CT. ($\Delta\Delta Ct$).

CONTENIDO DE 17OHP4 OVÁRICO Y ADRENAL

Se realizó la extracción de las glándulas adrenales y ováricas en HCl 0,01N. Las mismas fueron sonicadas por 10 a 20 segundos y se realizó una centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos. En el sobrenadante se determinó 17OHP4 por RIA comercial (Bio Analytical). Se correlacionó el contenido esteroideo con la cantidad de proteínas totales del extracto, las cuales se midieron utilizando un reactivo comercial del Laboratorio Wiener. El fundamento de esta determinación se basa en una reacción de una solución que contiene ión cúprico, el cual reacciona con los enlaces peptídicos en medio alcalino, para dar un complejo violáceo con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra.

HISTOLOGÍA DE LAS GLÁNDULAS OVÁRICAS.

Para los estudios histológicos, se disecaron los ovarios y se fijaron los tejidos en formaldehído al 4% durante 8 horas. La fijación se detuvo lavando la muestra bajo chorro continuo de agua corriente durante 10 minutos y luego se enjuagaron en PBS por 10 minutos. Se deshidrataron en baños sucesivos de soluciones de alcohol etílico de concentración creciente: 70° un solo baño (24 hs hasta 2 días), 96° dos baños de 2 hs cada uno, y 100° dos baños de 2 hs cada uno. Se aclararon en Xilol (Merk, Argentina), dos baños de 3 hs. cada uno. La inclusión en parafina Histoplast® (Biopack) se realizó en estufa, con 2-4 hs. por baño. Una vez completa

la impregnación, se retiró la muestra, se volcó en el molde cuidando que el tejido quede centrado en el bloque. Una vez solidificada, se procedió a su tallado y fijado al taco para su corte con micrótopo. Se obtuvieron láminas de 4-5 micras de espesor. Finalmente, los cortes fueron examinados con lupa binocular (Hill Strübin, Wetzlar, Alemania) para seleccionarlos antes de su tinción. El procedimiento seguido para la tinción simple eosina-hematoxilina, se detalla en la **Tabla 2**.

Una vez teñidas y realizado el montaje, las muestras se dejaron secar en estufa, y luego se analizaron con un microscopio óptico Nikon. El análisis morfométrico-cuantitativo se realizó utilizando una cámara Sony RGB CCD en conjunto con el software Image Pro Plus 6.0. Para cada muestra se seleccionaron 5 secciones de cada animal (n=4 animales por grupo). Se analizaron 15 campos al azar para cada sección, de acuerdo a su morfología se clasificaron los folículos según su grado de avance y se determinó el porcentaje folicular, así como la presencia o ausencia de cuerpos lúteos o estructuras quísticas.

Proceso	Reactivos	Minutos
Desparafinado	Xilol	5
Hidratación	Agua Destilada	5
Hidratación	Alcohol 80°	1
Hidratación	Alcohol 70°	1
Hidratación	Alcohol 50°	1
Tinción	Hematoxilina	2
Enjuague	Agua Destilada	3
Tinción	Eosina 1%	1
Deshidratación	Alcohol 50°	1
Deshidratación	Alcohol 70°	1
Deshidratación	Alcohol 80°	1
Deshidratación	Alcohol 95°	1
Aclaración	Xilol	Pasaje
Montaje	Bálsamo de Canadá	

Tabla 2. Tinción eosina-hematoxilina para cortes de ovario incluidos en parafina.

Estudios in vivo

RESPUESTA AL ESTÍMULO DE HCG A EDAD ADULTA

Las cirugías se realizaron en un cuarto apropiado del Servicio de Bioterio del IMBICE, y se utilizó material adecuado y en condiciones de asepsia normalmente requeridas. El índice de mortalidad por cirugía fue menor al 5%. Desde el día 50 de vida se analizó el ciclo estral, por lavados vaginales diarios, de los animales CT, PT y FM. Los animales fueron anestesiados con Embutal (120 g/l; 500 µL/ 150g de peso corporal, i.p.). El grupo CT y FM fue canulado luego de tres ciclos consecutivos, en diestro con el fin de inhibir el pico pre-ovulatorio de LH. Los animales PT se canularon en estro ya que presentaron un estro constante. Para la operación en sí, se realizó un corte en la zona ventral derecha del cuello del animal, accediendo a la vena yugular lateral correspondiente. En ésta, se implantó un catéter flexible y

estéril (Silastic®), que se sujetó a la vena con hilo quirúrgico estéril. La vía se mantuvo permeable perfundiendo un pequeño volumen de solución fisiológica i.v. débilmente heparinizada. Luego de tomar una primer sangría (basal), se le suministró un bolo de hCG (5 mUI /g de peso corporal) a través de la cánula en un volumen de 0,5 ml, utilizando como vehículo solución fisiológica estéril¹²¹. Las extracciones seriadas de sangre se realizaron inmediatamente antes de la administración (tiempo 0) y a los 60 y 120 minutos post-administración del estímulo y se determinó en ellas las concentraciones de estradiol plasmático.

Estudios in vitro

INCUBADO DE CÉLULAS DE CORTEZA ADRENAL ENRIQUECIDAS.

Las glándulas adrenales fueron disecadas inmediatamente al sacrificio y por punción de las mismas se separó la cápsula del resto de la glándula, obteniéndose de esta forma una fracción enriquecida de células provenientes de las zonas fasciculata y reticularis¹²². Las células fueron digeridas mecánica-enzimáticamente durante 45 minutos a 37 °C en medio EEBS con el agregado de colagenasa tipo I (2 mg/ml) y DNAsa (0,01 mg/ml). Luego, las células fueron filtradas y centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente y resuspendidas en medio EEBS. Se procedió a realizar dos lavados semejantes. Luego, las mismas fueron resuspendidas en medio EEBS a una concentración de 250.000 cél/0,9 ml de medio y este volumen fue distribuido en tubos de poliestireno y a los que se les adicionó 100 µl de medio sólo (secreción basal) o conteniendo ACTH (0,1, 1 y 10 ng/ml). Las células fueron incubadas durante 120 minutos (37°C en atmósfera de 95 % aire

analítico- 5%CO₂). Al final de la incubación, se separó el medio de las células por centrifugación 10 minutos, 1000 rpm a temperatura ambiente. El medio de incubación fue almacenado a -20°C para la determinación de testosterona y corticosterona. En las células remanentes se determinaron los niveles de ARNms de P450 scc y P450c17 por RT-PCR tiempo real.

CULTIVOS DE CÉLULAS OVÁRICAS PROVENIENTES DE ANIMALES PRE-PÚBERES.

Con el fin de estimular el desarrollo ovárico de las ratas a estadio antral temprano, los animales de los distintos grupos de estudio (CT, PT y FM) fueron diariamente inyectadas (s.c.) con 1 mg de dietilestilbestrol (DES/100 µl) entre los días 25 a 27 de vida por tres días consecutivos¹²³. El xenoestrógeno permitió que los folículos en estadios tempranos, que poseen una sola capa de células de la granulosa, puedan madurar hasta el estadio antral temprano, acompañado por una proliferación de las células de la granulosa¹²⁴. Los animales se sacrificaron entre los días 28 y 30 de vida. Se disecaron los ovarios y se colectaron en un recipiente conteniendo medio DMEM/F12 frío. Los tejidos se perforaron con una aguja 21xg y se trataron con una solución de EGTA 6,8 mM por 15 minutos a 37°C, luego se cambió el medio por DMEM/F12 conteniendo sacarosa 0,5 M y se colocaron 5 minutos a 37°C seguido de 5 minutos sobre hielo en escamas. Las células ováricas se pasaron a través de un filtro Nitex de 50 µm y se realizaron dos lavados con DMEM/F12. Finalmente, se procedió al aislamiento diferencial de células de la granulosa por una centrifugación diferencial utilizando Percoll al 40% (v/v). Se recuperaron las células de la interfase, se lavaron y se sembraron a una relación de 350.000 células vivas por pozo en placas de cultivo, pre-tratadas con colágeno extraído de cola de rata

(ver a continuación), diluidas en medio DMEM/F12 modificado suplementado con $\Delta 4A$ (10^{-7} M) y antibióticos. Luego de 3 horas de incubación a 37°C y en atmósfera de 95% aire y 5% CO_2 . Se cultivaron con medio DMEM/F12 suplementado sólo o conteniendo hCG (0,05-0,5 UI/pozo) durante 48 hs, a 37°C y bajo atmósfera de 5% CO_2 . Al finalizar el cultivo en los medios de incubado se almacenaron a -20°C y se determinó la concentración de estradiol, por RIA, liberado al medio de cultivo.

Extracción de colágeno de cola de rata

Se disecaron colas de rata Sprague-Dawley adultas y se lavaron con etanol 70% (v/v) por 20 minutos. En condiciones de esterilidad, se retiró la piel y se aislaron los tendones, lavándolos con agua calidad MiliQ estéril. Se colocaron en ácido acético glacial al 1% (v/v) durante 48 horas a 4°C fijas a un rotador horizontal 100 rpm. Finalmente, se centrifugó a 35.000 g por una hora y se conservó el sobrenadante a 4°C . Se realizó la curva de gelificación del colágeno sobre la placa utilizando colágeno al 60%(v/v) en agua estéril, NaOH 1M y RPMI 5X.

Análisis estadístico de los resultados

Para los experimentos *in vivo*, cada grupo de estudio estuvo constituido por una población de 8-10 animales. En los protocolos realizados *in vitro* se utilizaron, aproximadamente, 10 réplicas por estímulo y se realizaron entre 3 a 5 experimentos diferentes. Los resultados obtenidos, se expresaron como la media \pm EEM, y fueron sometidos a análisis estadísticos. Para el procesamiento estadístico

se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad software, San Diego, California (USA). Se realizó el test de ANOVA de una vía con posterior realización del test de Bonferroni, para determinar las diferencias significativas entre los valores de la media obtenidos en los diferentes grupos de estudio. Para análisis de datos provenientes de los experimentos de cuantificación de la expresión de ARNm se procedió a someter los mismos al análisis estadístico utilizando una prueba no paramétrica.

RESULTADOS

Capítulo 1: Edad Prepuberal

IMPACTO DE LA INTERVENCIÓN NEONATAL SOBRE LA INGESTA DE ALIMENTO Y EL CRECIMIENTO DE LA RATA HEMBRA DURANTE EL PERÍODO PREPUBERAL

La inducción de una hiperandrogenemia transitoria (PT) y el bloqueo del receptor de andrógeno (FM) modificaron la programación endocrino-metabólica de la rata hembra. Durante el estudio, se observó (**Figura 1**) que el consumo diario de alimento a partir del día destete, incluso cuando el mismo es corregido por el peso corporal (PC) del día anterior, fue menor en el grupo FM (durante los días 21 a 24 de vida) al compararlo con los grupos CT y PT. Cabe destacar que los animales de todos los grupos presentaron similar PC al día 21 de vida (día del destete). Sin embargo, es posible observar en la **Figura 1** (panel derecho) una disminución en la ganancia de PC en los animales FM, lo cual se evidencia claramente a partir del día 24 de vida, y ocurre hasta el día 30 de vida. Los animales PT no presentaron diferencias significativas respecto al CT en el consumo diario de alimento, aunque muestran un aumento significativo en la ganancia de PC entre los 27 y 30 días de vida (**Figura 1**, derecha).

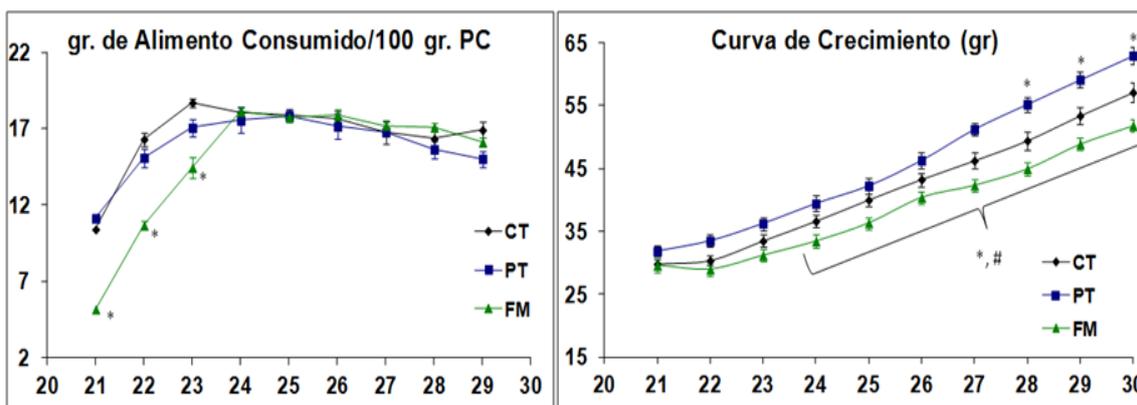


Figura 1: Consumo diario de alimento en los distintos grupos experimentales, expresados en gramos de alimento sólido por cada 100 gramos de peso corporal, durante los días 21 a 30 de vida (**izquierda**). Peso corporal de los animales experimentales entre los días 21 a 30 de vida (**derecha**). Los valores representan la media \pm EEM (n = 19-20 animales por grupo) * $p < 0,05$ vs. CT; # $p < 0,05$ vs. PT a igual edad.

Los resultados permiten observar que la curva de crecimiento de la rata hembra normal está supeditada a los niveles androgénicos, ya que el tratamiento con FM provoca un comportamiento hipofágico del animal en los días posteriores al destete, acompañados por una disminución del PC.

Debido a las alteraciones del PC durante los primeros días posteriores al destete, se evaluó la masa del TAP al día 30 de vida. Hallamos un aumento significativo del depósito de TAP en los animales PT y una disminución del mismo depósito en los animales FM (**Figura 2**), modificación que continúa siendo significativa aún luego de ser corregida por el respectivo PC (**Figura 2**, derecha).

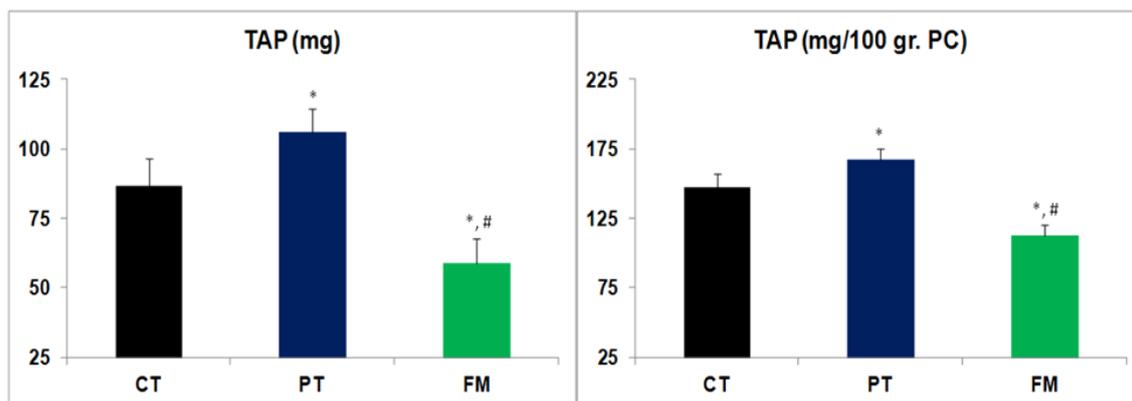


Figura 2: Masa del depósito de tejido adiposo parametrial al día 30 de vida (izquierda). Relación entre la masa de TAP y el peso corporal al día 30 de vida (derecha). Los valores representan la media \pm EEM (n = 19-20 animales por grupo). *p < 0,05 vs. CT; #p < 0,05 vs. PT.

Estos resultados indican que tanto el bloqueo de la función androgénica como el exceso de testosterona modifican la masa de TAP a edad prepuberal.

EFFECTO DE LA INTERVENCIÓN NEONATAL SOBRE EL ESTADO METABÓLICO DE LA RATA A EDAD PREPUBERAL

Debido a las modificaciones halladas en el peso corporal y las masas de TAP en los animales FM y PT, analizamos los niveles plasmáticos de diversos parámetros metabólicos de los animales al día 30 de vida (**Tabla 1**).

	B (μ g/dl)	Lep (ng/mL)	TG (g/L)	Glu (g/L)	Ins (ng/mL)
CT	9,257 \pm 1,274	1,088 \pm 0,099	0,343 \pm 0,069	1,086 \pm 0,044	0,660 \pm 0,071
PT	9,520 \pm 2,797	1,589 \pm 0,139*	0,286 \pm 0,040	1,157 \pm 0,060	0,675 \pm 0,050
FM	9,127 \pm 2,153	1,038 \pm 0,122#	0,417 \pm 0,081	1,192 \pm 0,049	0,461 \pm 0,031*, #

Tabla 1. Niveles circulantes de metabolitos en animales de 30 días de edad. Los valores representan la media \pm EEM (n = 9 animales por grupo) *p < 0,05 vs. CT, #p < 0,05 vs. PT.

Los valores circulantes de glucosa, triglicéridos y corticosterona fueron similares en todos los grupos estudiados. El grupo PT presenta un aumento significativo en los valores de leptina respecto a los grupos CT y FM (**Tabla 1**), incluso si es corregido por los respectivos PCs. (resultados no mostrados).

Los niveles de insulinemia en los animales CT y PT son similares, sin embargo los animales FM presentan una disminución significativa respecto a ambos grupos en estudio. Los valores del índice HOMA están significativamente reducidos ($p < 0,05$; $n = 9$ animales por grupo) en las ratas FM ($0,131 \pm 0,008$) comparado con los calculados en los grupos CT ($0,183 \pm 0,018$) y PT ($0,189 \pm 0,017$).

Estos resultados nos permiten sugerir que la modificación de la función androgénica neonatal induce alteraciones en la programación endocrino-metabólica, debido al exceso de andrógeno en un caso o al bloqueo de la acción del andrógeno en el otro.

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS Y TISULARES DE ESTEROIDES SEXUALES Y DE INTERMEDIARIOS DE SU BIOSÍNTESIS

En el análisis del perfil esteroideo en circulación en los diferentes grupos de ratas hembra nos focalizamos principalmente en el estudio de andrógenos, estrógenos y sus intermediarios de la cadena esteroidogénica a la edad prepuberal (previo al pico endógeno de secreción de LH).

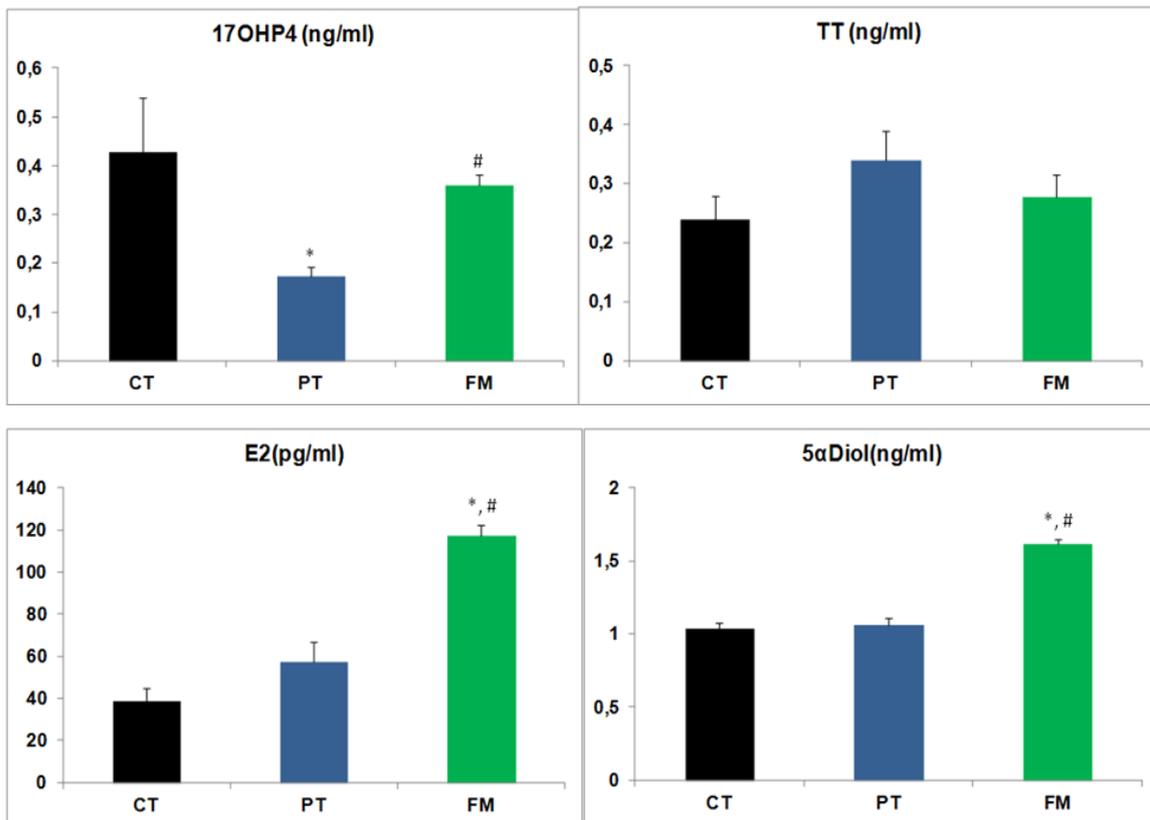


Figura 3. Perfil esteroideo periférico en animales prepuberales: niveles plasmáticos de 17-hidroxiprogesterona (arriba-izquierda), testosterona total (arriba-derecha), estradiol (abajo-izquierda) y 5- α -androstenediol (abajo-derecha). Los valores representan la media \pm EEM (n = 9 animales por grupo) * p < 0,05 vs. CT; #p < 0,05 vs. PT.

En la **Figura 3** observamos que los animales PT muestran una disminución significativa de los niveles de 17OHP4 con valores normales de 5 α Diol, TT y E₂. Mientras que el grupo FM presenta un aumento de los niveles de 5 α Diol así como de E₂, con valores normales de TT. Los animales PT poseen una alteración en la secreción de 17OHP4 ya sea ovárica o adrenal, y los animales FM muestran una mayor tasa de conversión de testosterona en sus metabolitos activos 5 α Diol y E₂. Además, cabe aclarar que no se hallaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de LH y FSH entre los grupos de estudiados (resultados no mostrados).

Con la intención de evaluar cuál es la fuente involucrada en la disminución de los niveles plasmáticos de 17OHP4 en los animales PT, se analizó el contenido de 17OHP4 en las glándulas adrenales y ováricas de los animales PT y FM.

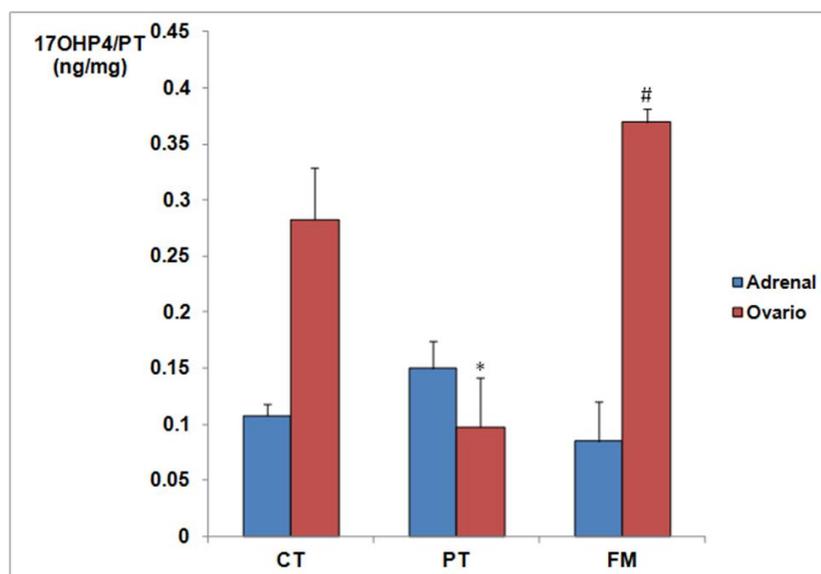


Figura 4. Contenido de 17-hidroxiprogesterona (17OHP4), corregido por los niveles de proteínas totales, en las glándulas adrenales y ováricas de animales de 30 días de edad. Los valores representan la media \pm EEM (n = 4 glándulas por grupo). * p < 0,05 vs. CT; #p < 0,05 vs. PT.

En la **Figura 4** podemos observar que los niveles de esteroides periféricos, productos 17 hidroxilados, provienen fundamentalmente de la secreción ovárica. Ello puede inferirse ya que se observan valores similares en el contenido adrenal de 17OHP4 en todos los grupos de estudio y una disminución significativa en el contenido ovárico de 17OHP4 en el grupo PT. Estos niveles disminuidos de 17OHP4 podrían estar asociados a un bloqueo enzimático en la cadena esteroidogénica, o a una alteración en la foliculogénesis, ya que la expresión de las enzimas de la vía de síntesis de esteroides depende del estadio en que se encuentran los folículos ováricos. Para dilucidar estas posibilidades, más adelante serán estudiadas las características morfológicas de los ovarios a la edad prepuberal en todos los grupos de estudio.

ESTUDIO DE EXPRESIÓN ENZIMÁTICA EN LA CADENA ESTEROIDOGÉNICA ADRENAL Y OVÁRICA

La importancia de la glándula adrenal como fuente de intermediarios esteroideogénicos en la rata es desconocida. No encontramos diferencias significativas en el contenido adrenal de 17OHP4 ni en los niveles de corticosterona circulante entre los grupos estudiados. Debido a los resultados controversiales en la bibliografía respecto al aporte de la glándula adrenal como fuente de esteroides sexuales, evaluamos la expresión de algunas de las enzimas involucradas en la vía de síntesis de esteroides en células adrenales provenientes de las zonas fasciculata/reticularis. No hallamos diferencias significativas en la expresión de P450_{scc} entre los grupos de estudio, y es importante destacar, que no encontramos expresión de la enzima P450_{c17} en las células adrenales en los tres grupos analizados. En correlación con estos resultados, en los incubados de células adrenales enriquecidas de las zonas fasciculata/reticularis no se encontraron diferencias significativas en la liberación de corticosterona tanto espontánea como estimulada con ACTH y no fue posible detectar liberación de testosterona al medio en ambas condiciones. Por lo tanto, podemos inferir que no se produciría una modificación en el silenciamiento epigenético posnatal que ocurre normalmente en la enzima P450_{c17}, en los roedores.

Respecto a la expresión enzimática en el ovario, se analizaron las enzimas P450_{scc}, P450_{c17} y aromatasa.

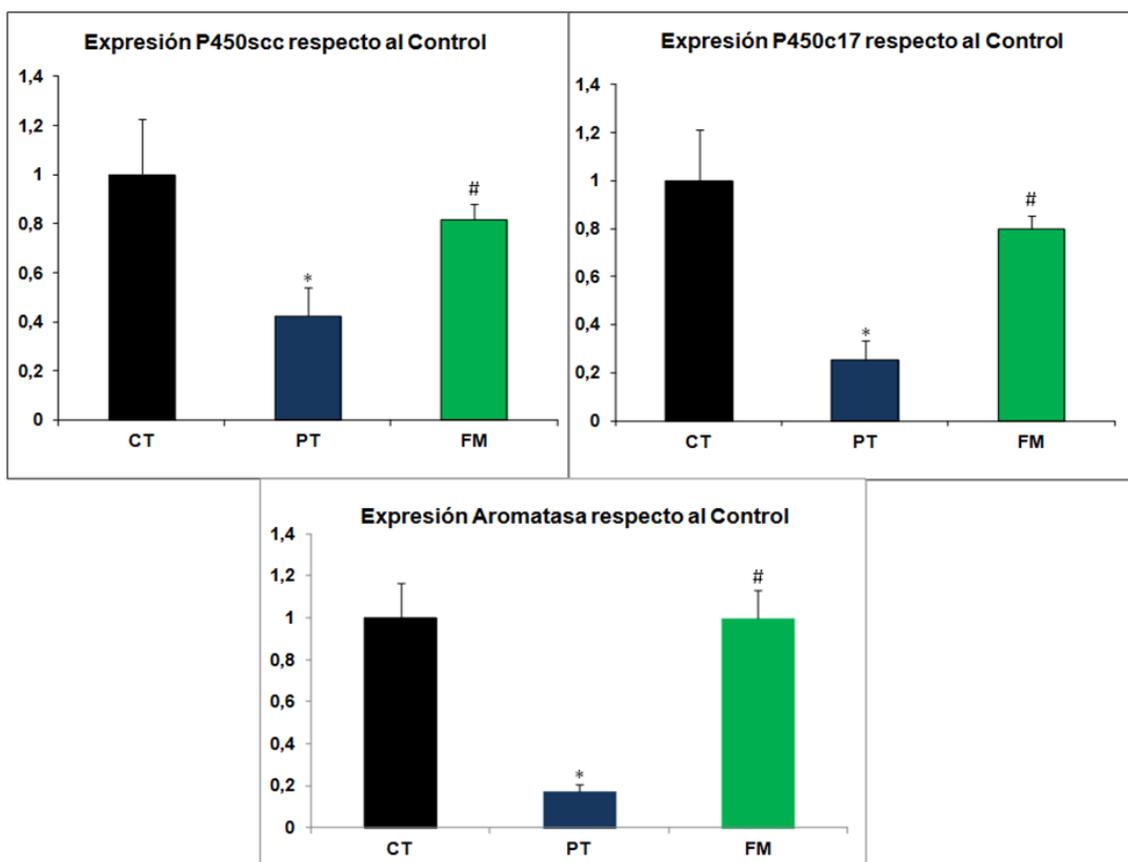


Figura 5: Cuantificación de la expresión de ARNm de las enzimas esteroidogénicas, P450scc (arriba-izquierda), P450c17 (arriba-derecha) y aromatasa (abajo), por Real Time PCR en tejido ovárico proveniente de animales de 30 días, niveles normalizados respecto a la expresión en el grupo CT. Los valores representan la media \pm EEM (n = 4 tejidos por grupo) * p < 0,05 vs. CT; #p < 0,05 vs. PT.

En la **Figura 5**, los resultados indican que los niveles de expresión enzimática en el grupo PT son significativamente menores para P450scc, P450c17 y aromatasa respecto a los grupos CT y FM. Es interesante destacar que la disminución enzimática en el ovario puede deberse a un bloqueo en la cadena esteroidogénica o a una alteración en la foliculogénesis ovárica, ya que la enzima P450scc comienza a expresarse en los folículos pre-ovulatorios, específicamente en células de la teca interna y células de la granulosa. La enzima P450c17 se expresa en las células de la teca, sitio de producción de andrógenos, y su disminución en la expresión ovárica en el grupo PT se correlaciona con el menor contenido de 17OHP4 ovárico (**Figura**

4) y la disminución de su concentración plasmática (**Figura 3**) observados en este grupo. Para poder diferenciar entre las hipótesis planteadas, profundizaremos el estudio ovárico realizando el análisis morfológico con el fin de analizar su desarrollo folicular y su respuesta funcional. A diferencia de P450scc y P450c17, la aromatasa es una enzima de expresión pleiotrópica por lo tanto inferimos que la disminución en su expresión ovárica (**Figura 5**) no generaría un impacto en los niveles plasmáticos de estradiol a edad prepuberal, encontrándose asociada a un menor desarrollo ovárico en los animales PT.

Finalmente, el grupo FM no mostró diferencias significativas en la expresión de las enzimas estudiadas respecto al grupo CT.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA FOLICULOGÉNESIS OVÁRICA

En la **Figura 6** podemos observar los resultados provenientes del estudio morfológico de la foliculogénesis en los distintos grupos de estudio, evaluando la relación de folículos primarios, secundarios y antrales respecto al número total de folículos analizados.

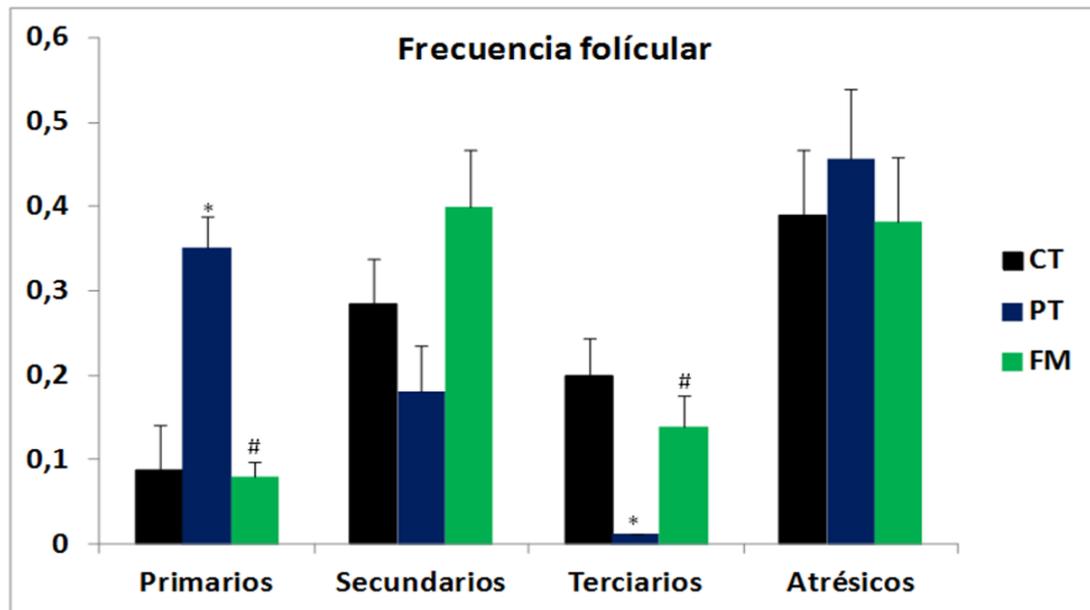


Figura 6: Análisis folicular de ovarios de animales de 30 días provenientes de todos los grupos de estudio. Los valores representan la media \pm EEM (n = 4-5 tejidos por grupo). * $p < 0,05$ vs. CT; # $p < 0,05$ vs. PT.

Los estadios de la foliculogénesis están acompañados por la maduración folicular a través de la expresión de las enzimas esteroidogénicas P450scc y P450c17 una vez que los mismos llegan a folículos antrales (folículos terciarios). Se puede observar un bloqueo en la maduración folicular ovárica de los animales PT ya que se encuentra una mayor proporción de folículos en estado primario y una disminución significativa de los folículos terciarios, de esta forma es posible atribuir la diferencia de la expresión enzimática al bloqueo de la maduración folicular y, por lo tanto, los mismos no llegan a expresar P450scc y P450c17. Por otro lado, el grupo FM muestra que la ausencia androgénica durante el desarrollo genera folículos antrales atrésicos en mayor proporción y respecto al control, lo que se relaciona con el aumento de los niveles de estradiol plasmático y la ausencia de las secreciones pulsátiles de FSH a debido a la edad prepuberal.

RESPUESTA OVÁRICA LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN XENOESTRÓGENO: FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA AISLADAS

La administración de DES a edad prepuberal genera la maduración de los folículos en estadios previos al reclutamiento dependiente de gonadotrofinas, generando el desarrollo de folículos antrales. A partir los cuales aislamos células de la granulosa y estudiamos la respuesta de las mismas frente a un estímulo con hCG, determinando la secreción de estradiol luego de las 48 horas de cultivo (**Figura 7**).

En principio es importante destacar que el grupo PT fue capaz de responder a la administración prolongada de DES ya que no hubo diferencias significativas en el número de células de la granulosa aisladas entre los grupos estudiados. Las células de la granulosa fueron cultivadas durante 48 horas en ausencia (basal) o presencia de hCG, hormona que se une específicamente a los receptores de LH. Es conocido que los receptores de LH se expresan durante todo el desarrollo folicular en las células de la granulosa, de la teca y en las luteínicas; la activación del receptor se evidencia a través de un estímulo de la esteroidogénesis aumentado la liberación de estradiol por parte de las células de la granulosa, a expensas de los andrógenos producidos por las células de la teca. Sin embargo, como las células de la granulosa se cultivan aisladas fue necesario adicionar al medio $\Delta 4A$ como fuente androgénica exógena.

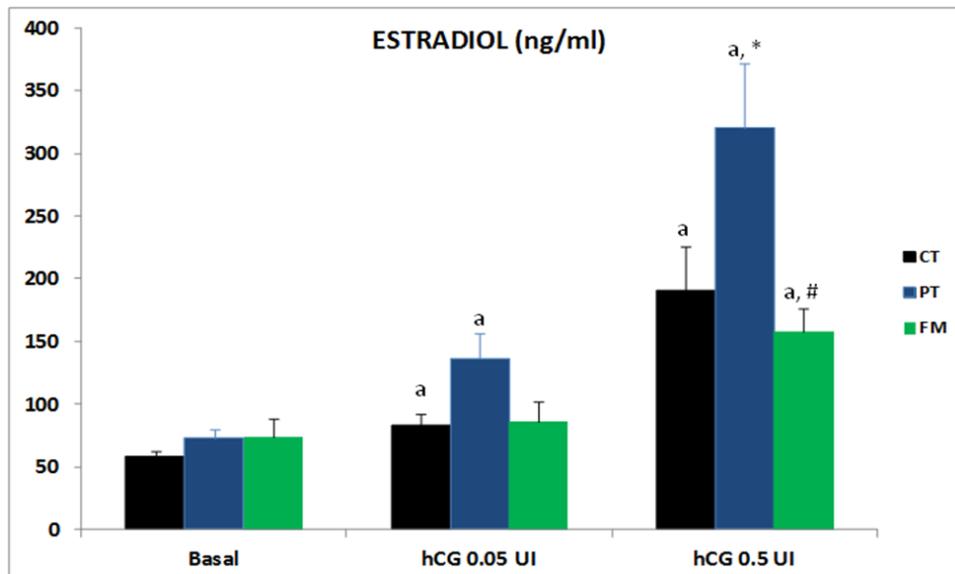


Figura 7 Liberación *in vitro* de estradiol por células de la granulosa incubadas en ausencia o presencia de hCG. Los valores representan la media \pm EEM (n = 3 incubados diferentes, con 10-15 réplicas por condición). a. p < 0,05 vs. su respectivo basal; * p < 0,05 vs. CT a igual condición; #p < 0,05 vs. PT a igual condición.

En la **Figura 7** se observa que los niveles basales de E₂ liberado por las células de la granulosa son similares en todos los grupos, sin embargo, el estímulo con hCG provocó una mayor liberación de estradiol en los animales androgenizados. Por lo tanto, a edad prepuberal el ovario proveniente de las hembras neonatalmente androgenizadas sería capaz de responder a estímulos gonadotróficos por la unión de hCG a los receptores de LH presentes en las células de la granulosa.

Capítulo 2: Edad Adulta

LAS ALTERACIONES EN LA PROGRAMACIÓN NEONATAL

ENDOCRINO-METABÓLICA PERMANECEN EN LA EDAD ADULTA

Durante este capítulo analizaremos las alteraciones en la programación endocrino-metabólica del individuo adulto (60 días de edad) luego de la intervención neonatal. Previamente, observamos que a edad prepuberal tanto los animales del grupo FM como los del grupo PT, presentaron modificaciones respecto al PC de los animales CT. A partir de estos resultados, estudiamos si las mismas se mantenían entre los días 31 y 60 de vida, analizando el consumo de alimento y la curva de peso corporal (Figura 8).

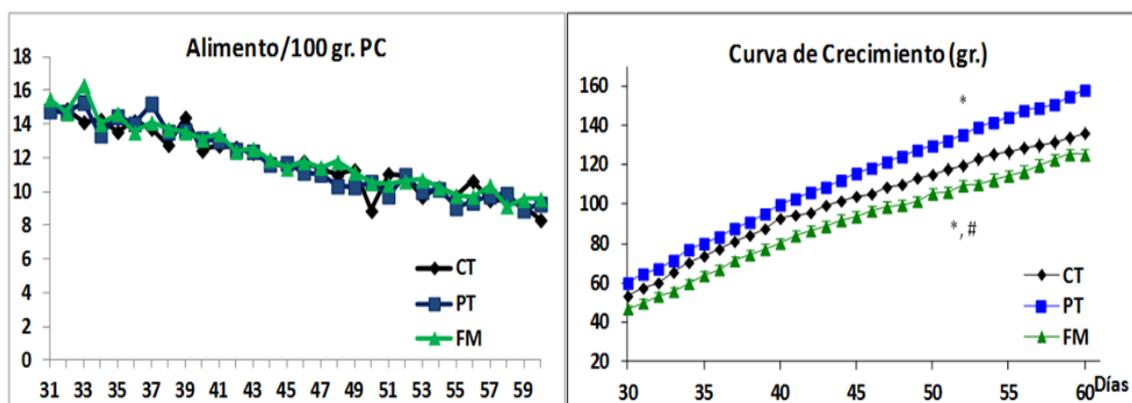


Figura 8: Consumo diario de alimento en los animales de todos los grupos de estudio (expresado por cada 100 gramos de peso corporal) en función de la edad (entre los días 31 y 60 de vida, izquierda). Peso corporal de los animales de todos los grupos entre los días 31 y 60 de vida (derecha). Los valores representan la media \pm EEM (n = 19-20 animales por grupo) * $p < 0,05$ vs. CT; # $p < 0,05$ vs. PT a igual edad.

En la **Figura 8** podemos observar que la intervención neonatal generó una modificación del PC a edad adulta. El grupo FM presentó durante todo el periodo estudiado una disminución significativa del PC respecto a los demás grupos de

estudio. En contraparte, los animales PT mostraron un aumento significativo del PC durante ese mismo periodo. Este cambio en el PC no fue acompañado por modificaciones en el consumo de alimento (**Figura 8**) y, en el caso de los animales androgenizados, se observa un aumento en la masa de TAP (incluso cuando la misma fue corregida por cada 100 gramos de PC; **Figura 9**). Por lo tanto, podemos observar una alteración en la programación metabólica luego de la intervención neonatal con exceso de testosterona o por el bloqueo de su receptor a través de modificaciones permanentes que afectan el normal desarrollo de la rata hembra.

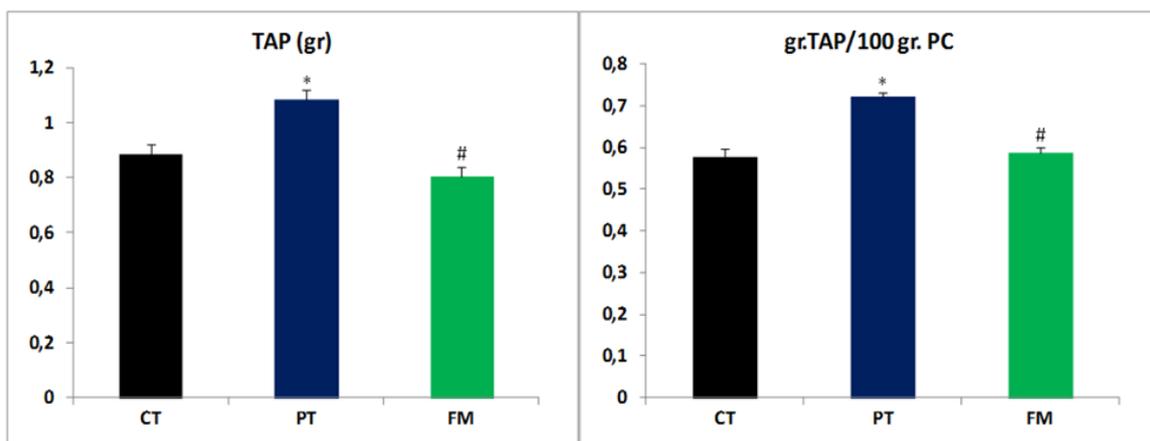


Figura 9: Masa de tejido adiposo parametrial (TAP) en gramos al día 60 de vida.(izquierda) Relación de TAP respecto a 100 gr. de peso corporal al día 60 de vida (derecha). Los valores representan la media \pm EEM (n = 19-20 animales por grupo). *p<0,05 vs. CT; #p<0,05 vs. PT.

IMPACTO DE LAS ALTERACIONES NEONATALES SOBRE EL ESTADO METABÓLICO A LA EDAD ADULTA

En el capítulo anterior se evaluó el estado endocrino-metabólico de los animales a edad prepuberal, los animales PT presentaban hiperleptinemia sin alteraciones en la glucemia basal. Por su parte, en el grupo FM prepuberal hallamos una disminución significativa de la insulinemia (**ver Tabla 1**). Luego del desarrollo puberal, a los 60 días de vida, los animales PT continúan mostrando niveles de

leptina significativamente mayores, respecto al grupo CT. Así como aumento de la insulinemia con valores normales de glucosa. La insulino-resistencia (IR) es característica del modelo de androgenización neonatal, observado a los 100 días de vida, que permite asociarla con los desórdenes metabólicos que presentan las mujeres con SOP. Por lo tanto, en el grupo PT, la hiperleptinemia prepuberal y el aumento de la masa de TAP condicionarían el desarrollo de hiperinsulinemia e hiperleptinemia encontradas a edad adulta. El grupo FM no mostró diferencias en sus parámetros metabólicos a los 60 días de vida. Cabe destacar que, a edad adulta, no se encuentran diferencias significativas en los valores de corticosterona, triglicéridos y glucosa entre los grupos estudiados (**Tabla 2**).

	B ($\mu\text{g/dl}$)	Lep (ng/ml)	TG (g/l)	Glu (g/l)	Ins (ng/ml)
CT	9,391 \pm 2,024	1,325 \pm 0,170	0,673 \pm 0,039	1,110 \pm 0,083	0,885 \pm 0,165
PT	10,501 \pm 2,783	2,209 \pm 0,111*	0,652 \pm 0,092	1,205 \pm 0,035	2,514 \pm 0,609*
FM	8,529 \pm 1,731	1,608 \pm 0,173[#]	0,674 \pm 0,104	1,161 \pm 0,087	0,836 \pm 0,187[#]

Tabla 2. Niveles circulantes de diversos metabolitos en animales de 60 días de edad. Los valores representan la media \pm EEM (n = 9 animales por grupo) *p<0,05 vs. CT; #p<0,05 vs. PT.

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN CORTICOADRENAL *IN VITRO* EN LOS ANIMALES ADULTOS

Con el fin de observar la funcionalidad adrenal a la edad adulta luego de las intervenciones neonatales, analizamos la respuesta *in vitro* de células de la fracción fasciculata/reticularis frente al estímulo con ACTH. A diferencia del comportamiento de la glándula adrenal a edad prepuberal, encontramos que en el incubado de células adrenales enriquecidas provenientes de animales de 60 días de

vida, las células de los animales PT mostraron una mayor liberación basal de corticosterona, respecto a los valores CT y FM. A su vez, todos los animales intervenidos neonatalmente presentaron una menor respuesta frente al estímulo con ACTH 1 ng/ml. (**Figura 10**).

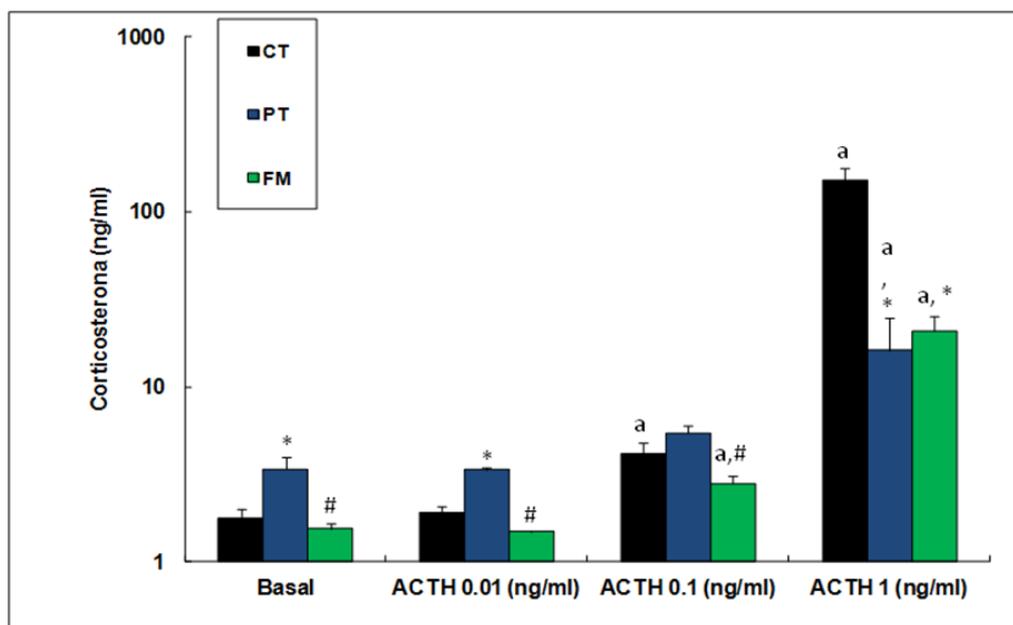


Figura 10. Liberación *in vitro* de corticosterona por células corticoadrenales enriquecidas incubadas en ausencia (basal) o presencia de ACTH. Los valores representan la media \pm EEM (n = 4 incubados diferentes, con 9-10 réplicas por condición). a p < 0,05 vs. su respectivo basal; * p < 0,05 vs. CT a igual condición; #p < 0,05 vs. PT a igual condición.

APERTURA VAGINAL Y ANÁLISIS DEL CICLO ESTRAL

La observación de la apertura vaginal (AV) nos permite detectar clínicamente el inicio de la pubertad al producirse la canalización de la vagina a causa del aumento estrogénico, posterior al pico de LH. Generalmente, la apertura vaginal se encuentra acompañada de la observación del primer diestro del ciclo estral en el análisis celular del extendido del lavado vaginal. En la **Figura 11** podemos observar que el día de AV en los animales CT ocurre alrededor del día 41 de vida ($41,4 \pm 0,7$ días) y que existe una AV precoz en el grupo PT ($13,6 \pm 1,7$ días),

probablemente debido a la aromatización de la testosterona por las células epiteliales de la vagina generando un aumento de estradiol local. **(Figura 11)**.

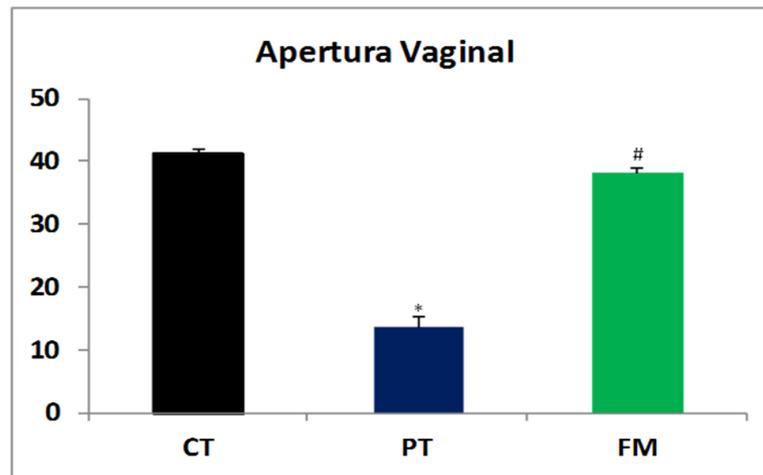


Figura 11: Día de la apertura vaginal en todos los grupos de estudio. Los valores representan la media \pm EEM (n = 10 animales por grupo). * $p < 0,05$ vs. CT; # $p < 0,05$ vs. PT.

A partir de las observaciones de las respectivas AVs en CT, PT y FM, estudiamos el ciclo estral de las ratas en los distintos grupos de estudio, a través del análisis en fresco de los frotis vaginales. Observamos que el tratamiento neonatal con PT generó una cornificación del epitelio vaginal de modo que los animales mostraron un extendido compatible con un estro, de manera constante. Por su parte, los animales FM mostraron ciclos estrales regulares (ciclos de 4-5 días) y similares a los del grupo CT **(Figura 12)**. Por lo tanto, podemos inferir que en los animales PT, la apertura vaginal no está asociada a una maduración reproductiva, como lo está en el caso de los animales FM y CT, en los que la apertura vaginal precede al primer diestro y al inicio de ciclos estrales regulares.

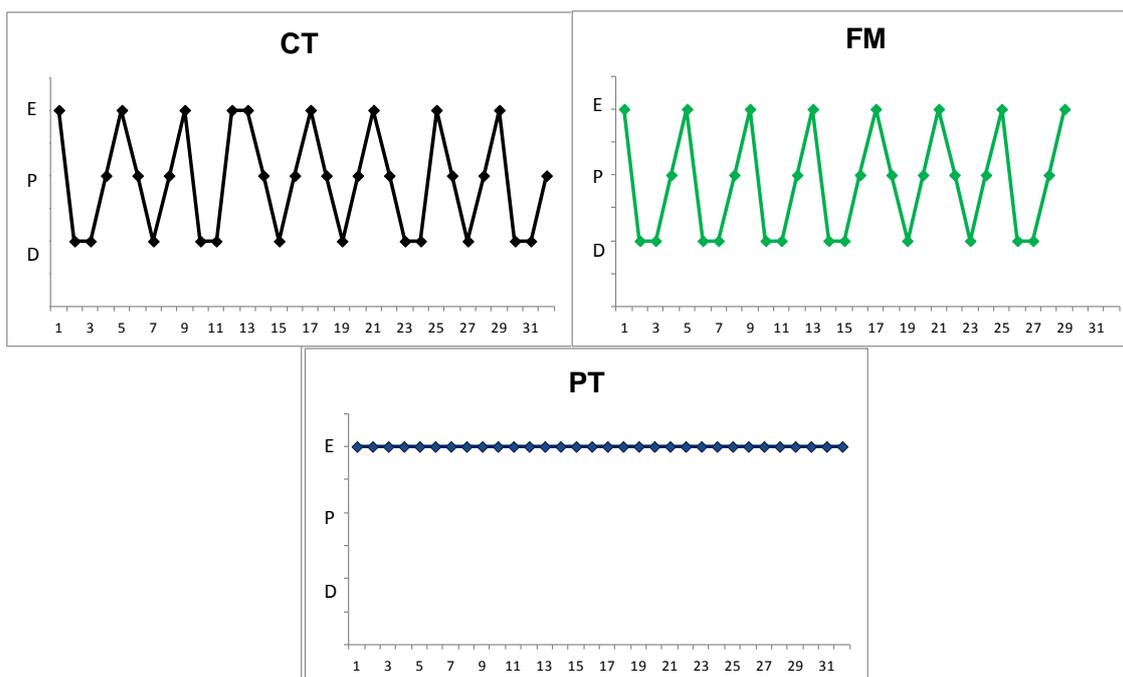


Figura 12. Determinación del ciclo estral por análisis citológico diario del lavado vaginal durante un mes a edad adulta. Esquemas representativos de los ciclos por grupo estudiado. (E: estrus; P: proestrus y D: diestrus)

NIVELES DE ESTEROIDES SEXUALES PLASMÁTICOS Y TISULARES A LA EDAD ADULTA

Se analizaron los valores plasmáticos de las distintas hormonas esteroideas a los 60 días de vida con el fin de correlacionarlos con los niveles hallados en la etapa prepuberal. Podemos observar en la **Figura 13**, que la disminución en los niveles de 17OHP4, observada a los 30 días de vida (**ver Figura 3**), permanece a edad adulta en los animales PT, sin diferencias significativas en los niveles de testosterona y estradiol circulantes. Por lo tanto, los animales del grupo PT presenta valores mínimos de productos 17-hidroxilados, sin embargo, éstos son suficientes para mantener los valores basales de los productos finales de la cadena esteroidogénica ovárica: estrógenos y andrógenos circulantes.

Los animales FM presentan niveles de delta-4-androstenediona, estradiol y testosterona similares al grupo CT (**Figura 14**).

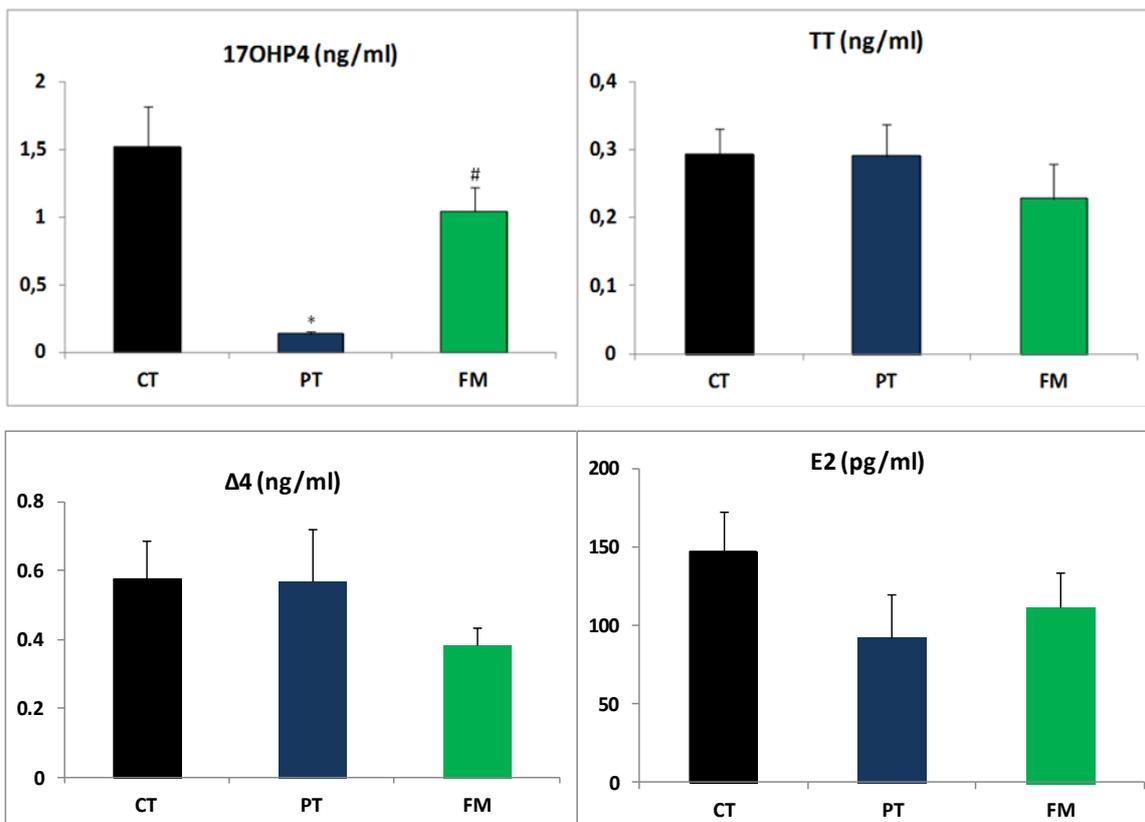


Figura 13. Perfil hormonal esteroideo de los animales a edad adulta (60 días): niveles plasmáticos de 17-hidroxiprogesterona (arriba-izquierda), testosterona total (arriba-derecha), delta-4-androstenediona (abajo-izquierda) y estradiol (abajo-derecha). Los valores representan la media \pm EEM (n = 10 animales por grupo). * p < 0,05 vs. CT; #p < 0,05 vs. PT.

Respecto a la disminución significativa en los niveles de 17OHP4 del grupo PT, se analizó el contenido de dicha hormona en las glándulas ováricas y adrenales. A edad adulta, no fue posible observar una correlación directa entre los niveles plasmáticos (disminuidos) de 17OHP4 y el contenido de las fuentes esteroideas.

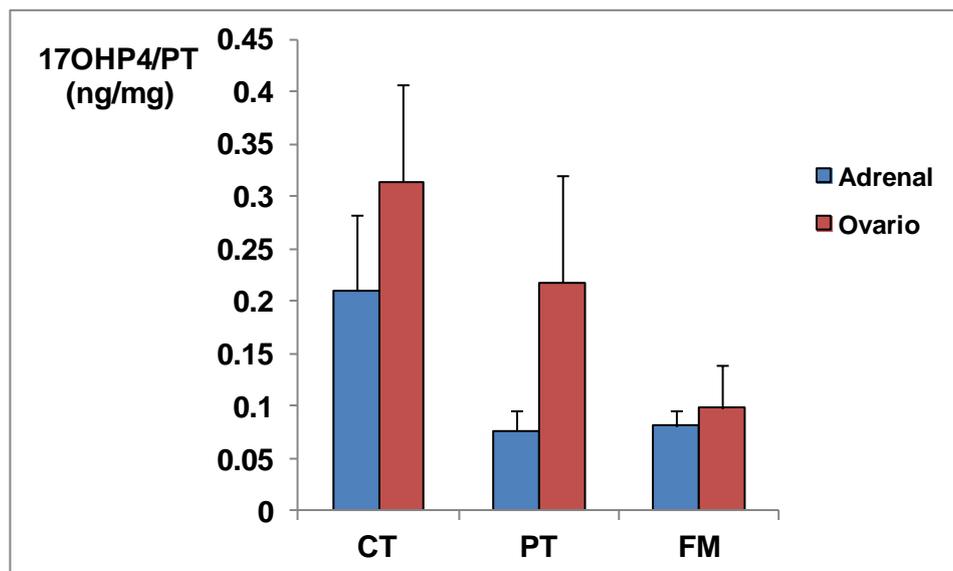


Figura 14: Contenido de 17-hidroxiprogesterona (17OHP4) corregido por los niveles de proteínas totales en las glándulas adrenales y ováricas de animales de 60 días de edad. Los valores representan la media \pm EEM (n = 3 glándulas por grupo).

EFEECTO DEL TRATAMIENTO NEONATAL SOBRE LA EXPRESIÓN OVÁRICA DE ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICAS

Las alteraciones enzimáticas se encuentran supeditadas a la cantidad de folículos en los distintos estadios del desarrollo, ya que la expresión de P450scc y de P450c17 ocurre a partir de que los folículos comienzan su estadio antral. A los 60 días de vida, encontramos que en el grupo PT continúa (comparado con resultados de la edad prepuberal) presentando una disminución en la expresión ovárica de la enzima P450scc, mientras que en el caso de la expresión de P450c17, los ovarios no muestran diferencias significativas entre los valores de los grupos estudiados (**Figura 15**). La expresión de la enzima aromatasa se encontró aumentada en ambos grupos respecto al CT (**Figura 15**), sin embargo, los valores de estradiol plasmático fueron similares (**Figura 13**). Se conoce en el modelo de androgenización neonatal que las ratas hembra son capaces de mantener valores basales de estradiol pero no generan los picos cíclicos hormonales característicos,

por lo que el aumento de aromatasa podría deberse a un mecanismo que permita lograr el mantenimiento de los niveles basales de estradiol similares al grupo CT. En el caso de los animales FM estaría asociado al aumento de los folículos antrales.

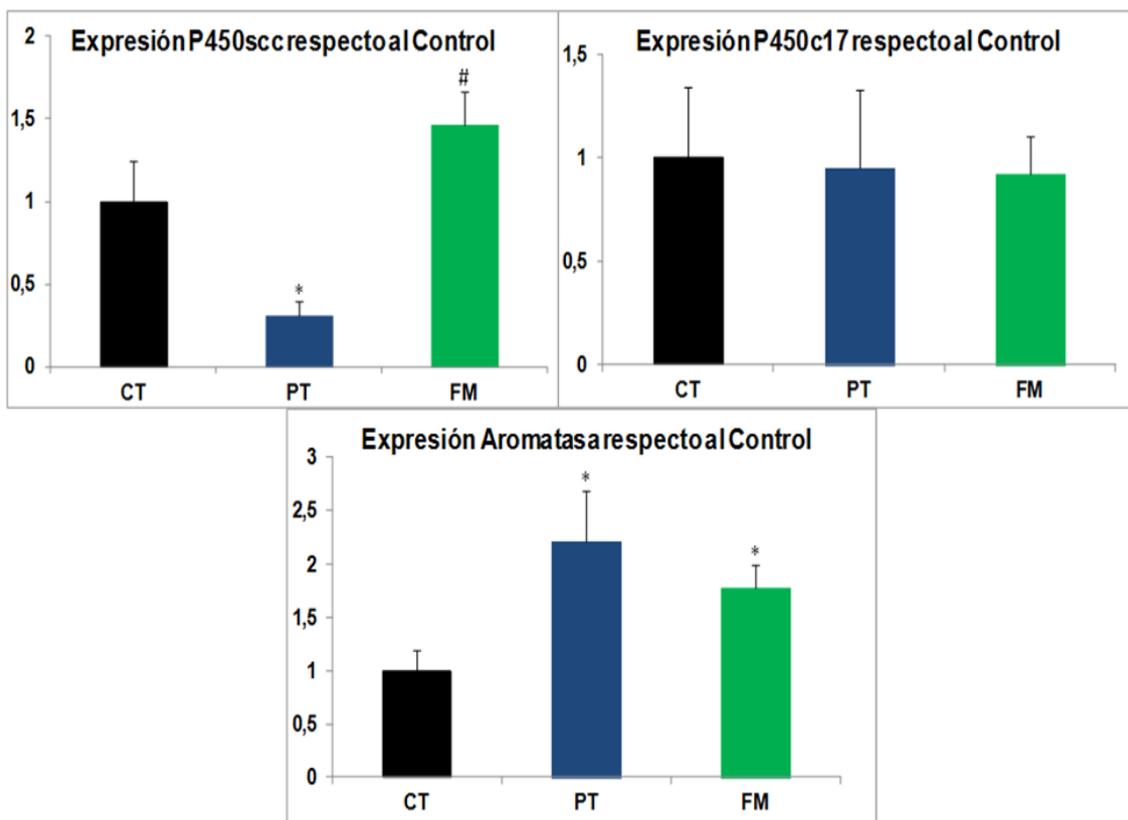


Figura 15: Cuantificación de la expresión de ARNm de las enzimas esteroidogénicas, P450scc (arriba-izquierda), P450c17 (arriba-derecha) y aromatasa (abajo), por Real Time PCR en tejido ovárico de animales adultos, niveles normalizados respecto a la expresión en el grupo CT. Los valores representan la media \pm EEM ($n = 3$ tejidos por grupo). * $p < 0,05$ vs. CT; # $p < 0,05$ vs. PT.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA FOLICULOGÉNESIS OVÁRICA

Según nuestros resultados previos podríamos inferir que las ratas hembras PT serían sub/infértiles y tendrían un desarrollo folicular alterado a edad adulta. Con el fin de profundizar el estudio de la reproductividad de la rata hembra androgenizada analizaremos la foliculogénesis de los distintos grupos de estudio a los 60 días de vida

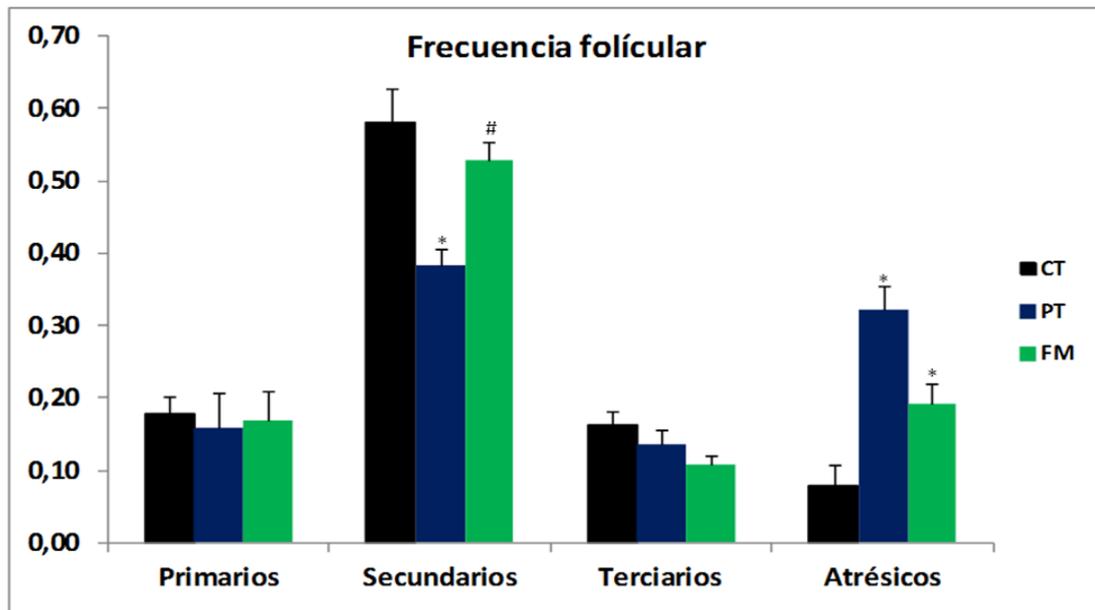


Figura 16. Análisis folicular de ovarios de animales de 60 días y de todos los grupos de estudio. Los valores representan la media \pm EEM (n = 4 tejidos por grupo). * p < 0,05 vs. CT; #p<0,05 vs. PT.

Los resultados indican una menor proporción de folículos secundarios en el grupo PT respecto al CT y FM. Ambos tratamientos neonatales generan folículos en todos los estadios de desarrollo, sin embargo se observa un aumento de atresia folicular en los grupos PT y FM respecto al CT. Como era de esperar, a edad adulta, se evidencia en el grupo PT quistes ováricos y la ausencia de cuerpos lúteos (no mostrado), en correlación con el ciclo en estro constante y la menor expresión enzimática de P450sc. Si bien el grupo FM presenta una mayor proporción de folículos atrésicos los parámetros enzimáticos, la presencia de cuerpos lúteos y los ciclos estrales similares al grupo CT nos permitirían inferir que el bloqueo transitorio de la acción androgénica no modificaría su función reproductiva a los 60 días de vida.

RESPUESTA *IN VIVO* A LA HCG

Se ha observado previamente que células de la granulosa aisladas de animales prepuberales y tratados con DES de todos los grupos son capaces de responder a un estímulo *in vitro* (hCG por 48 hrs) liberando estradiol (**Figura 7**). A edad adulta analizamos la respuesta aguda a la hCG *in vivo*. Para ello, se evaluó el ciclo estral de las ratas a partir del día 50 de vida. Se utilizaron ratas CT y FM con el fin de estudiarlas luego que presenten de 3 a 4 ciclos estrales regulares continuos, mientras que las PT se estudiaron en su estro constante. Alrededor del día 70 de vida, durante las últimas horas del diestro de los animales CT y FM, y durante el estro de los animales PT, se anestesió a los animales experimentales, inhibiendo el pico de LH, se les colocó una cánula en la vena yugular derecha y se les administró hCG (5 mUI/kg de peso). Se analizó la liberación de E₂ durante 2 horas post-estímulo, realizando pequeñas sangrías antes y cada 1 hora post-tratamiento. Los resultados muestran que los animales androgenizados son capaces de producir E₂ frente al estímulo con hCG, por lo cual se sugiere que los ovarios de estos animales responden a hCG/LH (**Figura 17**). Este resultado nos permite inferir que el bloqueo de la esteroidogénesis en el ovario se produciría por una menor estimulación del mismo por las hormonas del eje hipotálamo-hipofisario, probablemente a través de una alteración en la pulsatilidad y/o en la acción directa de las gonadotrofinas.

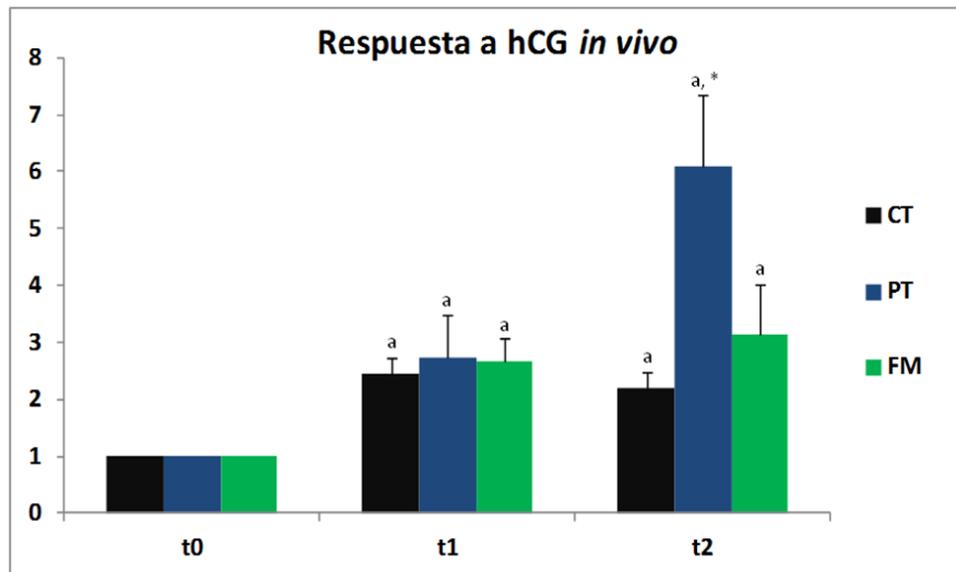


Figura 17: Liberación plasmática de estradiol luego del estímulo *in vivo* con hCG (5mUI/kg de PC), con sangrías cada una hora. Los valores representan la media de las veces de estímulo (respecto a sus respectivos valores basales) \pm EEM (n = 6 animales por grupo). a p < 0,05 vs.su respectivo basal; * p < 0,05 vs. CT a igual condición.

DISCUSIÓN

EFEECTO DE LA ACTIVIDAD ANDROGÉNICA NEONATAL SOBRE EL CRECIMIENTO Y EL METABOLISMO DE LA RATA HEMBRA

Durante períodos tempranos de vida el organismo tiene la habilidad de responder a la modificación de los niveles hormonales generando adaptaciones a nivel celular y molecular. Estos cambios pueden establecerse de forma permanente y resultan en modificaciones sobre diversas funciones del individuo, las que se perpetúan aún en ausencia del estímulo inicial¹²⁵. El cambio en la programación neuroendocrino-metabólica en el modelo de androgenización neonatal a edad adulta ha sido estudiado previamente en nuestro laboratorio. Estos estudios demostraron que, a los 100 días de vida, los animales androgenizados presentaban un incremento en el peso corporal (PC) y la masa de tejido adiposo parametrial (TAP), así como una severa disfunción metabólica⁶². Las alteraciones halladas en esos animales se asemejan parcialmente a las del fenotipo metabólico de SOP humano, y están asociadas con un estado caracterizado por la insulino-resistencia, la hiperleptinemia e hipoadiponectinemia^{57,62}. La reprogramación metabólica, inducida por el exceso androgénico, incrementó la masa de TAP y TAB visceral a expensas de la hipertrofia de las células constituyentes¹²⁶. Adicionalmente, la función adipocitaria *in vitro* (células aisladas del TAP) se caracterizó por una elevada secreción de leptina en respuesta a insulina^{57,62}.

Estas características que se observan en los animales neonatalmente androgenizados y estudiados a los 100 días de vida, nos llevó a analizar algunos aspectos de su metabolismo durante el desarrollo de la rata hembra, estudiándolas a la edad prepuberal (día 30 de vida) y adulta temprana (día 60 de vida). Dentro de las modificaciones halladas desde las edades tempranas de vida, las ratas

androgenizadas presentan mayor PC, lo cual corrobora la acción anabólica ejercida por el exceso transitorio del andrógeno¹²⁷.

El aumento del PC fue acompañado por un aumento de la masa de TAP y una correlacionada hiperleptinemia. Estos resultados concuerdan con la hiperadiposidad (masa mesentérica y visceral) y el desarrollo de insulino-resistencia que caracteriza al grupo PT a los 100 días de vida^{126,57}. Respecto al metabolismo de lípidos el modelo utilizado en esta tesis no presenta una dislipemia basal, a diferencia de otros estudios donde los animales son androgenizados durante la gestación¹²⁶, aunque debe destacarse que a los 100 días de vida los individuos del grupo PT se caracterizan por poseer un alto riesgo aterogénico (disminución de la adiponectinemia y niveles circulantes elevados de PAI-1 y NEFA) y una alta susceptibilidad a desarrollar hipertrigliceridemia cuando son sometidos a una carga “alostática” (ingesta de un exceso de fructosa a través de la dieta)⁶².

El estudio a la edad prepuberal indica que la androgenización neonatal afecta precozmente el funcionamiento del tejido adiposo, modificación que se mantiene a la edad adulta temprana. Los animales de 60 días de vida presentan altos niveles circulantes de leptina respecto a los hallados en el CT y, a partir de esta etapa, se incrementan progresivamente los respectivos de insulina. Diversos mecanismos podrían estar involucrados en el aumento de insulinemia, entre ellos, la hiperleptinemia instalada luego de la hipertrofia adipocitaria modificaría la retroalimentación en la función del eje adipo-insular¹²⁸, resultando en el agravamiento de la hiperleptinemia y de la hiperinsulinemia⁵⁷.

Por lo mencionado queda en evidencia que la disfunción endocrina durante el desarrollo individual es un factor crítico en la programación metabólica de la rata hembra. Actualmente, no se registran estudios sobre el impacto del bloqueo transitorio del receptor de andrógeno durante la edad neonatal en la rata hembra. Nuestros resultados indican que la administración de flutamida al día 5 de vida, genera hipofagia a partir del destete, repercutiendo negativamente en la ganancia ponderal (a partir del día 24 de vida) que se mantiene durante la adultez; este cambio se vio acompañado por una disminución de la masa de TAP. Resultados similares han sido obtenidos por otros investigadores luego de estudiar el efecto de la administración aguda de FM en la rata hembra adulta¹²⁹. Sin embargo, Kim y col. hallaron que la administración crónica de flutamida (animales recibiendo flutamida diariamente por 20 días a partir del destete) no modifica significativamente el peso corporal¹³⁰.

Los resultados de ese trabajo indican que la funcionalidad del RA a la edad neonatal resulta ser clave para la homeostasis del individuo durante su desarrollo. Respecto a su estado endocrino-metabólico, se observó que el grupo de individuos tratados con FM, presenta un aumento en la insulino-sensibilidad periférica (menores niveles de insulina y valores de HOMA respecto al control) a la edad prepuberal, incluso si los mismos son corregidos teniendo en cuenta el peso corporal. El aumento transitorio de los niveles circulantes de estradiol en el estadio prepuberal podría cooperar con el incremento de la insulino-sensibilidad en los animales flutamida¹¹⁵.

La testosterona es un andrógeno aromatizable, capaz de activar los RA y los RE¹³¹, sin embargo, la mejora de la insulino-sensibilidad observada luego del bloqueo

neonatal¹³² y transitorio del RA (FM) sustenta que la sobre-estimulación temprana del RA sería parte del mecanismo desencadenante de la resistencia a la insulina observado en los animales PT adultos. Este hallazgo coincide con diversos resultados de estudios epidemiológicos que muestran que la administración de flutamida, sola o en combinación con insulino-sensibilizadores en mujeres con SOP o hirsutismo idiopático, mejora alteraciones metabólicas tales como obesidad insulino-resistencia y afecciones cardíacas^{133,134,135}.

Nuestros resultados permiten inferir que el aumento de los niveles de estrógenos en los animales tratados neonatalmente con FM, luego de la pubertad, restituirían la homeostasis del individuo debido a que las alteraciones sobre la función endocrino-metabólica fueron halladas fundamentalmente en edad prepuberal.

ALTERACIONES EN LOS NIVELES DE GLUCOCORTICOIDES POR EXCESO O BLOQUEO ANDROGÉNICO

La programación del individuo no está sólo supeditada a la función metabólica. Se ha demostrado que la malnutrición y los tratamientos hormonales tempranos modulan el desarrollo del eje HHA y condicionan su función a la edad adulta. El estrés materno, la exposición a glucocorticoides sintéticos y la restricción calórica durante edades tempranas de vida reprograman la funcionalidad del eje HHA¹³⁶. La administración de dexametasona durante la etapa final de gestación impacta sobre las crías, generando una desensibilización del hipotálamo al feedback negativo ejercido por los glucocorticoides sobre la síntesis y liberación de CRH¹³⁷. La programación del eje HHA estaría a su vez influenciada por los niveles de los esteroides sexuales a edad neonatal, los presentes resultados muestran que en el

grupo PT los valores plasmáticos de corticosterona son similares a los del CT. Sin embargo, las células obtenidas por enriquecimiento de la fracción fasciculata/reticularis adrenal de animales de 60 días de edad presentaron (comparando con las de individuos normales) una mayor secreción *in vitro* espontánea del glucocorticoide y una resistencia parcial al estímulo por ACTH. Por su parte, el bloqueo transitorio del RA (FM) impacta también sobre la función del eje HHA induciendo una disminución en la liberación de corticosterona post-ACTH por las células adrenales enriquecidas. En el estudio de la programación de la glándula adrenal, Seale y col. han descrito una alteración en la programación de la función del eje HHA debido a la androgenización neonatal. En ese estudio la androgenización se indujo el primer día de vida y se observó al momento del sacrificio (8-9 am) a la edad adulta que los niveles de corticosterona eran similares a los del grupo normal, aunque en el análisis de secreción diario (durante 24 horas) los niveles de glucocorticoides presentaron una disminución en la frecuencia y la amplitud de los picos de corticosterona⁶³. Cuando los animales androgenizados son sometidos a un estímulo estresante, por ruido constante o por un desafío inmunológico, presentan una menor respuesta en la síntesis de ACTH y la liberación de corticosterona⁶³. Cabe destacar que este estudio *in vivo* de la función adrenal se correlaciona con la menor liberación de corticosterona *in vitro* por las células adrenales enriquecidas que hallamos en el grupo PT frente a ACTH en concentraciones de estrés. Las modificaciones observadas en el eje HHA de los animales androgenizados, tales como el aumento de la expresión de los receptores de glucocorticoides en el NPV y la disminución de la expresión de POMC a nivel hipofisario, dependen de los niveles circulantes de estrógenos ya que si se

normalizan los niveles de estradiol por ser suplementados por una cápsula de liberación progresiva, se normaliza la función del eje HHA⁶³.

La glándula adrenal de un individuo es capaz de responder de forma diferencial a un estímulo según el estado hormonal y la edad del mismo. Como hemos descrito previamente, las fluctuaciones transitorias en los niveles de esteroides sexuales durante periodos críticos del desarrollo impactan sobre la respuesta adrenal. De esta manera, las ratas hembra en la edad prepuberal presentan una liberación de glucocorticoides prolongada frente a un estímulo estresante respecto a la respuesta de una rata adulta frente al mismo estímulo, demostrando que la reactividad de la glándula adrenal cambia significativamente luego de la pubertad¹³⁸. El bloqueo de la acción de la testosterona (FM) también modifica la organización del eje HHA en el sexo masculino, dado que ratas macho castradas en el día de nacimiento muestran un mayor reclutamiento de neuronas del NPV y una respuesta exacerbada del eje HHA al estrés¹³⁹. Las reprogramaciones a nivel del SNC son posibles de revertir en la rata macho sólo si se le restituyen los niveles androgénicos durante la edad neonatal ya que, una vez que el animal alcanza la edad adulta, no es posible modificar la organización del eje aunque se restablezcan los niveles de andrógenos similares al CT por la administración de testosterona exógena¹³⁹.

A diferencia de nuestros resultados en ratas hembra tratadas neonatalmente con flutamida, Bingham y col. demostraron en ratas macho que la administración prepuberal (entre las 12 horas y los 21 días de vida) de flutamida o la de un inhibidor de la aromatasa, modifica la función del eje HHA. Ante a un estímulo agudo los animales tratados muestran una liberación normal de ACTH y

glucocortoides. Sin embargo cuando los mismos fueron sometidos a reiteradas situaciones de estrés, se encontraron niveles aumentados de ACTH demostrando que el tratamiento perinatal con flutamida retrasa el retorno a niveles normales de ACTH, impactando de igual forma sobre los niveles de glucocorticoides¹⁴⁰.

Los mecanismos involucrados en la reorganización del funcionamiento del eje HHA se darían a través de una alteración en los circuitos neuronales involucrados en el sistema somatosensorial, ya que la disminución de los niveles de estrógenos o el aumento de testosterona producen una masculinización del hipotálamo que se traduce en la activación del mencionado eje a nivel del sistema límbico¹⁴¹. Estos resultados nos permiten demostrar que el nivel circulante de las hormonas sexuales a edad neonatal impacta sobre el desarrollo del eje HHA y, por lo tanto, sobre la respuesta del organismo frente al estrés a la edad adulta, modificando la predisposición al desarrollo de patologías relacionadas al estrés del individuo.

MODIFICACIONES EN LA PROGRAMACIÓN DE LA VÍA DE SÍNTESIS DE ESTEROIDES POR EXCESO O BLOQUEO ANDROGÉNICO.

ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD OVÁRICA

El eje reproductivo es susceptible a reprogramaciones durante su desarrollo fetal y neonatal^{142,143}. Se ha demostrado previamente que las disfunciones reproductivas halladas en el modelo de androgenización neonatal en las ratas estudiadas a la edad adulta (100 días de vida) son similares a las halladas en el fenotipo humano de SOP, entre ellas las irregularidades en el ciclo menstrual, oligo/anovulación y alteraciones metabólicas^{43,50,57,62}. Uno de los objetivos del presente trabajo estuvo orientado a identificar las alteraciones en la funcionalidad ovárica en ratas

neonatalmente androgenizadas y estudiadas a la edad prepuberal. El estudio nos permitió caracterizar modificaciones tempranas en la función reproductiva de los animales PT, tales como: 1) una menor producción de 17OHP4 con niveles circulantes normales de estradiol, testosterona y 5 α Diol; y 2) una menor expresión génica para P450scc, P450c17 y aromatasa en el ovario.

La disminución en la expresión enzimática con niveles plasmáticos de esteroides sexuales normales sugiere que en el grupo androgenizado neonatalmente no ocurriría un bloqueo completo de la vía esteroidogénica, sino que se produciría una disfunción en la foliculogénesis ovárica. Por lo tanto, los resultados nos permiten hipotetizar que el exceso androgénico neonatal se traduce en un retraso en el desarrollo folicular, ya que las enzimas estudiadas acompañan el avance en la foliculogénesis: la P450scc se expresa en células de la teca interna y de la granulosa de folículos pre-ovulatorios, pero no en aquellos en estadio preantral¹⁴⁴. La enzima P450c17, está involucrada en el proceso de 17-hidroxilación y relacionada a estadios avanzados de la foliculogénesis, debido a que su expresión está estrictamente localizada en las células de la teca, principal sitio de producción de andrógenos⁷⁴. A diferencia de esas enzimas, la aromatasa es de expresión pleiotrópica y se expresa, por ejemplo, en tejido adiposo, folículos pre-ovulatorios y los cuerpos lúteos¹⁴⁵. Por lo tanto la disminución ovárica de aromatasa no debería estar necesariamente vinculada con una disminución de los niveles plasmáticos de estrógenos, así como ocurre en el grupo PT.

En correlación con esta hipótesis, la observación de la morfología ovárica de los animales neonatalmente androgenizados y estudiados a la edad prepuberal, indica un aumento del número de folículos primarios a expensas de la cantidad de

foliculos terciarios. Ello demuestra que el impacto de la androgenización neonatal sobre la función reproductiva ocurre a partir de una limitada maduración de las células ováricas. El desarrollo folicular en la rata acontece durante los primeros días post-natales⁹², donde un aumento transitorio de los andrógenos causa modificaciones que permanecen a la edad prepuberal. Tyndall y col. hallaron que diversos tratamientos administrando testosterona (en forma aguda o crónica) durante la edad post-natal generan cambios en la composición folicular, observando una mayor proporción de foliculos en estadio primordial, a diferencia de lo que sucede si el andrógeno es suministrado durante edad fetal¹⁴⁶.

Los esteroides sexuales actúan directamente en la regulación del crecimiento folicular, sin embargo, los mecanismos involucrados son aún inciertos. Ha sido publicado un estudio realizado en ratones, el cual muestra que los estrógenos administrados a edad neonatal, actúan a través de sus receptores, inhibiendo la apoptosis de los foliculos primarios y reduciendo el reclutamiento folicular dependiente de gonadotrofinas¹⁴⁷. El receptor de andrógeno (RA) se encuentra expresado principalmente en las células de la granulosa presentes en los foliculos durante estadios tempranos, y su expresión disminuye conforme avanza la maduración folicular¹⁴⁸.

La apoptosis folicular está regulada por los andrógenos, directamente a través de RA y por su conversión a estrógenos. Se ha demostrado que el tratamiento neonatal con el antagonista del RA, flutamida, genera un impacto en la foliculogénesis del animal a edad adulta, ya que disminuye los marcadores de apoptosis (disminución en la expresión de la proteína caspasa 3)⁶⁷. Adicionalmente, el tratamiento potencia la proliferación de las células de la granulosa y tecaes de los foliculos antrales⁶⁷. La

flutamida no sólo sería capaz de inhibir la apoptosis, sino que estimularía la proliferación folicular debido a que promueve la aromatización de la testosterona, evidenciado por un aumento en los niveles de estradiol circulante en los animales tratados con el antiandrógeno⁶⁷. La formación de quistes foliculares es compleja y está asociada a un estancamiento de la maduración folicular y fallas en la apoptosis¹⁴⁹. La acción del antiandrógeno evitaría que se generen quistes a partir de los folículos que presentan una baja proliferación y no expresan factores apoptóticos.

Nuestros resultados demuestran que la administración neonatal de flutamida en la rata hembra induce una proliferación folicular asociada a un aumento de estradiol y 5 α Diol en edad prepuberal. Los estudios de la morfología ovárica indican una frecuencia folicular similar a la normal, sin embargo, debido a que en este período no se generan los picos gonadotróficos necesarios para rescatar los folículos de la atresia, el tratamiento neonatal con flutamida produce una mayor cantidad de folículos antrales que continúan hacia la atresia folicular¹⁵⁰. Estudios *in vitro*, demostraron que los esteroides sexuales intervienen activamente en la maduración folicular de forma sinérgica con la FSH¹⁵¹. La testosterona a través de su RA estimularía la sensibilidad a FSH de los folículos primarios vía AMPc, beneficiando su maduración, sin embargo cuando los mismos son pre-ovulatorios, la LH prevalece en su acción disminuyendo la expresión de RA y como resultado la acción androgénica¹⁵². Estos resultados permiten deducir que existe un efecto dual de la testosterona: en etapas iniciales de la foliculogénesis actúa estimulando la maduración folicular hasta estadios pre-antrales y, finalmente, en etapas avanzadas favorece la formación de estructuras de características quísticas¹⁵³.

Las intervenciones que estimulan la actividad androgénica a edades tempranas de vida, alterarían la morfología ovárica permitiendo el reclutamiento folicular pero arretando la maduración en las primeras etapas del estadio folicular. Yang y col. investigaron los mecanismos por los cuales la testosterona impacta en el ovario neonatal de ratón, demostrando que los ovarios incubados con testosterona presentan un aumento de los folículos primarios y una disminución de los secundarios. La testosterona beneficia el reclutamiento folicular permitiendo la activación de primordiales a primarios, a través de RA vía PI3K/Akt para finalmente inducir la translocación de Foxo3¹⁵⁴. Además demostraron que la testosterona *in vitro*, es capaz de inhibir el factor de transcripción GDF9 involucrado en el desarrollo folicular tardío¹⁵⁴. Estos efectos androgénicos pudieron ser revertidos por la co-incubación con flutamida, por lo tanto el RA estaría directamente involucrado en el arresto folicular, aunque todavía es incierta la vía molecular activada¹⁵⁴.

Al analizar los mecanismos a través de los cuales la testosterona impacta sobre la función reproductiva se debe tener en cuenta la expresión de aromatasa, enzima que permite que el exceso androgénico pueda actuar tanto por los RA como por los RE¹⁵⁵. Estudios que utilizan la administración de testosterona durante el primer día postnatal encuentran una disminución del número de folículos totales en los ovarios y no presentan apertura vaginal, poniendo en evidencia un efecto claramente androgénico¹⁵⁶. Nuestros resultados muestran que el exceso de andrógenos al día 5 de vida acelera el tiempo de apertura vaginal. Otros autores, hallaron que tratamientos similares de suministro de andrógenos durante edades críticas del desarrollo producen modificaciones en el tiempo de apertura vaginal acompañados de ciclos estrales disfuncionales^{157,158,159}. El aumento local de

estrógenos permite la canalización de la vagina independientemente de los niveles de gonadotrofinas y el comienzo de la pubertad⁹⁸. Esto nos permite inferir que la apertura vaginal en el grupo PT no se daría por un efecto androgénico, sino debido a la aromatización local de los andrógenos a estrógenos por las células epiteliales de la vagina. Se ha demostrado que el bloqueo de la aromatasa retrasa la apertura vaginal, corroborando el rol primordial de los estrógenos en dicho proceso madurativo¹⁶⁰. Las ratas FM muestran una tendencia a una apertura vaginal precoz, debido al aumento de los niveles de estrógenos y de los folículos en estadio antral a la edad prepuberal. Sin embargo, esta diferencia no es significativa respecto a lo normal. Se ha demostrado que flutamida administrada por 20 días en altas dosis (25 mg/kg) genera una apertura vaginal precoz, observando que el antiandrógeno ejercería algún efecto estrogénico, similar al que se encontró en ratas tratadas con DES, aunque es desconocido el mecanismo molecular involucrado¹³⁰. Las modificaciones en la programación a nivel reproductivo debido al uso de antiandrógenos no fueron descritas sólo en hembras, ratas macho inyectadas con flutamida entre los días 1 a 6 de vida presentaron, en la edad adulta, anormalidades en la estructura interna de sus órganos sexuales, aunque mantuvieron las concentraciones intratesticulares de testosterona similares a los niveles hallados en el grupo CT. En correlación con nuestros resultados, el bloqueo transitorio de la acción androgénica generaría modificaciones independientes de la producción esteroidea a la edad adulta¹⁶¹.

Respecto a los niveles plasmáticos de esteroides en los individuos de 60 días de vida, los animales del grupo flutamida presentaron un perfil hormonal similar al grupo control. En los animales androgenizados no se observaron valores anormales de estrógenos y andrógenos circulantes aunque presentaron niveles disminuidos de

17OHP4 y alteraciones en el ciclo estral (observándose el estro de manera constante).

Dadas las alteraciones metabólicas encontradas en el grupo PT (aumento de PC, hiperleptinemia e hiperinsulinemia) y la ausencia de ciclos estrales regulares, se podría sugerir que estos individuos podrían ser sub-fértiles/infértiles. De hecho, y a diferencia de lo observado a la edad prepuberal, en el análisis morfológico de la foliculogénesis en el grupo PT adulto se encontraron folículos correspondientes a todos los estadios de desarrollo, y sin diferencias en el número de folículos terciarios, lo que permitiría niveles basales de estrógenos y testosterona normales. Sin embargo, se observó una menor proporción de folículos en estadio secundario respecto al grupo normal, con una mayor cantidad de folículos atrésicos y presencia de quistes ováricos. Estas observaciones nos permiten indicar que la androgenización neonatal genera una falla ovárica pre- y post-puberal probablemente relacionada con una anormal estimulación del ovario por LH⁵¹. De acuerdo con esta hipótesis, estudios previos muestran que ratas androgenizadas neonatalmente presentan una alteración en la liberación de LH cuando son estimuladas por la administración secuencial con estradiol y progesterona, demostrando que la alteración en el eje HHG es el que determina la condición reproductiva en estos individuos¹⁶².

Los resultados del estudio de la foliculogénesis en el grupo PT se encuentran en relación con los niveles de la expresión enzimática en la cadena esteroidogénica. Una disminución de la enzima P450_{sc} podría deberse a la menor proporción de folículos secundarios, y la expresión normal de la P450_{c17} se asociaría a niveles de folículos terciarios similares a los del grupo normal. Adicionalmente, el aumento en

la expresión de aromatasa ovárica, hallado también por Tyndall y col., reflejaría un mecanismo compensatorio debido a que estos animales mantienen una secreción basal de estrógenos pero no desarrollan el aumento característico de este esteroide durante el ciclo estral¹⁴⁶, resultando entonces anovulatorios. La presencia ocasional de cuerpos lúteos podría relacionarse con defectos parciales del tratamiento empleado¹⁶², sugiriendo que la anovulación sería el resultado primordial de la androgenización neonatal.

El bloqueo de la acción androgénica por la administración temprana de flutamida acelera la maduración folicular caracterizada a edad prepuberal por un aumento de folículos antrales atrésicos, mientras que a edad adulta observamos una mayor proporción de folículos en atresia respecto al grupo normal y una mayor expresión de aromatasa. Son escasos los estudios sobre el papel de los andrógenos endógenos en la programación ovárica de la rata, y nuestros estudios en el grupo FM muestran que las alteraciones foliculares halladas no interfieren en el desarrollo de ciclos estrales regulares ni en los niveles de esteroides plasmáticos. Aunque la función endocrino-reproductiva en el grupo FM, a los 60 días de vida, no se modificó, el aumento de la atresia folicular y la proporción de folículos antrales atrésicos nos podría indicar que el bloqueo transitorio de la acción androgénica generaría un envejecimiento prematuro del ovario¹⁶³.

Los andrógenos adrenales participan activamente en el desarrollo de SOP en mujeres a la edad reproductiva¹⁶⁴, aunque es controversial el aporte de las glándulas adrenales en la secreción de los niveles de esteroides sexuales en la rata. Diversos estudios muestran que es posible detectar productos 17-hidroxilados provenientes de las adrenales en roedores⁷³ sin embargo, otros análisis realizados

no han podido evidenciar la expresión post-natal adrenal de la enzima P450c17 cuando fueron estudiadas por inmunohistoquímica y por microscopía electrónica^{74,145}. En este trabajo estudiamos la transcripción de enzimas “claves” pertenecientes a la vía esteroidogénica de la glándula adrenal. La resultante fue el no hallar diferencias significativas en los niveles de ARNm de la enzima P450c17 entre los grupos estudiados. Destacándose que no encontramos expresión de P450c17 por RT-PCR, por lo tanto, nuestros estudios demuestran que los tratamientos neonatales realizados no modifican el silenciamiento epigenético de la enzima, debido a la metilación de su promotor a edad postnatal¹⁶⁵.

En resumen, a nivel ovárico hemos hallado una alteración de la foliculogénesis en los animales neonatalmente androgenizados, resultando en una disminución de la expresión de las enzimas esteroidogénicas a la edad prepuberal, y ciclos en estro permanente a la edad adulta. Sin embargo, la administración de un xenoestrógeno (DES) a la edad prepuberal generó una reactivación de la maduración folicular, observando al sacrificio un activo desarrollo de folículos antrales. Adicionalmente, las células de la granulosa aisladas de éstos, cuando fueron cultivadas *in vitro*, responden al estímulo con hCG. Notablemente, no sólo fue posible estimular el ovario prepúber en las ratas PT sino que, cuando fueron estudiados a la edad adulta, resultaron capaces de responder aumentando los niveles de estradiol circulante luego de la estimulación con hCG; hormona que estimula al ovario a través de su unión a los receptores de LH e induce la ovulación¹⁶⁶. Estos resultados serían indicativos que el grupo PT no poseen una disfunción reproductiva primaria. Ha sido publicado que el trasplante de ovarios obtenidos de ratas androgenizadas en ratas controles como huéspedes, restituye la función ovárica del mismo, llegando a responder a los niveles cíclicos de gonadotrofinas, por lo tanto, los autores

plantean una falla hipotalámica permanente en las ratas androgenizadas¹⁶⁷. En resultados preliminares, nosotros no hallamos diferencias significativas en los niveles de gonadotrofinas circulantes ni en el análisis de la expresión hipotalámica de GnRH. Por lo tanto, resulta necesario el profundizar los estudios en la pulsatilidad de GnRH y gonadotrofinas en el presente modelo de estudio, ya que se ha descrito que las ratas androgenizadas en etapas tempranas, presentan modificaciones a nivel hipotalámico en torno al desarrollo de las neuronas CRH-inmunoreactivas y sobre la activación de las productoras de GnRH, encontrando una menor activación en las ratas androgenizadas¹⁶⁸.

El mecanismo de retroalimentación en el estado anovulatorio del grupo androgenizado alteraría la señalización endócrina del ovario sobre las células gonadotropas, función necesaria para la generación de picos de LH y su pulsatilidad característica¹⁶⁹.

Finalmente, el temprano bloqueo de la acción androgénica modificó la programación endócrina en la rata hembra. A edad prepuberal, se observó un aumento de los niveles de estradiol y 5α Diol, favoreciendo la maduración folicular, caracterizado por un mayor número de folículos antrales que se encaminan a la atresia. Luego de la pubertad, en el grupo flutamida se mantiene el ciclo estral, y los ovarios presentan folículos en todos los estadios del desarrollo, aunque la mayor expresión de aromatasa ovárica estimularía la foliculogénesis, aumentando la proporción de folículos atrésicos. El mecanismo a través del cual los antiandrógenos generan modificaciones en el desarrollo reproductivo de la hembra son desconocidos, sin embargo, se ha podido demostrar que los niveles esteroides sexuales en edades post-natales tempranas generan alteraciones estructurales a

nivel del SNC¹⁷⁰. La administración de flutamida generó, en ratas hembras prepúberes, una alteración morfológica del núcleo anteroventral periventricular (AVPV), relacionado con la regulación de la secreción de GnRH y la pulsatilidad de gonadotrofinas¹⁷¹.

CONCLUSIONES

El presente trabajo nos permitió evaluar la acción androgénica neonatal sobre la programación endocrino-metabólica de la rata hembra, y estudiar el impacto de los cambios durante el desarrollo (edades prepuberal y adulta). Según los objetivos planteados concluimos que:

1. SOBRE LA ACTIVIDAD NEUROENDOCRINO-METABÓLICA

- a) La actividad androgénica neonatal modula efectivamente la curva ponderal de crecimiento en la rata hembra, observándose un desplazamiento positivo en los animales androgenizados y uno negativo en individuos que recibieron el anti-andrógeno, éste último dependiente, al menos en parte, del desarrollo de una temprana hipofagia.
- b) Los eventos tempranos asociados a una disfunción en la programación metabólica debido al tratamiento neonatal, generan modificaciones en la masa y función del tejido adiposo parametrial y, consecuentemente, alteraciones en la leptinemia.
- c) El bloqueo transitorio de la acción androgénica resulta en un efecto insulino-sensibilizador en el individuo a edades tempranas (prepuberal), contrariamente, la androgenización neonatal induce el desarrollo de hiperinsulinemia durante la edad adulta.

2. SOBRE LA FUNCIÓN CORTICOADRENAL

- a) La reprogramación de las glándulas adrenales por la modificación de la actividad androgénica debido a ambos tratamientos neonatales, resulta en células adrenales que desarrollan una hipo-respuesta a concentraciones supra-fisiológicas de ACTH (las necesarias como mecanismo de defensa).
- b) La glándula adrenal no es una fuente androgénica de relevancia en la rata hembra debido a que a edad post-natal no encontramos expresión de la enzima P450c17 y no fue detectable la secreción *in vitro* de testosterona por parte de las células adrenales enriquecidas (zonas fasciculata y reticularis).

3. SOBRE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA

- a) La función ovárica se ve alterada por la modificación de la acción androgénica a edad neonatal: ambos tratamientos indujeron alteraciones en las expresiones génicas de enzimas “claves” de la cadena esteroidogénica (P450scc, P450c17 y aromatasas), asociadas a cambios en el desarrollo folicular y los niveles de esteroides circulantes.
- b) El bloqueo de la acción androgénica a edad neonatal impactó principalmente sobre el funcionamiento del ovario a la edad prepuberal dado que, a la edad adulta, el aumento de los niveles estrogénicos y la presencia de ciclos estrales regulares caracterizan, al menos parcialmente, la función reproductiva.
- c) El grupo androgenizado se caracterizó por una foliculogénesis disfuncional, presentando un aumento de los folículos primarios a la edad prepuberal, y

una menor proporción de folículos secundarios a la edad adulta acompañado de una mayor proporción de folículos atrésicos y el desarrollo de estructuras quísticas.

- d) En ambos grupos de estudio, el tratamiento prepuberal con un xenoestrógeno permitió demostrar que la función ovárica se encuentra conservada a través de la normal respuesta *in vitro* de las células de la granulosa. Mientras que a edad adulta, el estímulo *in vivo* de un análogo de la LH generó un aumento del estradiol circulante. Estos resultados nos permiten concluir que la disfunción reproductiva de los animales androgenizados no ocurre por una falla a nivel ovárico.

En conclusión, la etiología de las enfermedades crónicas no está limitada a la composición genética. El período neonatal representa una “ventana” de tiempo crítica para el desarrollo del SNC, de las funciones metabólicas y neuroendócrinas. El presente estudio pone en evidencia que, durante el período temprano de vida post-natal, la modificación de la función androgénica impacta sobre la programación endocrino-metabólica, conduciendo a una reorganización de la homeostasis del individuo y el desarrollo de alteraciones funcionales metabolo-endocrinas. Sin embargo, no todas las modificaciones inducidas se perpetúan, ello dependería del(los) mecanismo(s) involucrado(s) y según el entorno hormonal del individuo. El sistema reproductivo femenino pareciera poseer cierta plasticidad funcional, dado que es posible modificar las alteraciones de la fertilidad de los animales androgenizados. El surgimiento de este nuevo campo de la programación

endocrino-metabólica ofrece, por lo tanto, explicaciones alternativas sobre la etiología de las enfermedades crónicas de aparición durante la edad adulta.

La mayor parte de los efectos de los esteroides sexuales durante el desarrollo han sido detectados mediante estudios epidemiológicos y clínicos, sin embargo, la utilización de modelos experimentales nos permite investigar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la función estudiada. La identificación de estos mecanismos sería la clave en la prevención de enfermedades, no sólo relacionadas a los ejes neuroendocrinos sino también de aquellas metabólicas, lo que permitiría una temprana intervención terapéutica y así su apropiada corrección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Besedovsky, H. O. & del Rey, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* 17, 64–102 (1996).
2. Chautard, T., Spinedi, E., Voirol, M., Pralong, F. P. & Gaillard, R. C. Role of glucocorticoids in the response of the hypothalamo-corticotrope, immune and adipose systems to repeated endotoxin administration. *Neuroendocrinology* 69, 360–369 (1999).
3. Mora, F., Segovia, G., Del Arco, A., de Blas, M. & Garrido, P. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Res.* 1476, 71–85 (2012).
4. Ziegler, D. R. & Herman, J. P. Neurocircuitry of Stress Integration: Anatomical Pathways Regulating the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis of the Rat. *Integr. Comp. Biol.* 42, 541–551 (2002).
5. Osamura, R. Y. *Histology, Ultrastructure and Immunochemistry of Pituitary Gland, Rat in Endocrine System* (Springer Berlin Heidelberg, 1983)
6. Perez-Castro, C., Renner, U., Haedo, M. R., Stalla, G. K. & Arzt, E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol. Rev.* 92, 1–38 (2012).
7. Moguilevsky, J. A. & Schiaffini, O. *Hipofisis, control de su secreción.* (López, 1972).
8. Ghizzoni, L. et al. Corticotropin-releasing hormone (CRH) inhibits steroid biosynthesis by cultured human granulosa-lutein cells in a CRH and interleukin-1 receptor-mediated fashion. 4806–4811 (1997).
9. Rosol, T. J., Yarrington, J. T., Latendresse, J. & Capen, C. C. Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol. Pathol.* 29, 41–48 (2001).
10. Stalmans, W. & Laloux, M. Glucocorticoids and hepatic glycogen metabolism. *Monogr. Endocrinol.* 12, 517–533 (1979).
11. Zubiría, M. G. et al. Excess fructose intake-induced hypertrophic visceral adipose tissue results from unbalanced precursor cell adipogenic signals. *FEBS J.* 280, 5864–5874 (2013).
12. Chrousos, G. P., Torpy, D. J. & Gold, P. W. Interactions between the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Female Reproductive System: Clinical Implications. *Ann. Intern. Med.* 129, 229–240 (1998).
13. Marchetti, B., Gallo, F., Farinella, Z., Romeo, C. & Morale, M. C. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors in the neuroendocrine-immune network. Biochemical bases and implications for reproductive physiopathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 784, 209–236 (1996).
14. McNeilly, A. S., Crawford, J. L., Taragnat, C., Nicol, L. & McNeilly, J. R. The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reprod. Camb. Engl. Suppl.* 61, 463–476 (2003).
15. Rivier, C. & Rivest, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol. Reprod.* 45, 523–532 (1991).
16. Viau, V. Functional Cross-Talk Between the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal and -Adrenal Axes. *J. Neuroendocrinol.* 14, 506–513 (2002).

17. Thieulant, M. L. & Duval, J. Differential distribution of androgen and estrogen receptors in rat pituitary cell populations separated by centrifugal elutriation. *Endocrinology* 116, 1299–1303 (1985).
18. Balasubramanian, P. et al. High fat diet affects reproductive functions in female diet-induced obese and dietary resistant rats. *J. Neuroendocrinol.* 24, 748–755 (2012).
19. Ahima, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. 242S–249S (2006).
20. Rodriguez-Cuenca, S., Monjo, M., Proenza, A. M. & Roca, P. Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E200–207 (2005).
21. Ahima, R. S. Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 16, 307–313 (2005).
22. Arora, S. Leptin and its metabolic interactions – an update. *Diabetes Obes. Metab.* 10, 973–993 (2008).
23. Malendowicz, L. K., Rucinski, M., Belloni, A. S., Ziolkowska, A. & Nussdorfer, G. G. Leptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int. Rev. Cytol.* 263, 63–102 (2007).
24. Di Yorio, M. P., Bilbao, M. G., Pustovrh, M. C., Prestifilippo, J. P. & Faletti, A. G. Leptin modulates the expression of its receptors in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in a differential way. *J. Endocrinol.* 198, 355–366 (2008).
25. Silveira Cavalcante, F., Aiceles, V. & da Fonte Ramos, C. Leptin regulates gonadotropins and steroid receptors in the rats ovary. *Nutr. Hosp.* 28, 164–168 (2013).
26. Mayes, J. S. & Watson, G. H. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. 197–216 (2004).
27. Rosenbaum, M. & Leibel, R. L. Role of Gonadal Steroids in the Sexual Dimorphisms in Body Composition and Circulating Concentrations of Leptin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1784–1789 (1999).
28. Orbetzova, M. M. et al. Adipocytokines, neuropeptide Y and insulin resistance in overweight women with gynoid and android type of adipose tissue distribution. *Folia Med. (Plovdiv)* 54, 22–29 (2012).
29. Godoy-Matos, A. F. et al. Central-to-peripheral fat ratio, but not peripheral body fat, is related to insulin resistance and androgen markers in polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 25, 793–798 (2009).
30. Zhao, H., Tian, Z., Hao, J. & Chen, B. Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 3, 6 (2005).
31. Bellemare, V., Laberge, P., Noël, S., Tchernof, A. & Luu-The, V. Differential estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity and type 12 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression levels in preadipocytes and differentiated adipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 114, 129–134 (2009).
32. Tritos, N. A., Segal-Lieberman, G., Vezeridis, P. S. & Maratos-Flier, E. Estradiol-induced anorexia is independent of leptin and melanin-concentrating hormone. *Obes. Res.* 12, 716–724 (2004).

33. Bonavera, J. J., Dube, M. G., Kalra, P. S. & Kalra, S. P. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 134, 2367–2370 (1994).
34. Chai, J. K. et al. Use of orchietomy and testosterone replacement to explore meal number-to-meal size relationship in male rats. *Am. J. Physiol.* 276, R1366–1373 (1999).
35. Nunez, A. A., Siegel, L. I. & Wade, G. N. Central effects of testosterone on food intake in male rats. *Physiol. Behav.* 24, 469–471 (1980).
36. Brown, L. & Clegg, D. Central Effects of Estradiol in the Regulation of Adiposity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 122, 65–73 (2010).
37. Sun, J., Devish, K., Langer, W. J., Carmines, P. K. & Lane, P. H. Testosterone treatment promotes tubular damage in experimental diabetes in prepubertal rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292, F1681–1690 (2007).
38. Bautista, C. J., Martínez-Samayoa, P. M. & Zambrano, E. Sex steroids regulation of appetitive behavior. *Mini Rev. Med. Chem.* 12, 1107–1118 (2012).
39. Levin, B. E. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 1107–1121 (2006).
40. Levin, B. E. Interaction of perinatal and pre-pubertal factors with genetic predisposition in the development of neural pathways involved in the regulation of energy homeostasis. *Brain Res.* 1350, 10–17 (2010).
41. BARRACLOUGH, C. A. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 68, 62–67 (1961).
42. Schwarz, J. M. & McCarthy, M. M. The role of neonatal NMDA receptor activation in defeminization and masculinization of sex behavior in the rat. *Horm. Behav.* 54, 662–668 (2008).
43. Szukiewicz, D. & Uilenbroek, J. T. Polycystic ovary syndrome--searching for an animal model. *J. Med.* 29, 259–275 (1998).
44. Azziz, R. et al. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2745–2749 (2004).
45. Knochauer, E. S. et al. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 3078–3082 (1998).
46. Dunaif, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr. Rev.* 18, 774–800 (1997).
47. Azziz, R. et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 4237–4245 (2006).
48. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 81, 19–25 (2004).
49. Tsilchorozidou, T., Overton, C. & Conway, G. S. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 60, 1–17 (2004).

50. Lookingland, K. J. & Barraclough, C. A. Changes in plasma hormone profiles and in hypothalamic catecholamine turnover rates in neonatally androgenized rats during the transition phase from cyclicity to persistent estrus (delayed anovulatory syndrome). *Biol. Reprod.* 27, 282–299 (1982).
51. Spinedi, E., Mariani, V., Bulfon, M., Colombani-Vidal, M. & Scaglia, H. Analysis of the hypothalamic-pituitary-ovary axis in the neonatally-androgenized female rat. *J. Endocrinol. Invest.* 13, 481–488 (1990).
52. Bogovich, K. Induction of ovarian cysts in progesterone-synchronized immature rats: evidence that suppression of follicular aromatase activity is not a prerequisite for the induction of cystic follicles. *Endocrinology* 124, 1646–1653 (1989).
53. Mannerås, L. et al. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 148, 3781–3791 (2007).
54. Polderman, K. H., Gooren, L. J., Asscheman, H., Bakker, A. & Heine, R. J. Induction of insulin resistance by androgens and estrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 265–271 (1994).
55. Holmäng, A., Larsson, B. M., Brzezinska, Z. & Björntorp, P. Effects of short-term testosterone exposure on insulin sensitivity of muscles in female rats. *Am. J. Physiol.* 262, E851–855 (1992).
56. Holmäng, A., Svedberg, J., Jennische, E. & Björntorp, P. Effects of testosterone on muscle insulin sensitivity and morphology in female rats. *Am. J. Physiol.* 259, E555–560 (1990).
57. Perelló, M., Castrogiovanni, D., Moreno, G., Gaillard, R. C. & Spinedi, E. Neonatal hypothalamic androgenization in the female rat induces changes in peripheral insulin sensitivity and adiposity function at adulthood. *Neuro Endocrinol. Lett.* 24, 241–248 (2003).
58. Perello, M., Castrogiovanni, D., Giovambattista, A., Gaillard, R. C. & Spinedi, E. Impairment in insulin sensitivity after early androgenization in the post-pubertal female rat. *Life Sci.* 80, 1792–1798 (2007).
59. Abbott, D. H., Dumesic, D. A. & Franks, S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J. Endocrinol.* 174, 1–5 (2002).
60. Abbott, D. H., Barnett, D. K., Bruns, C. M. & Dumesic, D. A. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum. Reprod. Update* 11, 357–374 (2005).
61. Bremer, A. A. & Miller, W. L. The serine phosphorylation hypothesis of polycystic ovary syndrome: a unifying mechanism for hyperandrogenemia and insulin resistance. *Fertil. Steril.* 89, 1039–1048 (2008).
62. Alzamendi, A. et al. Parametrial adipose tissue and metabolic dysfunctions induced by fructose-rich diet in normal and neonatal-androgenized adult female rats. *Obes. Silver Spring Md* 18, 441–448 (2010).
63. Seale, J. V., Wood, S. A., Atkinson, H. C., Harbuz, M. S. & Lightman, S. L. Postnatal masculinization alters the HPA axis phenotype in the adult female rat. *J. Physiol.* 563, 265–274 (2005).

64. Hotchkiss, A. K., Ostby, J. S., Vandenberg, J. G. & Gray, L. E., Jr. Androgens and environmental antiandrogens affect reproductive development and play behavior in the Sprague-Dawley rat. *Environ. Health Perspect.* 110 Suppl 3, 435–439 (2002).
65. Anderson, J. The role of antiandrogen monotherapy in the treatment of prostate cancer. *BJU Int.* 91, 455–461 (2003).
66. Durlej, M. et al. Prenatal and neonatal exposure to the antiandrogen flutamide alters connexin 43 gene expression in adult porcine ovary. *Domest. Anim. Endocrinol.* 40, 19–29 (2011).
67. Durlej, M., Knapczyk-Stwora, K. & Slomczynska, M. Prenatal and neonatal flutamide administration increases proliferation and reduces apoptosis in large antral follicles of adult pigs. *Anim. Reprod. Sci.* (2012). doi:10.1016/j.anireprosci.2012.04.001
68. Hu, Y.-C. et al. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11209–11214 (2004).
69. Gray, L. E. et al. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum. Reprod. Update* 7, 248–264 (2001).
70. S, W. & Ja, C. Glucocorticoids, stress, and fertility., *Glucocorticoids, Stress, and Fertility.* *Minerva Endocrinol.* 35, 35, 109, 109–125 (2010).
71. Hornsby, P. J. Adrenarche: a cell biological perspective. *J. Endocrinol.* 214, 113–119 (2012).
72. Keeney, D. S., Jenkins, C. M. & Waterman, M. R. Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo. *Endocrinology* 136, 4872–4879 (1995).
73. Pignatelli, D., Xiao, F., Gouveia, A. M., Ferreira, J. G. & Vinson, G. P. Adrenarche in the rat. *J. Endocrinol.* 191, 301–308 (2006).
74. Pelletier, G. et al. Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450(scc), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450(c17)) in rat adrenal cortex and gonads. *J. Endocrinol.* 171, 373–383 (2001).
75. Campbell, B. Adrenarche in comparative perspective. *Am. J. Hum. Biol. Off. J. Hum. Biol. Counc.* 23, 44–52 (2011).
76. Seale, J. V. et al. Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *J. Neuroendocrinol.* 16, 516–524 (2004).
77. Nowak, K. W., Neri, G., Nussdorfer, G. G. & Malendowicz, L. K. Effects of sex hormones on the steroidogenic activity of dispersed adrenocortical cells of the rat adrenal cortex. *Life Sci.* 57, 833–837 (1995).
78. Gorski, M. E. & Lawton, I. E. Adrenal involvement in determining the time of onset of puberty in the rat. *Endocrinology* 93, 1232–1234 (1973).
79. Delemarre-van de Waal, H. A., van Coeverden, S. C. C. M. & Engelbregt, M. T. J. Factors affecting onset of puberty. *Horm. Res.* 57 Suppl 2, 15–18 (2002).

80. Sridaran, R. & Blake, C. A. Effects of long-term adrenalectomy on periovulatory increases in serum gonadotrophins and ovulation in rats. *J. Endocrinol.* 84, 75–82 (1980).
81. Kinouchi, R. et al. Prepubertal exposure to glucocorticoid delays puberty independent of the hypothalamic Kiss1-GnRH system in female rats. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 30, 596–601 (2012).
82. Meijs-Roelofs, H. M. & Kramer, P. Effects of adrenalectomy on the release of follicle-stimulating hormone and the onset of puberty in female rats. *J. Endocrinol.* 75, 419–426 (1977).
83. Brann, D. W. & Mahesh, V. B. Role of corticosteroids in female reproduction. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 5, 2691–2698 (1991).
84. Hsueh, A. J. & Erickson, G. F. Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Steroids* 32, 639–648 (1978).
85. Bukovsky, A. et al. Oogenesis in adult mammals, including humans. *Endocrine* 26, 301–316 (2005).
86. McGee, E. A., Perlas, E., LaPolt, P. S., Tsafiriri, A. & Hsueh, A. J. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biol. Reprod.* 57, 990–998 (1997).
87. Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M. & Eppig, J. J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296, 2178–2180 (2002).
88. Pedersen, T. & Peters, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* 17, 555–557 (1968).
89. Kättström, P. O., Bjerneroth, G., Nilsson, B. O., Holmdahl, R. & Larsson, E. A retroviral gp70-related protein is expressed at specific stages during mouse oocyte maturation and in preimplantation embryos. *Cell Differ. Dev. Off. J. Int. Soc. Dev. Biol.* 28, 47–54 (1989).
90. Thomas, F. H. & Vanderhyden, B. C. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 19 (2006).
91. Wen, J. et al. PAR6, a potential marker for the germ cells selected to form primordial follicles in mouse ovary. *PloS One* 4, e7372 (2009).
92. Rajkovic A, Pangas S and Matzuk M. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. Kobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition, 2006).
93. Sirard, M.-A., Desrosier, S. & Assidi, M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology* 68 Suppl 1, S71–76 (2007).
94. Ramirez, V. D. & Sawyer, C. H. Advancement of Puberty in the Female Rat by Estrogen. *Endocrinology* 76, 1158–1168 (1965).
95. Lomniczi, A., Wright, H., Castellano, J. M., Sonmez, K. & Ojeda, S. R. A system biology approach to identify regulatory pathways underlying the

- neuroendocrine control of female puberty in rats and nonhuman primates. *Horm. Behav.* 64, 175–186 (2013).
96. Gonzalez, M. D., López, F. & Aguilar, E. Involvement of prolactin in the onset of puberty in female rats. *J. Endocrinol.* 101, 63–68 (1984).
 97. Goldman, B. D., Grazia, Y. R., Kamberi, I. A. & Porter, J. C. Serum Gonadotropin Concentrations in Intact and Castrated Neonatal Rats. *Endocrinology* 88, 771–776 (1971).
 98. Mathews, D., Andrews, W. W., Parker, R., Jr & Ojeda, S. R. A role for aromatizable androgens in female rat puberty. *Biol. Reprod.* 36, 836–843 (1987).
 99. Leibowitz, S. F., Akabayashi, A., Alexander, J., Karatayev, O. & Chang, G.-Q. Puberty onset in female rats: relationship with fat intake, ovarian steroids and the peptides, galanin and enkephalin, in the paraventricular and medial preoptic nuclei. *J. Neuroendocrinol.* 21, 538–549 (2009).
 100. Moguilevsky, J. A. & Wuttke, W. Changes in the control of gonadotrophin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* 109, 188–195 (2001).
 101. Eckstein, B., Mechoulam, R. & Burstein, S. H. Identification of 5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol as a Principal Metabolite of Pregnenolone in Rat Ovary at Onset of Puberty. *Nature* 228, 866–868 (1970).
 102. Frisch, R. E., Hegsted, D. M. & Yoshinaga, K. Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 4172–4176 (1975).
 103. Urbanski, H. F. & Ojeda, S. R. The development of afternoon minisurges of luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats is ovary dependent. *Endocrinology* 118, 1187–1193 (1986).
 104. Becú-Villalobos, D. & Libertun, C. Development of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron regulation in the female rat. *Cell. Mol. Neurobiol.* 15, 165–176 (1995).
 105. Ojeda, S. R. & Skinner, M. K. “Puberty in the Rat” Knobil and Neill’s *Physiology of Reproduction* (Third Edition, Academic Press, 2006)
 106. Monies, G. S. & Luque, E. H. Effects of Ovarian Steroids on Vaginal Smears in the Rat. *Cells Tissues Organs* 133, 192–199 (1988).
 107. Marcondes, F. K., Bianchi, F. J. & Tanno, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol. Rev. Brasleira Biol.* 62, 609–614 (2002).
 108. Everett, J. W. Vaginal Cytology and Ovarian Status. *Neurobiology of Reproduction in the Female Rat* 32, 2–7 (Springer Berlin Heidelberg, 1989).
 109. Westwood, F. R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicol. Pathol.* 36, 375–384 (2008).
 110. Ferre, C. et al. Comparison of early morphological and molecular changes induced by 17-alpha-methyltestosterone and estradiol benzoate in the rat

- ovary. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Für Toxikol. Pathol.* 65, 397–407 (2013).
111. Cruz, G., Barra, R., González, D., Sotomayor-Zárate, R. & Lara, H. E. Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertil. Steril.* 98, 1283–1290 (2012).
 112. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* (National Academies Press (US), 2011).
 113. Ongaro, L., Castrogiovanni, D., Giovambattista, A., Gaillard, R. C. & Spinedi, E. Enhanced proinflammatory cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in the adult male rat after either neonatal or prepubertal ablation of biological testosterone activity. *Neuroimmunomodulation* 18, 254–260 (2011).
 114. Giovambattista, A. et al. Direct effect of ghrelin on leptin production by cultured rat white adipocytes. *Obes. Silver Spring Md* 14, 19–27 (2006).
 115. Piermaría, J. et al. Impact of estradiol on parametrial adipose tissue function: evidence for establishment of a new set point of leptin sensitivity in control of energy metabolism in female rat. *Endocrine* 20, 239–245 (2003).
 116. Suescun, M. O., González, S. I., Chiauzzi, V. A. & Calandra, R. S. Effects of induced hypoprolactinemia on testicular function during gonadal maturation in the rat. *J. Androl.* 6, 77–82 (1985).
 117. Giovambattista, A., Chisari, A. N., Gaillard, R. C. & Spinedi, E. Food intake-induced leptin secretion modulates hypothalamo-pituitary-adrenal axis response and hypothalamic Ob-Rb expression to insulin administration. *Neuroendocrinology* 72, 341–349 (2000).
 118. Spinedi, E., Giacomini, M., Jacquier, M.-C. & Gaillard, R. C. Changes in the Hypothalamo-Corticotrope Axis after Bilateral Adrenalectomy: Evidence for a Median Eminence Site of Glucocorticoid Action. *Neuroendocrinology* 53, 160–170 (1991).
 119. Perello, M., Gaillard, R. C., Chisari, A. & Spinedi, E. Adrenal Enucleation in MSG-Damaged Hyperleptinemic Male Rats Transiently Restores Adrenal Sensitivity to Leptin. *Neuroendocrinology* 78, 176–184 (2003).
 120. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159 (1987).
 121. Chern, B. Y., Chen, Y. H., Hong, L. S. & Lapolt, P. S. Ovarian steroidogenic responsiveness to exogenous gonadotropin stimulation in young and middle-aged female rats. 285–291 (2000).
 122. Perelló, M. et al. Nature of changes in adrenocortical function in chronic hyperleptinemic female rats. *Endocrine* 24, 167–175 (2004).
 123. Vitale, A. M. et al. Inhibin a increases apoptosis in early ovarian antral follicles of diethylstilbestrol-treated rats. *Biol. Reprod.* 67, 1989–1995 (2002).

124. Aguado, L. I. & Ojeda, S. R. Prepubertal rat ovary: hormonal modulation of beta-adrenergic receptors and of progesterone response to adrenergic stimulation. *Biol. Reprod.* 34, 45–50 (1986).
125. Guilloteau, P., Zabielski, R., Hammon, H. M. & Metges, C. C. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 60 Suppl 3, 17–35 (2009).
126. Alexanderson, C. et al. Postnatal testosterone exposure results in insulin resistance, enlarged mesenteric adipocytes, and an atherogenic lipid profile in adult female rats: comparisons with estradiol and dihydrotestosterone. *Endocrinology* 148, 5369–5376 (2007).
127. Ferreira, J. A., Foley, A. M. & Brown, M. Sex hormones differentially influence voluntary running activity, food intake and body weight in aging female and male rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 112, 3007–3018 (2012).
128. Takasawa, K., Kubota, N., Terauchi, Y. & Kadowaki, T. Impact of increased PPAR γ activity in adipocytes in vivo on adiposity, insulin sensitivity and the effects of rosiglitazone treatment. *Endocr. J.* 55, 767–776 (2008).
129. Saruhan, B. G., Ozbag, D., Gumusalan, Y. & Ozdemir, N. Influence of ovariectomy and flutamide treatment on vaginal tissue and body weight. *Saudi Med. J.* 26, 1897–1903 (2005).
130. Kim, H. S. et al. Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague-Dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone, and flutamide. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 67, 52–62 (2002).
131. Chowen, J. A., Argente, J., Vician, L., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. Pro-Opiomelanocortin Messenger RNA in Hypothalamic Neurons Is Increased by Testosterone through Aromatization to Estradiol. *Neuroendocrinology* 52, 581–588 (1990).
132. Ongaro, L., Giovambattista, A. & Spinedi, E. Impact of neonatal manipulation of androgen receptor function on endocrine-metabolic programming in the juvenile female rat. *ISRN Endocrinol.* 2013, 181950 (2013).
133. Gambineri, A. et al. Effect of flutamide and metformin administered alone or in combination in dieting obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 60, 241–249 (2004).
134. Paoletti, A. M. et al. Treatment with flutamide improves hyperinsulinemia in women with idiopathic hirsutism. *Fertil. Steril.* 72, 448–453 (1999).
135. Ibáñez, L. et al. Low-dose pioglitazone, flutamide, metformin plus an estrogen-progestagen for non-obese young women with polycystic ovary syndrome: increasing efficacy and persistent safety over 30 months. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 26, 869–873 (2010).
136. De Moura, E. G. & Passos, M. C. F. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci. Rep.* 25, 251–269 (2005).
137. Welberg, L. A., Seckl, J. R. & Holmes, M. C. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience* 104, 71–79 (2001).

138. Romeo, R. D., Lee, S. J. & McEwen, B. S. Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. *Neuroendocrinology* 80, 387–393 (2004).
139. McCormick, C. M., Furey, B. F., Child, M., Sawyer, M. J. & Donohue, S. M. Neonatal sex hormones have 'organizational' effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. *Dev. Brain Res.* 105, 295–307 (1998).
140. Bingham, B., Gray, M., Sun, T. & Viau, V. Postnatal blockade of androgen receptors or aromatase impair the expression of stress hypothalamic-pituitary-adrenal axis habituation in adult male rats. *Psychoneuroendocrinology* 36, 249–257 (2011).
141. Bingham, B., Wang, N. X. R., Innala, L. & Viau, V. Postnatal aromatase blockade increases c-fos mRNA responses to acute restraint stress in adult male rats. *Endocrinology* 153, 1603–1608 (2012).
142. Caron, E., Ciofi, P., Prevot, V. & Bouret, S. G. Alteration in neonatal nutrition causes perturbations in hypothalamic neural circuits controlling reproductive function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 11486–11494 (2012).
143. Cameron, N. M. Maternal programming of reproductive function and behavior in the female rat. 10 (2011).
144. Oonk, R. B., Parker, K. L., Gibson, J. L. & Richards, J. S. Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450_{scc}) gene. Structure and regulation by cAMP in vitro. 22392–22401 (1990).
145. Payne, A. H. & Hales, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* 25, 947–970 (2004).
146. Tyndall, V. et al. Effect of androgen treatment during foetal and/or neonatal life on ovarian function in prepubertal and adult rats. *Reprod. Camb. Engl.* 143, 21–33 (2012).
147. Chen, Y., Breen, K. & Pepling, M. E. Estrogen can signal through multiple pathways to regulate oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary. *J. Endocrinol.* 202, 407–417 (2009).
148. Tetsuka, M. et al. Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J. Endocrinol.* 145, 535–543 (1995).
149. Salvetti, N. R. et al. An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 7, 68 (2009).
150. Adriaens, I., Cortvrindt, R. & Smitz, J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 19, 398–408 (2004).
151. Wang, X. N. & Greenwald, G. S. Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice. *J. Reprod. Fertil.* 99, 403–413 (1993).
152. Hillier, S. G. & Tetsuka, M. Role of androgens in follicle maturation and atresia. *Baillières Clin. Obstet. Gynaecol.* 11, 249–260 (1997).

153. Lenie, S. & Smitz, J. Functional AR signaling is evident in an in vitro mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis. *Biol. Reprod.* 80, 685–695 (2009).
154. Yang, J.-L. et al. Testosterone induces redistribution of forkhead box-3a and down-regulation of growth and differentiation factor 9 messenger ribonucleic acid expression at early stage of mouse folliculogenesis. *Endocrinology* 151, 774–782 (2010).
155. Gelety, T. J. & Magoffin, D. A. Ontogeny of steroidogenic enzyme gene expression in ovarian theca-interstitial cells in the rat: regulation by a paracrine theca-differentiating factor prior to achieving luteinizing hormone responsiveness. *Biol. Reprod.* 56, 938–945 (1997).
156. Sotomayor-Zárate, R., Tiszavari, M., Cruz, G. & Lara, H. E. Neonatal exposure to single doses of estradiol or testosterone programs ovarian follicular development-modified hypothalamic neurotransmitters and causes polycystic ovary during adulthood in the rat. *Fertil. Steril.* 96, 1490–1496 (2011).
157. Hutter, H. S. & Gibson, M. J. Effect of neonatal androgenization on positive feedback in female mice. *Biol. Reprod.* 38, 636–638 (1988).
158. Yoshimura, H., Yoshida, H. & Ogawa, N. Neonatal gonadal hormone treatments and adult open-field behavior in female rats. *Yakubutsu Seishin Kōdō Jpn. J. Psychopharmacol.* 2, 81–85 (1982).
159. Tramezzani, J. H., Voloschin, L. M. & Nallar, R. EFFECT OF A SINGLE DOSE OF TESTOSTERONE PROPIONATE ON VAGINAL OPENING IN THE RAT. *Cells Tissues Organs* 52, 244–251 (1963).
160. Ashby, J., Owens, W., Deghenghi, R. & Odum, J. Concept evaluation: an assay for receptor-mediated and biochemical antiestrogens using pubertal rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 35, 393–397 (2002).
161. Simon, L. et al. Exposure of neonatal rats to anti-androgens induces penile mal-developments and infertility comparable to those induced by oestrogens. *Int. J. Androl.* 35, 364–376 (2012).
162. Diaz, D. R., Fleming, D. E. & Rhee, R. W. The hormone-sensitive early postnatal periods for sexual differentiation of feminine behavior and luteinizing hormone secretion in male and female rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 86, 227–232 (1995).
163. Drummond, A. E. The role of steroids in follicular growth. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 4, 16 (2006).
164. Köşüş, N., Köşüş, A., Kamalak, Z., Hızlı, D. & Turhan, N. Ö. Impact of adrenal versus ovarian androgen ratio on signs and symptoms of polycystic ovarian syndrome. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 28, 611–614 (2012).
165. Missaghian, E. et al. Role of DNA methylation in the tissue-specific expression of the CYP17A1 gene for steroidogenesis in rodents. *J. Endocrinol.* 202, 99–109 (2009).
166. Mitchell, J. A. & Yochim, J. M. Relation of HCG-induced ovulation to the production of prolonged diestrus in the adult rat. *Endocrinology* 82, 1142–1148 (1968).

167. Gorski, R. A. & Wagner, J. W. Gonadal Activity and Sexual Differentiation of the Hypothalamus. *Endocrinology* 76, 226–239 (1965).
168. Fukushima, A., Furuta, M., Kimura, F., Akema, T. & Funabashi, T. Testosterone exposure during the critical period decreases corticotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of female rats. *Neurosci. Lett.* 534, 64–68 (2013).
169. Bukovskya, A. et al. Postnatal androgenization induces premature aging of rat ovaries. *Steroids* 65, 190–205 (2000).
170. Rhees, R. W., Shryne, J. E. & Gorski, R. A. Termination of the hormone-sensitive period for differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 52, 17–23 (1990).
171. Lund, T. D., Salyer, D. L., Fleming, D. E. & Lephart, E. D. Pre- or postnatal testosterone and flutamide effects on sexually dimorphic nuclei of the rat hypothalamus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 120, 261–266 (2000).