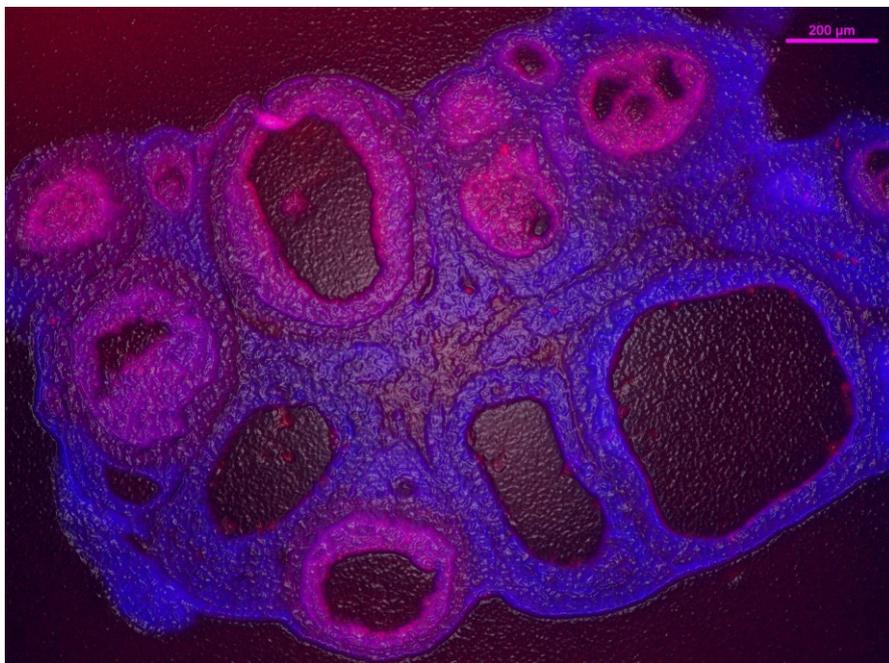


**PEDECIBA Biología. Opción Ciencias Fisiológicas**

# **Los andrógenos como señal inductora en el desarrollo del ovario poliquístico.**

Gabriel Anesetti Nauar



Orientadora: Dra. Rebeca Chávez-Genaro

Noviembre 2015

## INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
<b>JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>65</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>74</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>

**ANEXO I:** Anesetti G, Chávez-Genaro R. Neonatal testosterone exposure induces early development of follicular cysts followed by sympathetic ovarian hyperinnervation. *Reprod Fertil Dev.* 2015 May 20. doi: 10.1071/RD14460

**ANEXO II:** Anesetti G, Chávez-Genaro R. Impact of neonatal androgens on ovarian follicular growth at pubertal and adult age. Enviado a consideración para publicación en *Reprod Fertil Dev.*

## RESUMEN

Los andrógenos son hormonas esteroideas que participan en el control del crecimiento folicular. Tanto su exceso como su falta provocan alteraciones del funcionamiento del ovario. Diversos estudios han mostrado que la exposición a un ambiente hiperandrogénico durante el desarrollo embrionario y/o fetal provoca efectos a largo plazo sobre la función gonadal y que estos podrían estar asociados al desarrollo de patologías reproductivas de alta prevalencia como el síndrome de ovario poliquístico (SOP). La asociación del desarrollo de quistes ováricos con una hiperactividad del sistema simpático también ha sido reportada, aunque su papel como factor etiológico del desarrollo quístico no es claro. Si bien no existen modelos animales que desarrollen espontáneamente SOP, se han logrado inducir alteraciones similares mediante tratamiento con esteroides (andrógenos o estrógenos). La exposición a estas hormonas durante la gestación induce alteraciones funcionales del sistema hipotálamo-hipofisario que terminan en el desarrollo de ovarios poliquísticos. El periodo de ensamblaje folicular es una etapa crucial del desarrollo del ovario ya que en él se determina el número máximo de folículos presentes en el ovario. En los roedores este proceso ocurre durante la primera semana de vida postnatal o periodo neonatal. No se conocen los efectos de la exposición a andrógenos durante este periodo sobre la dinámica folicular del ovario adulto.

En este trabajo nos propusimos conocer los efectos de la exposición neonatal a dos andrógenos diferentes, testosterona y dihidrotestosterona (DHT), sobre el desarrollo y la función del ovario de la rata a diferentes edades. La testosterona es aromatizable a estradiol, por lo que podría actuar tanto sobre los receptores de andrógenos como de estrógenos, mientras que la que la DHT no es aromatizable y solo activará los receptores androgénicos.

En primera instancia se caracterizaron los efectos a corto plazo de la exposición androgénica sobre el ovario. Ambos andrógenos mostraron un efecto protector sobre los ovocitos que se manifestó por un incremento significativo del número de folículos presentes en etapas prepuberales. Para determinar si los andrógenos neonatales provocaban cambios permanentes en la función del ovario llevando a la producción de un ovario poliquístico, se analizó la dinámica folicular y la

inervación simpática durante el periodo puberal, adulto joven y adulto. La testosterona neonatal indujo el desarrollo de estructuras quísticas funcionales, secretoras de estradiol, y anovulación. Esta situación se mantuvo en todas las edades analizadas. La presencia de quistes ocurrió en forma previa al desarrollo de una hiperinervación simpática. El estímulo gonadotrófico exógeno o el injerto de ovarios expuestos a testosterona en animales controles permitieron la ovulación, lo que sugiere que la principal alteración inducida por la testosterona ocurre a nivel del sistema hipotálamo-hipofisario.

Por otra parte, los animales expuestos neonatalmente a DHT ovularon espontáneamente y si bien desarrollaron estructuras foliculares quísticas, su aparición ocurrió en edades más avanzadas y en un número mucho menor. En este caso no se detectó incremento de la inervación simpática. Las alteraciones de la dinámica folicular fueron acompañadas por modificaciones morfológicas de los folículos antrales y un incremento del número de folículos preantrales presentes en el ovario en la edad adulta, sugiriendo que los efectos de la DHT ocurren fundamentalmente sobre el ovario.

En conclusión, ambos andrógenos favorecieron la sobrevida folicular a corto plazo, e indujeron un efecto programador sobre la función reproductiva, aunque en forma diferente. La ausencia de ovulación inducida por la testosterona y su restauración por la presencia de gonadotrofinas sugiere efectos centrales que serían mediados por receptores estrogénicos, ya que estas alteraciones no fueron inducidas por la DHT. Ésta indujo efectos sobre la estructura folicular y su dinámica en el ovario, los que no estuvieron presentes en los animales expuestos a testosterona. Probablemente estos efectos locales estén vinculados a una respuesta más marcada de los ovarios a la DHT que a la testosterona o a la acción combinada con otros factores no identificados. Nuestros resultados muestran el papel de diferentes andrógenos sobre el desarrollo del ovario, y abren la posibilidad de que las manifestaciones clínicas heterogéneas vistas en patologías como el SOP podrían estar asociadas a cambios hormonales sutiles durante el desarrollo de la población folicular.

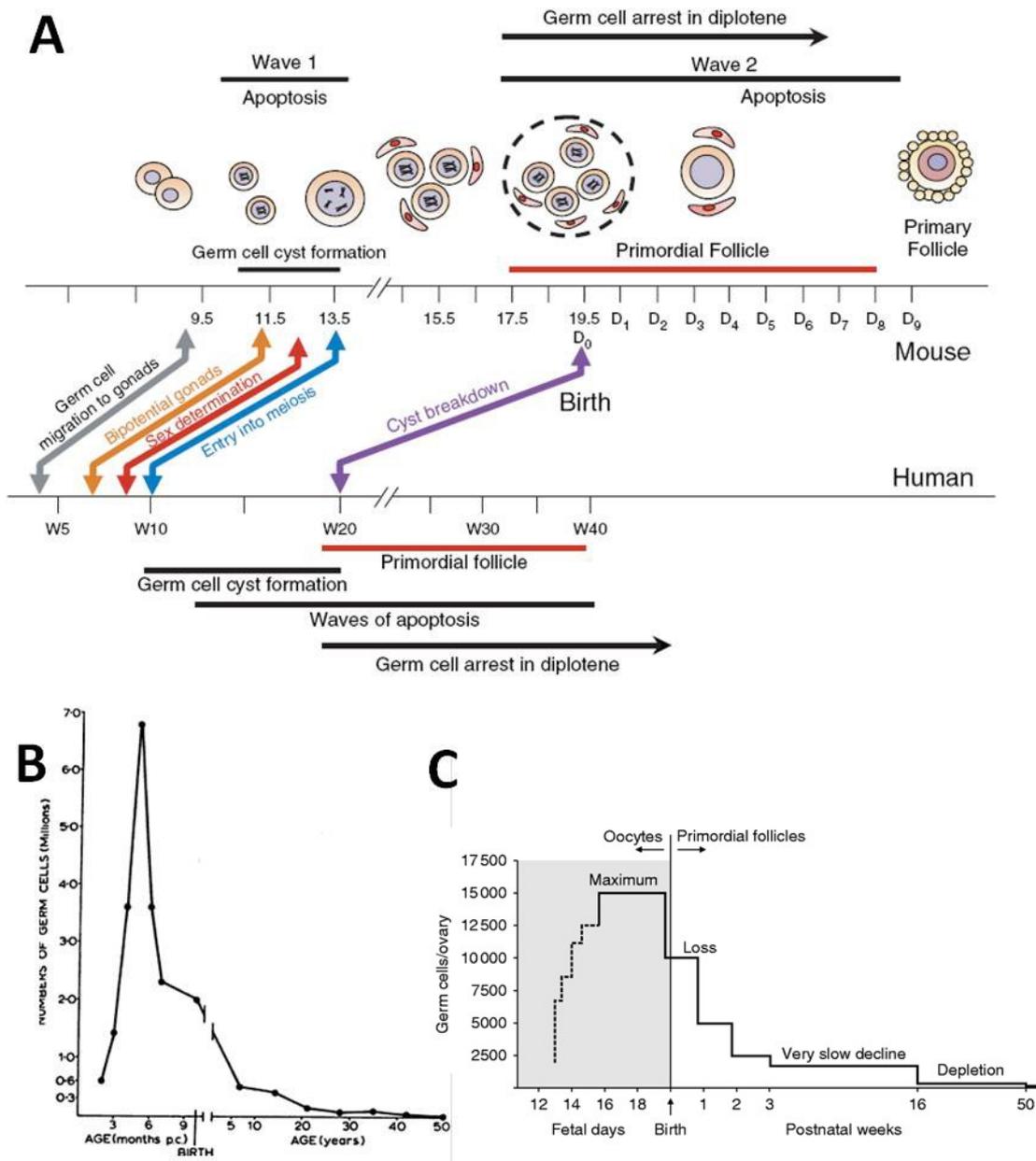
## ANTECEDENTES

- **El periodo neonatal y el desarrollo del ovario de la rata**

El folículo ovárico constituye la unidad funcional básica del ovario de los mamíferos. Cada folículo está compuesto de un ovocito rodeado por un conjunto de células somáticas llamadas células foliculares o granulosa. En líneas generales, las células germinales se originan en la región posterior del epiblasto en la unión con el ectodermo extraembrionario. De allí migran durante el periodo embrionario hacia el primordio gonadal, mientras proliferan y se diferencian en ovogonias. Estas se disponen en grupos, formando los cordones ovígeros o nidos ovogoniales, separados entre ellos por bandas de tejido estromal. En estos nidos es donde comienzan la profase meiótica. En los roedores, inmediatamente después del nacimiento ocurre una onda de apoptosis que disminuye enormemente el número de ovocitos, permitiendo a su vez que los sobrevivientes queden individualmente rodeados por células foliculares o pregranulosas dando origen a los folículos primordiales (Wilhelm *et al.* 2007, Smith *et al.* 2014). Todo este proceso es completado dentro de los primeros 4 días del desarrollo postnatal (Rajah *et al.* 1992). En el humano, el ensamblaje folicular comienza alrededor de la semana 21 de gestación extendiéndose hasta la semana 31 (Konishi *et al.* 1986) (Fig. 1A). Los mecanismos que disparan los procesos de apoptosis ovocitaria y el concomitante ensamblaje folicular son poco claros. Se ha postulado que la caída de las concentraciones circulantes de estrógenos como consecuencia del nacimiento, constituye la principal señal para el comienzo de estos procesos en los roedores (Chen *et al.* 2007), pero es evidente que no es aplicable para otras especies, como el humano donde las hormonas maternas continúan estando presentes durante todo este proceso (McGee & Hsueh 2000).

Todos los mecanismos involucrados en el ensamblaje folicular resultan críticos dado que fijan el tamaño del pool de folículos primordiales, ya que estos no proliferan ni incrementan su número una vez que están formados (Fig. 1B y C).

**Figura 1.- El proceso de ovogénesis.**



**A** - Representación esquemática de los procesos que tienen lugar durante la ovogénesis en el humano y los roedores, comenzando desde la migración de las células germinales primordiales hasta el comienzo de la foliculogénesis. La línea del tiempo correspondiente a los roedores está representada en días, mientras que la correspondiente a los humanos lo está en semanas. **B** - Número de células germinales presentes en el ovario humano a lo largo de la vida. **C** - Cambios en el número de células de la línea germinal presentes en el ovario de ratón a lo largo de la vida pre y postnatal.

A - Tomado de Sarraj and Drummond, 2012.

B - Tomado de Baker TG: Radiosensitivity of mammalian oocytes with particular reference to the human female. Am J Obstet Gynecol 110:746, 1971.

C - Tomado de Kerr et al, 2013.

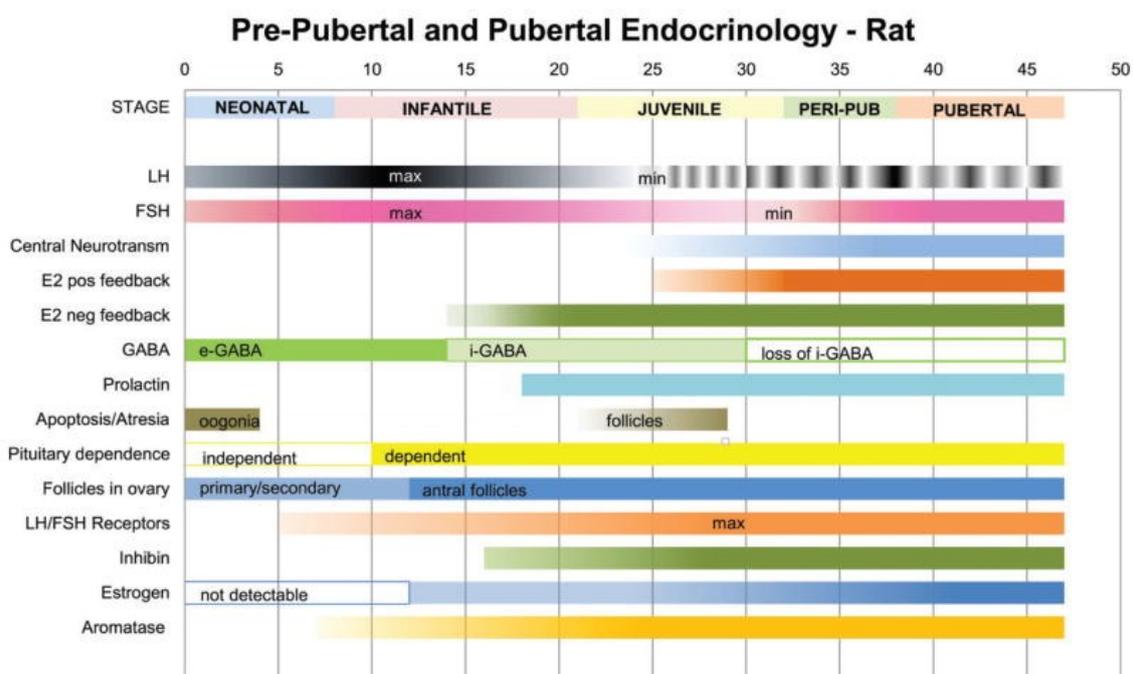
Aunque en la última década varios estudios han sugerido la existencia de un stock de células madre de la línea germinal en ovarios adultos, ya sea existentes en el propio ovario o a partir de células de la médula ósea (Johnson *et al.* 2004, Kerr *et al.* 2006, Lee *et al.* 2007), su contribución como fuente de ovocitos en condiciones normales y aún su propia existencia son todavía una cuestión sin resolver (Eggen *et al.* 2006, Begum *et al.* 2008, Gheorghisan-Galateanu *et al.* 2014, Hanna & Hennebold 2014).

*Por lo tanto, el pool de folículos primordiales presentes una vez culminado el ensamblaje folicular representa el número total de folículos disponible en una hembra durante su vida reproductiva (Kezele et al. 2002).*

El pasaje de folículos desde el pool de reposo (folículos primordiales) al de crecimiento ocurre desde el mismo momento en que se forman los primeros folículos. Así en los ovarios de roedores, se observan folículos en crecimiento desde el periodo postnatal temprano (Picut *et al.* 2014a), mientras que en otras especies, como rumiantes (Sawyer *et al.* 2002) y humanos (Hartshorne *et al.* 2009) es posible observar folículos en crecimiento durante el periodo prenatal, llegando incluso a formarse folículos antrales. Todos estos folículos en crecimiento experimentarán atresia ya que no encontrarán el soporte hormonal necesario para continuar su crecimiento y maduración (Ebling 2005).

El desarrollo que sigue al periodo de ensamblaje folicular y que se extiende hasta la pubertad, permitirá el crecimiento y maduración del ovario acompañado de importantes cambios en la dinámica neuroendócrina del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Los cambios que caracterizan este desarrollo en la rata han permitido reconocer cinco periodos, caracterizados por importantes cambios en la morfología del ovario y en la funcionalidad del sistema hipotálamo-hipofiso-gonadal. Estos estadios incluyen el periodo neonatal (días postnatal (DPN) 0 a 7), infantil (DPN 8 a 20), juvenil (DPN 21 a 32), peripuberal (DPN 33 a 37) y puberal (DPN 38 a 46) (Ojeda *et al.* 1980). Los principales cambios se resumen en la Fig. 2. Estos periodos presentan una leve correlación con estadios similares del desarrollo en humanos (Beckman & Feuston 2003).

**Figura 2** – Maduración del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal de la rata



Representación gráfica de los cambios endocrinológicos que ocurren durante el desarrollo normal de la rata hembra desde el nacimiento hasta el periodo puberal. Tomado de Picut, 2014.

Durante el periodo neonatal en el ovario se forman los folículos primordiales, que se localizan en la corteza más periférica, mientras que algunos de los folículos más cercanos a la zona medular empiezan a crecer, transformándose en folículos primarios y secundarios. Durante este periodo, el ovario es independiente del sistema hipotálamo-hipofisario, y el pasaje de los folículos primordiales al pool de crecimiento es controlado por factores parácrinos producidos por el ovocito, las células granulosas y estromales trabajando en compleja sincronía.

En el periodo infantil temprano, el sector más central del ovario se expande por el desarrollo de numerosos folículos secundarios (preantrales), haciendo que los folículos primordiales queden limitados a un delgado borde en la periferia del ovario. Alrededor del DPN 10 se desarrollan los primeros folículos antrales. Los folículos preantrales de este periodo se caracterizan por su aspecto “inmaduro”, presentando uniones laxas entre las células granulosas y entre éstas y el ovocito, sin desarrollo de la zona pelúcida. La expansión del estroma intersticial durante este periodo permite una separación física entre los folículos en crecimiento. A partir del DPN 15, las células granulosas comienzan a desarrollar fuertes uniones

entre ellas y el ovocito, y las células tecales se organizan en una capa tecal definida, presentando un aspecto más parecido a los folículos secundarios del animal adulto. A esto se suma la aparición de una zona pelúcida en los folículos más desarrollados. Folículos antrales de gran tamaño pueden comenzar a verse desde el DPN21, pero a diferencia de los preovulatorios que aparecen después de la pubertad, éstos se localizan en la profundidad de la médula ovárica.

La característica más llamativa del periodo juvenil es la atresia de muchos de los folículos preantrales y antrales que alcanzaron mayor desarrollo. Estos folículos atrésicos, caracterizados por los acúmulos de células granulosas apoptóticas se localizan mayormente en la región medular, y se ven acompañados de un desarrollo continuo de folículos antrales pequeños en la corteza. A medida que el proceso de atresia se generaliza, comienza gradualmente a incrementarse el intersticio glandular.

Durante el periodo peripuberal aparecen los primeros folículos preovulatorios en la corteza externa, y una distribución balanceada de folículos secundarios y antrales de varios tamaños a la vez que disminuye la proporción de folículos atrésicos que caracterizaron al periodo juvenil y que pasan a formar parte de la glándula intersticial.

El periodo puberal comienza con la ovulación de los folículos de mayor tamaño y la formación de los primeros cuerpos lúteos. Durante el primer ciclo, aparecen un número variable de 2 a 5 cuerpos lúteos por ovario, número que va aumentando a medida que se suceden los ciclos, debido a que la regresión de los cuerpos lúteos es un proceso lento, que lleva más de un ciclo estral (Picut *et al.* 2014a, Picut *et al.* 2014b).

- **Andrógenos y sus receptores**

Los andrógenos son hormonas esteroideas derivadas del colesterol sintetizadas en el tejido endócrino, que ejercen múltiples funciones tanto en machos como en hembras. Las más conocidas y notorias se refieren al sexo masculino donde su función principal es estimular el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos. En el macho son producidos fundamentalmente por las células de Leydig testiculares y estimulan la espermatogénesis, el desarrollo del tracto genital

masculino y sus glándulas accesorias. Actúan también sobre el sistema hipotálamo-hipofisario, controlando la secreción de gonadotrofinas hipofisarias, y por lo tanto regulando su propia secreción. La testosterona circula tanto en su forma libre como unida a proteínas (albúmina y globulina de unión a las hormonas esteroides sexuales (SHBG)) cuyos niveles son importantes determinantes de la concentración de testosterona libre (Smith & Walker 2014, Murashima *et al.* 2015). En las hembras son fundamentales para la síntesis de estradiol y en la regulación del desarrollo folicular y la fertilidad. Clásicamente han sido considerados perjudiciales para la función ovárica y frecuentemente asociados con infertilidad. Actualmente es aceptada la existencia de un balance crítico entre la esencialidad de los andrógenos para el desarrollo folicular normal y sus efectos perjudiciales en condiciones hiperandrogénicas al regular la fertilidad de la hembra (Prizant *et al.* 2014). Mientras que el exceso de andrógenos facilitaría el desarrollo anormal de los folículos y la presencia de ovarios poliquísticos, los bajos niveles de andrógenos se asocian con una escasa reserva ovocitaria e insuficiencia ovárica, impactando negativamente en la fertilidad femenina (Gleicher *et al.* 2011). En las hembras de los mamíferos, las principales fuentes de andrógenos son las glándulas adrenales y los ovarios. La zona reticular de la corteza adrenal produce mayormente dehidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de DHEA y androstenediona (Goodarzi *et al.* 2015), esteroides sin actividad androgénica directa, mientras que las células de la teca interna folicular de los ovarios producen androstenediona y testosterona (Drummond 2006). Dependiendo de la disponibilidad de enzimas esteroidogénicas en los órganos blanco, estos esteroides pueden ser convertidos a testosterona, 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) o estradiol. La DHT es un andrógeno mucho más potente que la testosterona, producto de su transformación mediada por la enzima 5 $\alpha$ -reductasa (Marchetti & Barth 2013) (Fig. 3).

Tanto la testosterona como la DHT son los únicos esteroides que pueden unirse y activar al receptor de andrógenos (RA). Este actúa como un factor de transcripción y pertenece a la superfamilia de receptores nucleares. Esta superfamilia incluye a un gran número de factores de transcripción relacionados evolutivamente, y que regulan programas involucrados en un amplio espectro de fenómenos fisiológicos. Dado el papel esencial de estos receptores en todos los aspectos del desarrollo,

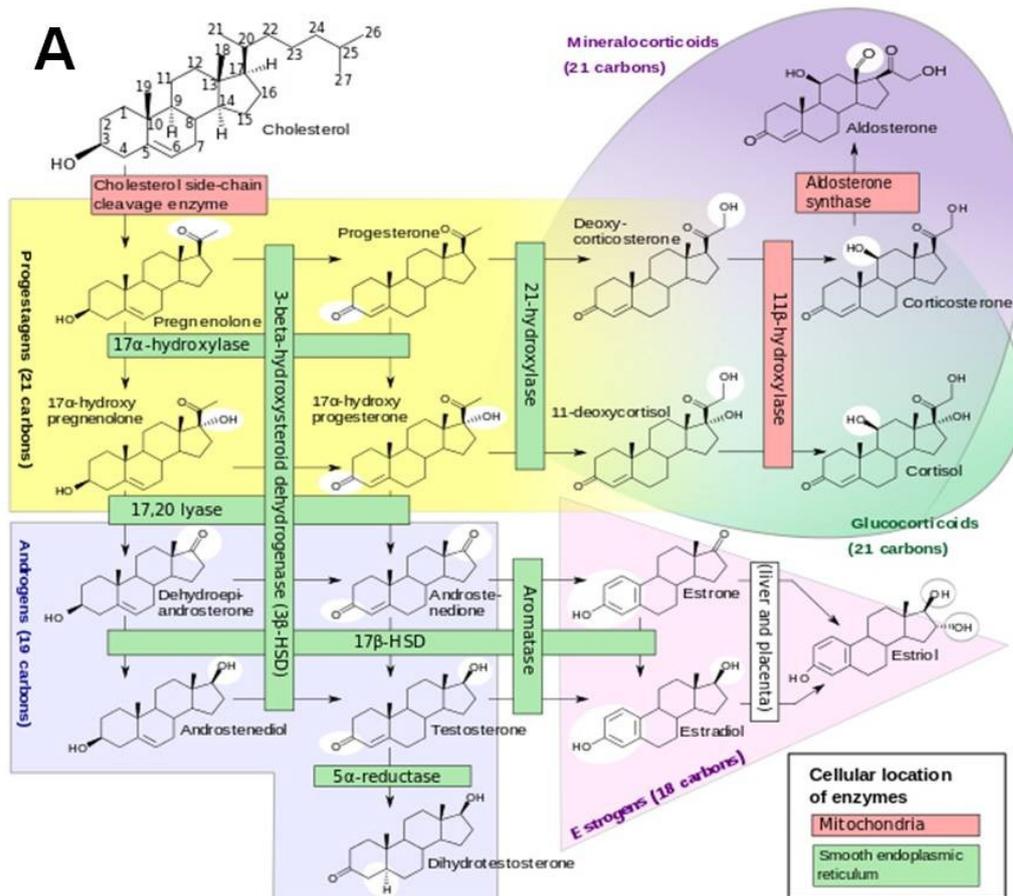
metabolismo y fisiología, la disfunción de ellos se asocia con enfermedades reproductivas, proliferativas y metabólicas. Dicha familia incluye receptores para moléculas hidrofóbicas como las hormonas esteroideas (estrógenos, progestágenos, andrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, vitamina D3, ácidos biliares), ácidos retinoicos, hormonas tiroideas, ácidos grasos, leucotrienos y prostaglandinas (Germain *et al.* 2006).

La unión de los andrógenos al receptor permite la traslocación al núcleo celular, la formación de homodímeros y la interacción con el ADN en las regiones regulatorias de los genes blanco, es decir aquellos genes que presentan elementos de respuesta a los andrógenos (androgen-response elements o AREs). Esto permite el reclutamiento de cofactores esenciales y el ensamblaje de la maquinaria transcripcional requerida para regular la expresión de estos genes (Matsumoto *et al.* 2008) (Fig. 4).

En menor medida, los andrógenos pueden también influir indirectamente en la expresión de genes carentes de AREs, involucrando modulaciones en la expresión o actividad de factores de transcripción secundarios, la producción de factores de crecimiento que actúan en forma parácrina o autócrina, o cambios en la expresión de otras hormonas. Además, se han descrito mecanismos de acción no genómicos, involucrando procesos rápidos, no transcripcionales, mediados probablemente por receptores de membrana, pero no han sido completamente caracterizados (Foradori *et al.* 2008). La testosterona puede también actuar sobre los receptores estrogénicos, dependiendo de la presencia de la enzima aromatasa que la convierte en estradiol. La DHT en cambio es un andrógeno no aromatizable, y actúa únicamente sobre los receptores de andrógenos (Burger 2002).

Aunque generalmente el RA posee una localización nuclear, se han detectado tipos celulares donde se muestra una localización citoplásmica previa a la unión al ligando (Kumar *et al.* 2006). Antes de la traslocación nuclear, el RA unido a su ligando tiene efectos biológicos, principalmente efectos inhibitorios sobre el proceso de muerte celular. Sin embargo, estos efectos son de relativa baja magnitud comparados con los profundos efectos inducidos sobre el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular que tiene lugar cuando el RA activado ingresa al núcleo celular (Gelman 2002).

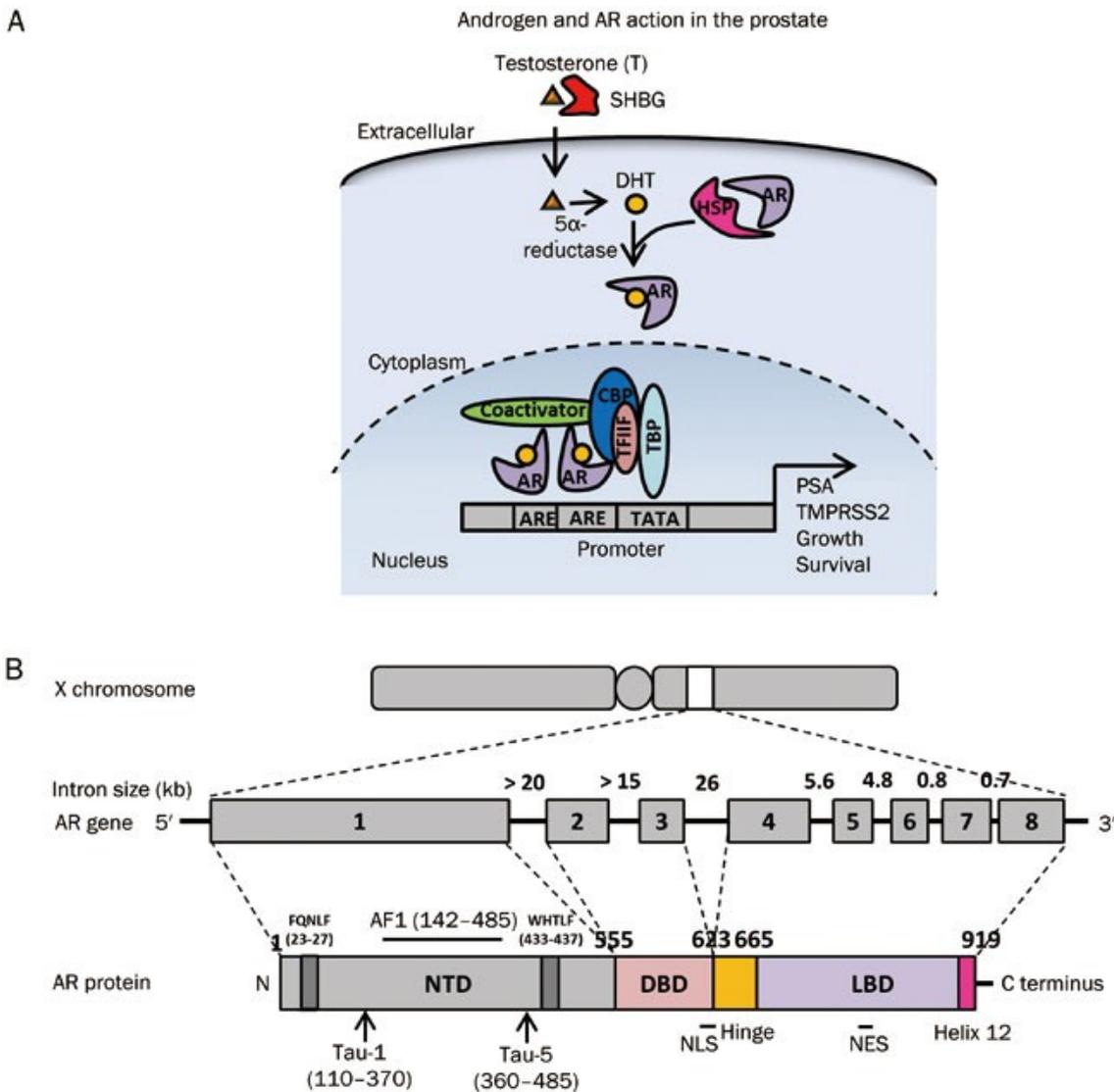
**Figura 3.- Esteroidogénesis**



Esquema general de la esteroidogénesis, con sus enzimas y moléculas intermediarias.

Tomado de Häggström M, Richfield D (2014). Wikiversity Journal of Medicine 1 (1)

**Figura 4.- Receptor de andrógenos.**



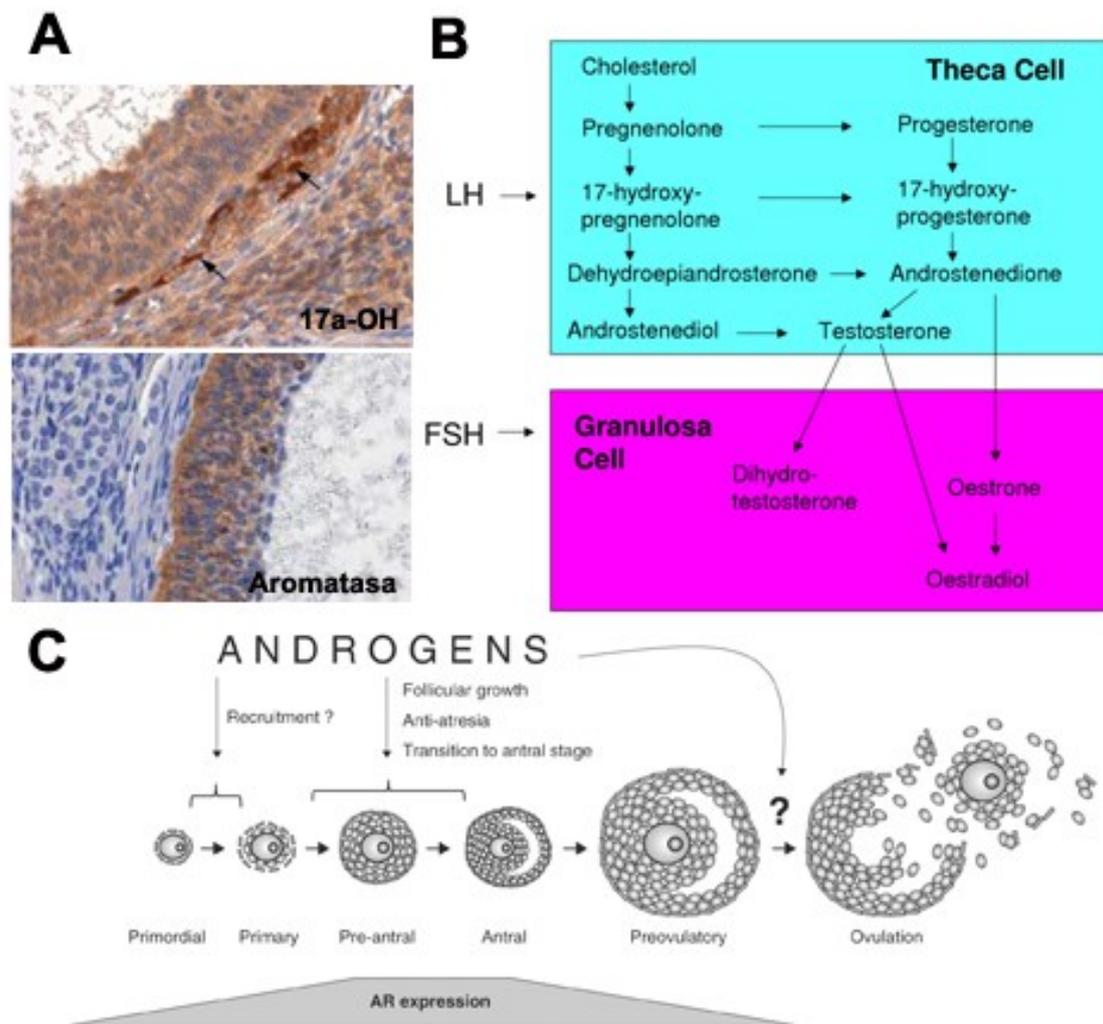
**A-** Esquema general de la vía de señalización por andrógenos. **B-** Localización cromosómica, organización genómica del gen y dominios funcionales de la proteína correspondiente al receptor de andrógenos.

Tomado de Tan, 2015

Estudios de **expresión e inmunolocalización del RA en ovarios de rata adulta** han mostrado que la expresión del RA es casi nula en las células tecales y luteales, siendo expresado por las células intersticiales y las células granulosas de los folículos preantrales y antrales tempranos. En todos los casos la expresión es nuclear. A medida que el folículo antral crece, la expresión del RA disminuye paulatinamente (Tetsuka *et al.* 1995, Pelletier *et al.* 2000). Resultados similares han sido reportados en otras especies de mamíferos (Hild-Petito *et al.* 1991, Hillier

*et al.* 1997, Juengel *et al.* 2006), incluso en humanos (Rice *et al.* 2007). La disminución en la expresión del RA a medida que el folículo antral crece está asociada a un incremento en la expresión de la enzima aromatasa, por lo que su expresión podría estar en parte regulada por la FSH. Esta regulación diferencial contribuye a la diferenciación del folículo a un estadio maduro preovulatorio y muestra a los andrógenos producidos por las células teca como moduladores parácrinos de la función de las células granulosas (Tetsuka & Hillier 1997). (Fig. 5)

**Figura 5.- Ovario y andrógenos**



**A** - Detección inmunohistoquímica de enzimas clave en la esteroidogénesis en el folículo ovárico. La enzima 17 alfa hidroxilasa (17a-OH) es expresada en las células de la teca interna, mientras que la aromatasa se expresa en las células de la capa granulosa. **B** - Esquema de la vía esteroidogénica en el folículo ovárico. **C** - Acciones fisiológicas de los andrógenos durante el desarrollo folicular

A - Modificado de Tyndall et al, 2012.

B - Tomado de Drummond, 2006.

C - Tomado de Prizant et al, 2014

La importancia de la señalización por andrógenos en el funcionamiento del ovario fue puesta en evidencia en los modelos de ratón knock-out para el RA (ratones ARKO). Las hembras ARKO son subfértiles, presenta ciclos estrales más largos, mayor proporción de folículos atrésicos y bajo número de cuerpos lúteos, lo que se traduce en bajos niveles de progesterona circulante y un menor número de crías por parto (Hu *et al.* 2004). Estudios más recientes agregan alteraciones a nivel del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, comprometiendo fundamentalmente el feedback positivo para estrógenos y afectando la cascada de control intrahipotalámico de kisspeptina-GnRH-LH (Yan *et al.* 2014). La generación de ratones ARKO específicos de células de la granulosa ha permitido evidenciar que casi todos los fenotipos reproductivos observados en los ratones ARKO pueden ser explicados por la carencia de RA en las células de la granulosa, y reafirman la idea de que los RA son fundamentales para el crecimiento folicular en la etapa preantral y en la prevención de la atresia folicular (Sen & Hammes 2010).

Los datos acerca de la **expresión de RA durante el desarrollo del ovario** son más escasos y el papel de los andrógenos en este periodo es menos claro. El estudio ontogénico durante el desarrollo del ovario de rata realizado por Galas *et al.* (2012) muestra que el RA está presente en el citoplasma de los ovocitos localizados dentro de los cordones ovígeros, desde el primer día de vida postnatal. Durante la segunda semana de vida, una vez formada la población folicular, la inmunoreactividad citoplasmática de los ovocitos disminuye, apareciendo una marca nuclear en los ovocitos de los folículos en crecimiento. Con respecto a las células somáticas, solo las células del epitelio superficial muestran inmunoreactividad para el RA durante la primera semana de vida. A partir de los 10 días de vida postnatal ya se reconoce la presencia de RA en las células granulosas de los folículos preantrales y en los antrales pequeños. Algunas células estromales presentan inmunoreactividad para RA, pero ésta es escasa en las células de la teca y el intersticio. Los folículos preovulatorios encontrados desde el día 30 posnatal poseen RA solo en las células del cumulus oophorus y las granulosas más cercanas a la cavidad antral.

Estudios en ovarios fetales de ovinos (Juengel *et al.* 2006) han mostrado la expresión de AR en el epitelio superficial de la gónada, así como en algunas células

estromales y en las células germinales ubicadas dentro de los cordones ovígeros a los 70 días de gestación (un periodo similar a la primera semana de vida postnatal de la rata). Estudios inmunohistoquímicos en gónadas humanas muestran que durante las semanas de diferenciación gonadal (8-11 semanas) tanto ovarios como testículos de 9 semanas de gestación expresan el RA (Sajjad *et al.* 2004). Sin embargo, otros estudios muestran el comienzo de la expresión del RA en etapas más avanzadas de la gestación (Fowler *et al.* 2011). El RA se expresa en células somáticas de los tabiques mesenquimales localizados entre los cordones ovígeros, no detectándose su presencia en las células germinales ni entre las células somáticas ubicadas dentro de estos grupos. La expresión de RA aumenta a medida que la gestación avanza.

*Estas evidencias ponen de manifiesto que los andrógenos pueden interferir en la señalización intracelular entre las células somáticas y germinales durante el periodo de ensamblaje folicular y afectar el desarrollo normal del ovario. Las injurias que ocurren durante el periodo del ensamblaje folicular pueden causar alteraciones en el funcionamiento gonadal durante la vida reproductiva, llevando a condiciones patológicas como poliquistosis ovárica o falla ovárica prematura.*

- **Síndrome de ovario poliquístico**

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es el desorden endócrino más frecuente en mujeres en edad reproductiva (5-20% según diferentes estudios)(Lauritsen *et al.* 2014). Fue descrito originalmente como una alteración del ovario asociada a hiperandrogenismo, amenorrea e hirsutismo (Stein & Leventhal 1935), por lo que el ovario fue indicado como la principal causa del síndrome. Sin embargo, el descubrimiento de su frecuente asociación con hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (Dunaif *et al.* 1989) le quitó protagonismo al ovario como causa principal y también como criterio diagnóstico, mostrando a este síndrome como una entidad multisistémica.

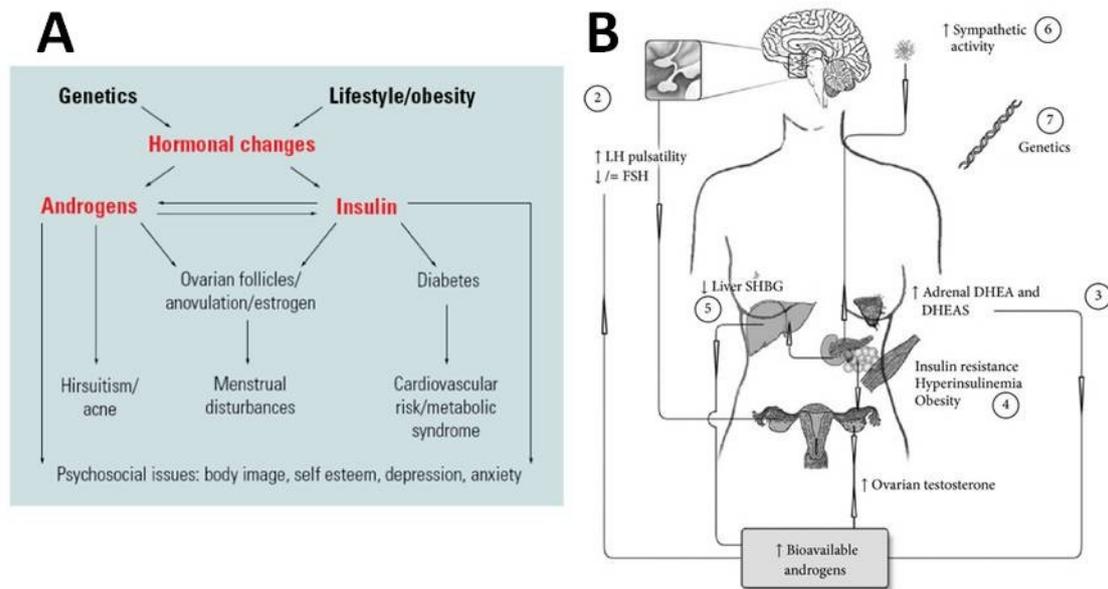
A pesar de su alta incidencia, las causas del SOP siguen sin esclarecerse. Clásicamente ha sido considerado como una patología endócrina vinculada a la reproducción, cuyas manifestaciones aparecían durante la pubertad y se extendían

hasta la menopausia. Su asociación con alteraciones metabólicas muestra que esta patología se extiende más allá de la menopausia, donde se vuelven preponderantes las alteraciones metabólicas y cardiovasculares.

Este síndrome se caracteriza por la presencia de numerosos folículos antrales que no sobrepasan los 10 mm de diámetro, dispuestos en la periferia del ovario a modo de “collar de perlas”, sin la presencia de un folículo dominante. Estos cambios podrían estar inducidos por efectos locales de los andrógenos, que aumentan la capacidad de respuesta de las células granulosa de los folículos antrales a la FSH. La alta producción de andrógenos puede tener un impacto significativo sobre la secreción alterada de gonadotropinas característica del SOP. Además, las mujeres afectadas de SOP, hiperinsulinemia o sobrepeso presentan concentraciones bajas de la globulina fijadora de hormonas esteroideas (SHBG – Steroid Hormone Binding Globulin) producida por el hígado lo que incrementa la disponibilidad tisular de los andrógenos (Nestler *et al.* 1991). En el SOP, todas estas condiciones pueden coexistir simultáneamente, amplificando las manifestaciones clínicas de la producción excesiva de andrógenos. La hiperandrogenemia es también la causa principal de la hipertrofia de los adipocitos y del desarrollo de un estadio pro-inflamatorio (Spritzer *et al.* 2015) que contribuye al mantenimiento del síndrome. El papel de la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia como causa primaria del SOP no ha sido demostrado, sin embargo las evidencias sugieren que la hiperinsulinemia puede perpetuar las alteraciones en las funciones reproductiva y metabólica que caracterizan a este síndrome (Gambineri *et al.* 2012).

*El SOP se caracteriza por una alta diversidad de manifestaciones clínicas y variaciones entre los individuos, lo que ha impedido la expresión de un concepto unificador que permita explicar su patogenia; las evidencias apuntan a un rol crucial del exceso de andrógenos en la génesis y perpetuación de este síndrome (Fig. 6).*

**Figura 6 – Síndrome de ovario poliquístico (SOP).**



**A** – Resumen de la etiología y características clínicas del SOP. **B** - Fisiopatología del SOP. La hiperandrogenemia de origen ovárico altera la secreción pulsátil de LH (2). La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia facilitan la producción de andrógenos (4) además de disminuir la producción hepática de SHBG (5), aumentando así la disponibilidad de andrógenos. Los altos niveles de andrógenos, la resistencia a la insulina y la obesidad están asociados a un incremento de la actividad simpática (6). Alteraciones genéticas probablemente también contribuyan a la patología del SOP (7).

A - Tomado de Teede et al, 2010.

B - Tomado de Johansson and Stener-Victorin, 2013.

- **La programación del desarrollo y el ovario**

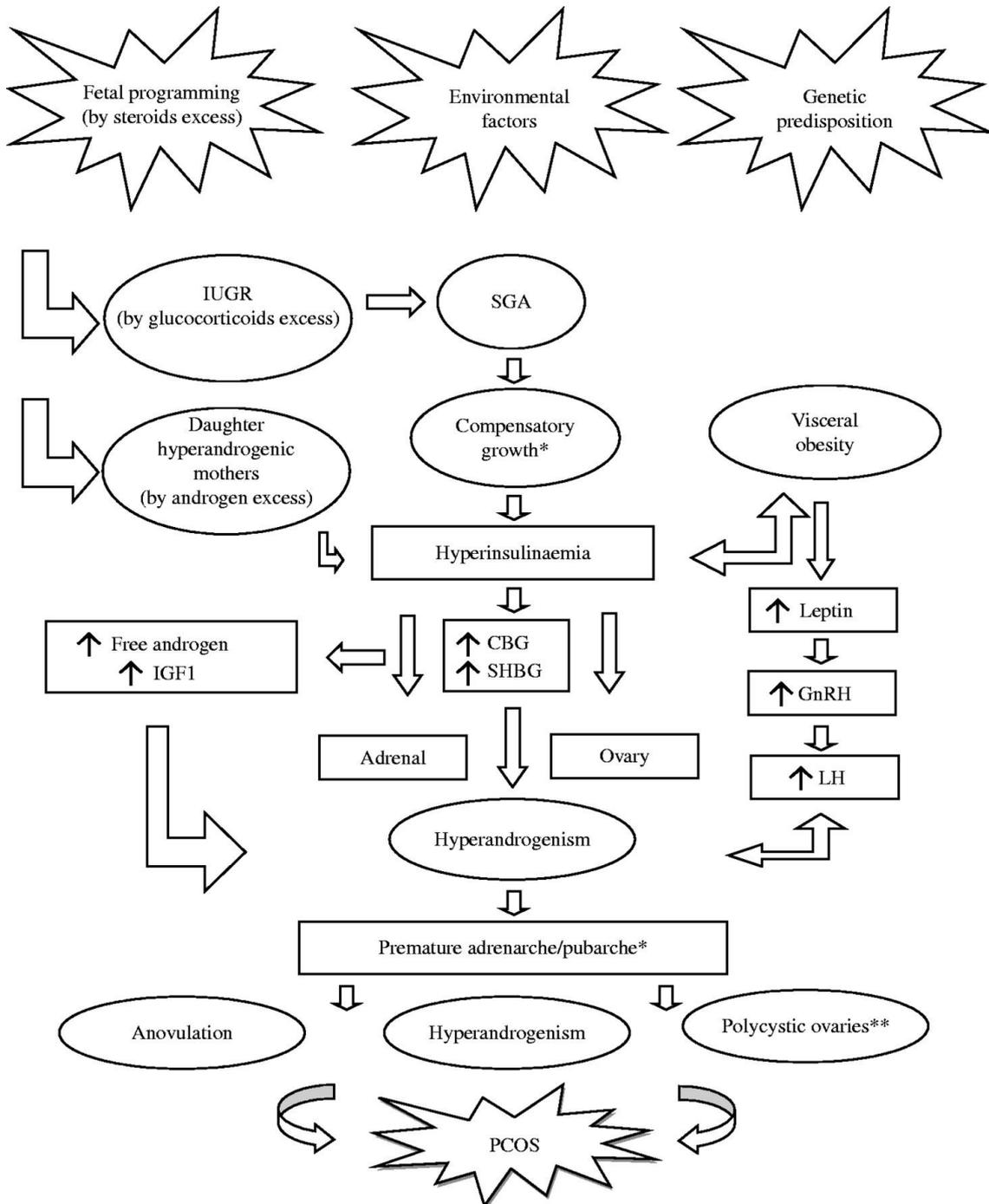
El concepto de “programación del desarrollo” puede ser definido como una respuesta a un desafío crítico del organismo (cambios en el medio nutricional u hormonal) durante una ventana específica del desarrollo fetal o infantil que altera la expresión del genoma del individuo con efectos persistentes en el fenotipo y predisposición a enfermedades futuras. Este concepto fue propuesto por Barker a fines de los 80 (revisado en Barker & Clark (1997)). Los cambios programados en la estructura y función pueden incluir alteraciones en el número de células que forman parte de un órgano, cambios en la distribución de los tipos celulares y en la estructura del órgano, o incluso alteración en la retroalimentación hormonal. De acuerdo a esta hipótesis, el ambiente durante el crecimiento fetal y la infancia

marcan en forma permanente (“programan”) el metabolismo y crecimiento, determinando las patologías del adulto. Han sido reportadas varias asociaciones entre algunas características presentes al nacimiento y alteraciones desarrolladas durante la vida adulta como ser la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico (Godfrey & Barker 2001, Iliadou *et al.* 2004). Dado que la resistencia a la insulina esta comúnmente asociada a SOP, este síndrome podría tener también orígenes fetales. Varios estudios han mostrado asociaciones entre alteraciones del crecimiento fetal y el desarrollo posterior de diferentes signos y síntomas del SOP. La pubarquia precoz, el hiperinsulinismo y el hiperandrogenismo de origen ovárico se asocian con restricciones del crecimiento prenatal (Ibáñez *et al.* 1998). Alteraciones en el peso al nacimiento se ha vinculado con la presencia de hiperandrogenismo en la vida adulta (Davies *et al.* 2012).

Alteraciones vinculadas al SOP detectables durante la infancia, han permitido postular que su origen puede ser programado durante el desarrollo fetal o la existencia de una base genética (Crosignani & Nicolosi 2001). Estudios experimentales y clínicos han mostrado alteraciones en la reserva folicular, en la tasa ovulatoria y en la edad de ocurrencia de la pubertad asociadas a eventos adversos de ocurrencia temprana (Connor *et al.* 2012). La restricción del crecimiento intrauterino puede desencadenar una hiperactividad del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal con incremento de la síntesis de glucocorticoides y secundariamente hiperandrogenismo por hiperactividad adrenal. Este exceso de andrógenos puede alterar la expresión génica por alteraciones de la metilación del ADN (modificaciones epigenéticas) favoreciendo el desarrollo de fenotipos metabólicos y/o reproductivos del SOP (Padmanabhan & Veiga-Lopez 2011, Xu *et al.* 2011, de Melo *et al.* 2015) (Fig. 7).

*Alteraciones ováricas en el adulto podrían ser explicadas por influencia de eventos tempranos del desarrollo, actuando en particular sobre el pool de folículos primordiales que se forma y establece durante dicho periodo.*

**Figura 7 - Factores intrauterinos que pueden programar un funcionamiento anormal del ovario durante la vida adulta.**



Niñas diagnosticadas con retraso del crecimiento intrauterino (IUGR) y las hijas de madres con SOP representan pacientes con posibles programaciones del desarrollo por exceso de esteroides que pueden llevar al desarrollo de SOP durante la edad reproductiva. Tomado de de Melo, 2015.

La androgenización prenatal es una fuerte hipótesis de la posible causa del SOP, está basada en resultados obtenidos en modelos animales (monas, ovejas y roedores) en los que la androgenización materna durante la gestación induce la presencia de varias de las características del SOP en la descendencia (Abbott *et al.* 2005, Amalfi *et al.* 2012, Padmanabhan *et al.* 2014). En humanos se ha mostrado la existencia de altas concentraciones plasmáticas de andrógenos durante la gestación en mujeres portadoras de SOP, originando la posibilidad de una programación fetal inducida por androgenización prenatal (Sir-Petermann *et al.* 2002). Estudios posteriores evidenciaron que las hijas de estas mujeres mostraron alteraciones metabólicas y reproductivas vinculadas al desarrollo del SOP dando fuerza a la hipótesis de un posible efecto inductor de la hiperandrogenemia fetal (Sir-Petermann *et al.* 2007, Sir-Petermann *et al.* 2012).

Además, estudios epidemiológicos sugieren que el SOP se presenta preferentemente en algunas familias, por lo que se ha postulado una base genética para la enfermedad. Apoyan esta hipótesis el hecho de que los hermanos y hermanas de mujeres diagnosticadas con SOP muestran alteraciones en las concentraciones plasmáticas de andrógenos (Legro *et al.* 1998). Por otra parte, las características funcionales de las células tecaes *in vitro* provenientes de pacientes con SOP muestran una actividad de síntesis de andrógenos incrementada, siendo consistentes con los hallazgos en estudios familiares, e indicando un control genético de la producción de andrógenos (Nelson *et al.* 1999). Actualmente se han identificado algunos genes que participan en el control de la expresión de la enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa, enzima clave en la síntesis de andrógenos, y que se encuentran sobreexpresados en células tecaes de pacientes con SOP (genes involucrados en la síntesis y/o señalización de ácido retinoico, genes que participan en la vía de señalización Wnt, y el factor de transcripción GATA6) pudiendo entonces impactar sobre la función esteroidogénica de las células tecaes (Wood *et al.* 2003). La estabilidad de los transcritos de ARNm de algunos de estos genes también parece estar aumentada cuando se compara con los producidos por células tecaes de pacientes sanas (Wickenheisser *et al.* 2012). Sin embargo, el efecto que la expresión alterada de estos genes pueda tener sobre la paciente para

inducir un fenotipo SOP, así como el modo de herencia no han podido ser determinados en forma concluyente. Un estudio genético reciente demostró que la heterogeneidad en la presentación clínica del SOP puede estar asociada a expresiones génicas diferenciales, ya que las mujeres obesas portadoras de SOP presentaron expresión disminuida del receptor de insulina en el tejido adiposo, resultando en resistencia a la insulina, mientras que las mujeres no obesas portadoras de SOP presentaron un incremento en la expresión del receptor para LH, pudiendo ambas alteraciones conducir a una producción aumentada de andrógenos desde el ovario pero con manifestaciones diferentes (Jones *et al.* 2015).

*El SOP es una enfermedad multifactorial, en la cual la susceptibilidad individual es determinada por factores tanto genéticos como ambientales. La mayoría de las evidencias sugieren que la producción excesiva de andrógenos sería esencial en la etiopatogenia de este síndrome (Teede *et al.* 2010).*

- **Inervación simpática y funcionamiento del ovario**

Diversos estudios han postulado que un incremento en la actividad nerviosa simpática podría estar asociada con el desarrollo de SOP (Sverrisdóttir *et al.* 2008, Lansdown & Rees 2012) y varios modelos animales validan su implicancia (Lara *et al.* 1993, Dissen *et al.* 2009).

El papel de la inervación sobre el funcionamiento ovárico de los mamíferos ha sido sujeto de mucha controversia. Múltiples estudios han mostrado la presencia de nervios motores y sensitivos en el ovario, pero su rol específico es incierto. Ahora es sabido que múltiples influencias originadas localmente y mediadas por factores de crecimiento y neurotransmisores juegan un papel central en el control del desarrollo y fisiología del ovario. Estas señales, junto con las gonadotrofinas hipofisarias, forman parte del denominado "complejo estimulador neuroendocrino", un término acuñado para describir el conjunto de numerosos factores que intervienen en forma orquestada regulando la función gonadal (Ojeda y cols, 1996).

La inervación extrínseca que llega al ovario incluye fibras sensitivas, vagales, simpáticas y peptidérgicas. El componente simpático ha sido asociado con alteraciones funcionales relevantes del ovario. Este componente se origina de los segmentos espinales torácicos caudales y lumbares. En las ratas, sus fibras se distribuyen principalmente por dos vías, el nervio ovárico superior y el plexo ovárico. Las fibras nerviosas del plexo ovárico se asocian mayormente con las estructuras vasculares, mientras que las fibras que forman el nervio ovárico superior se asocian con el tejido intersticial y la pared folicular. No hay fibras nerviosas que ingresen a la capa granulosa ni a los cuerpos lúteos (Burden & Lawrence 1978, Burden *et al.* 1983, Dees *et al.* 1986, Klein & Burden 1988). La distribución de las fibras simpáticas en el ovario humano es similar a la descrita en los roedores (Heider *et al.* 2001). Sumada a la inervación extrínseca, existen varios reportes indicando la existencia de una población de neuronas intrínsecas gonadales (Winterhalter, 1896, Dees *et al.* 1995, D'Albora & Barcia 1996, D'Albora *et al.* 2000, Anesetti *et al.* 2001).

Diferentes estudios han asignado funciones variadas a la inervación simpática tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Se ha demostrado su papel en la adquisición de capacidad de respuesta a las gonadotropinas al comienzo de la maduración ovárica (Mayerhofer *et al.* 1997), la interacción cíclica regular con la unidad hipotálamo-hipofisaria durante el ciclo estral (Lara *et al.* 2002) y la regulación de la síntesis de esteroides (Ahmed *et al.* 1986, Chavez & Dominguez 1994, Delgado *et al.* 2004, Sosa *et al.* 2004). Algunos estudios han mostrado su asociación con el SOP, ya sea tanto en humanos (Heider *et al.* 2001, Wojtkiewicz *et al.* 2014) como en modelos animales (Barria *et al.* 1993, Lara *et al.* 2002, Dorfman *et al.* 2003, Greiner *et al.* 2005), aunque su relevancia en la generación y/o mantenimiento de la condición poliquística no es totalmente clara.

Por otra parte, múltiples estudios muestran una importante asociación entre los componentes neurales relacionados al ovario y las hormonas esteroideas. Estas, en particular los estrógenos, son capaces de alterar la densidad de inervación simpática del ovario (Shinohara *et al.* 1998, Shinohara *et al.* 2000, Anesetti *et al.* 2009) o modificar el crecimiento folicular (Lara *et al.* 2002, Delgado *et al.* 2004, Vega Orozco *et al.* 2012) llevando a una condición poliquística similar a la presente en los ovarios de mujeres portadoras de SOP. Además, varios estudios han

demostrado que la mayor parte de los cambios inducidos por el tratamiento hormonal pueden ser revertidos por la resección del nervio ovárico superior, lo cual indica que, al menos en parte, dichas alteraciones están mediadas por la inervación (Lara *et al.* 2002, Rosa *et al.* 2003).

Un hallazgo frecuente en pacientes portadores de SOP es el incremento significativo en la inervación simpática del ovario (Heider *et al.* 2001); una situación similar ocurre en modelos animales de ovario poliquístico inducidos por esteroides (Barria *et al.* 1993, Rosa *et al.* 2003). Varios estudios en roedores demuestran que la denervación simpática restablece el funcionamiento cíclico del ovario (Rosa *et al.* 2003, Sotomayor-Zarate *et al.* 2008a, Morales-Ledesma *et al.* 2010). En pacientes portadores de SOP, el tratamiento quirúrgico con resección de una cuña de tejido ovárico o por “ovarian drilling” (que buscan destruir o remover cantidades significativas de estroma productor de hormona, y que probablemente incluye la eliminación de parte de la inervación) mejora la regularidad de los ciclos menstruales (Amer *et al.* 2002, Ott *et al.* 2010). Todos estos hallazgos marcan un papel relevante para la inervación simpática, en el desarrollo y/o mantenimiento de la condición poliquística del ovario.

## **JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Diferentes estudios han permitido postular a la exposición fetal a condiciones de hiperandrogenismo como un posible inductor de modificaciones del normal desarrollo del folículo ovárico, programando al organismo fetal a un desarrollo de alteraciones reproductivas y/o metabólicas durante la vida adulta.

**La etapa del ensamblaje folicular es crucial para determinar el desarrollo posterior de los folículos ováricos, y una señalización esteroidea inadecuada actuando en ese momento podría generar condiciones irreversibles que afectan este desarrollo.**

Teniendo en cuenta que la presencia del RA ha sido descrito en el ovario neonatal (Galas *et al.* 2012), y tanto el receptor de estrógeno alfa (Sar & Welsch 1999) como la actividad aromatasa (George & Ojeda 1982) han sido reportados a esta edad, **planteamos que la severidad del tratamiento androgénico se encuentra relacionada con la capacidad del esteroide de activar solo los RA o además los receptores estrogénicos.**

**Proponemos que la hiperandrogenización neonatal es capaz de inducir cambios en el crecimiento del folículo ovárico, lo que induciría su condición de quístico durante la vida adulta. El proceso de crecimiento alterado del folículo estaría asociado a cambios en la densidad de inervación catecolaminérgica del ovario y a la capacidad de aromatización del andrógeno involucrado.**

## **OBJETIVOS**

Con la finalidad de comprobar la hipótesis planteada, se estableció el siguiente **objetivo general:**

Caracterizar los efectos programadores de la exposición neonatal a andrógenos, uno aromatizable (testosterona) y otro no aromatizable (DHT), sobre el desarrollo y función del ovario de la rata a diferentes edades.

Con los siguientes **objetivos específicos**

1. Analizar el papel programador de los andrógenos neonatales sobre la función reproductiva.
2. Caracterizar los efectos de la androgenización neonatal sobre el crecimiento y maduración de la población folicular del ovario.
3. Estudiar los efectos de la androgenización neonatal sobre la inervación simpática del ovario.
4. Analizar si los efectos de la androgenización ocurren primariamente sobre el ovario, el sistema hipotálamo-hipofisario o ambos.
5. Comparar los efectos de dos andrógenos, uno aromatizable (testosterona) y otro no aromatizable (DHT) sobre la función ovárica.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Animales**

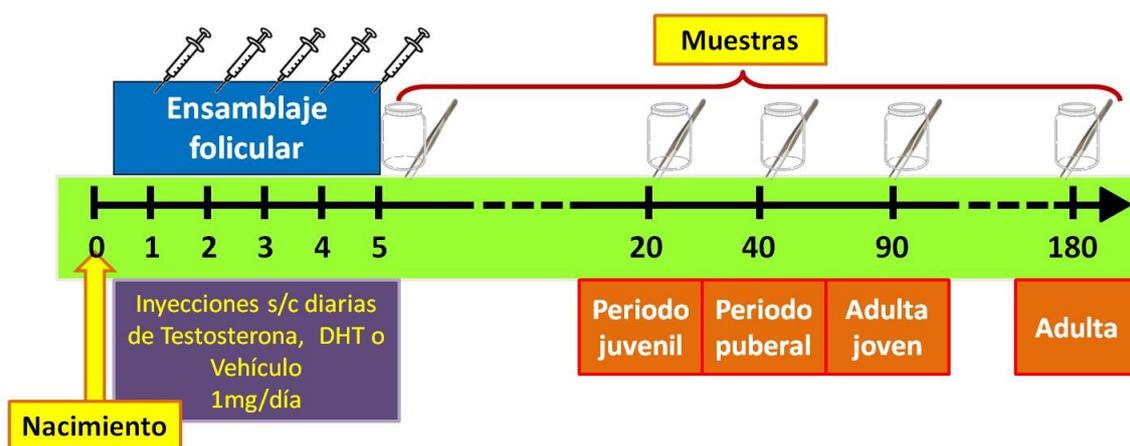
Se utilizaron ratas de la cepa Wistar provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina (URBE-UdelaR) (n=40 animales por grupo experimental). Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo las pautas aprobadas por la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA), Montevideo, Uruguay.

Grupos de ratas hembra adultas cíclicas se pusieron a cruzar con machos probados (2-3 hembras por macho) durante la noche del proestro, retirándose los machos al día siguiente. Las hembras preñadas, fueron colocadas en grupos de 6 animales por caja, con acceso libre a agua y comida, régimen de luz-oscuridad de 12/12hs y temperatura controlada ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Dos días previos a la fecha de parto se alojaron en forma individual, manteniendo las condiciones de alimentación y alojamiento durante el parto y toda la lactancia. El día del parto fue considerado como día 0. Al día 1 las camadas fueron ajustadas a 7 hembras y un macho por madre, realizando el tratamiento androgénico que se esquematiza en la figura 7.

### **Tratamiento con andrógenos**

El tratamiento androgénico se realizó durante el periodo de formación de los folículos primordiales (0 a 5DPN) (Sarraj y Drummond 2012) mediante inyecciones diarias de testosterona o DHT utilizando aceite de maní como vehículo. Se utilizaron compuestos de vida media corta para asumir que los efectos encontrados son inducidos específicamente en el período de administración. Para el tratamiento se utilizaron dosis diarias de 1 mg de testosterona o DHT en 50  $\mu\text{l}$  de aceite de maní inyectados en forma subcutánea (Sotomayor-Zárate y cols. 2011). Los animales del grupo control recibieron solo vehículo. Al finalizar el tratamiento, cuatro o cinco hembras de cada grupo se utilizaron para tomar muestras correspondientes a los 5DPN. Los machos fueron retirados el día del destete (20-21DPN) y las hembras fueron mantenidas hasta el momento del sacrificio en el periodo juvenil (20DPN), puberal (40DPN), adulta joven (90DPN) y adulta (180DPN).

**Figura 7.** Estrategia experimental – Toma de muestras



### Obtención y procesamiento de muestras

Al final de cada período experimental las hembras fueron pesadas y sacrificadas bajo anestesia profunda con una combinación de ketamina y xilazina a dosis de 100 mg/kg y 5 mg/kg respectivamente. Se registró la distancia anogenital mediante el uso de un calibre digital. Los animales cuyos órganos fueron utilizados para técnicas inmunohistoquímicas fueron fijados por perfusión intracardíaca con solución salina al 0.9% con la finalidad de lavar el árbol vascular, y posteriormente perfundidos en solución fresca de paraformaldehído al 4%. El resto de los animales (no perfundidos), luego de anestesiados fueron sacrificados por decapitación colectándose la sangre que se utilizó para las determinaciones hormonales. Se extrajeron ambos ovarios, el útero y la hipófisis que fueron pesados y rápidamente fijados por inmersión en líquido de Bouin o paraformaldehído al 4% y mantenidos en fijador por 24 hs.

### Histología

Las piezas luego de fijadas fueron transferidas a alcohol 70° y procesadas para su inclusión en parafina utilizando técnicas estándar, o crioprotegidas en sucrosa al 30% para luego obtener cortes a congelación. Los cortes en parafina (5  $\mu$ m de espesor), fueron utilizados para técnicas de inmunohistoquímica o para coloración topográfica con Hematoxilina y Eosina. Los cortes a congelación (30  $\mu$ m) se utilizaron para la detección inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa y cuantificación de fibras catecolaminérgicas.

### **Análisis de la población folicular**

Ovarios fijados en líquido de Bouin (al menos 3 de cada tratamiento y edad), fueron incluidos en parafina, cortados a 7  $\mu\text{m}$  en forma seriada y coloreados con Hematoxilina y Eosina. Cada quinto corte fue analizado utilizando un microscopio óptico Nikon Optiphot con un objetivo 20x, y todos los folículos en crecimiento conteniendo un ovocito con un núcleo y nucléolo claramente distinguible fueron contados y clasificados de acuerdo a Mazaud *et al.* (2002). Se analizó el número de folículos primordiales, preantrales (incluyendo primarios unilaminares y multilaminares), antrales sanos y atrésicos así como el de quistes foliculares. Los folículos primordiales fueron contados cada décimo corte. Éstos fueron caracterizados por un ovocito rodeado por una única capa de células foliculares aplanadas; los folículos primarios unilaminares se caracterizaron como aquellos que presentaban una única capa de células foliculares o granulosa cúbica; los folículos primarios multilaminares fueron aquellos que presentaban más de dos capas de células granulosa sin una cavidad antral reconocible mientras que los folículos antrales se contaron cuando el núcleo del ovocito estuvo presente. En los folículos antrales, se realizó la clasificación en sanos o atrésicos considerando la presencia de núcleos picnóticos en la capa granulosa, o alteraciones degenerativas del ovocito de acuerdo a los criterios de Osman (1985). Todas las estructuras foliculares caracterizadas por un antro de gran tamaño, la presencia de uno o más ovocitos, y una capa granulosa de grosor irregular con frecuentes figuras mitóticas fueron agrupadas como estructuras quísticas.

### **Morfometría**

El análisis morfométrico se realizó a partir de cortes de ovario de DPN90 de los grupos control, tratados con Testosterona o DHT. Se analizaron 3 o 4 ovarios de cada grupo, en cada ovario se fotografiaron al menos 20 folículos antrales sanos y todos los quistes presentes. Las fotografías se tomaron en los cortes de folículos o quistes donde se presentaba el núcleo del ovocito. Los diámetros promedio de cada ovocito, folículo o quiste así como el espesor promedio de las capas granulosa y tecal fueron determinados utilizando el programa Image J (versión Fiji 1.49p). Para ello se midieron los diámetros mayor y menor de cada ovocito, folículo o

quiste (de membrana basal a membrana basal, no incluyendo la capa tecal). El espesor de las capas granulosa y tecal fue medido en 3 o 4 puntos equidistantes alrededor del perímetro de cada folículo.

### **Inmunohistoquímica**

El procedimiento se realizó de acuerdo a protocolos ya utilizados en nuestro laboratorio (Anesetti y cols. 2009). Los cortes en parafina fueron desparafinados en xilol e hidratados en concentraciones decrecientes de etanol. Se realizó reactivación antigénica en buffer citrato 10mM en microondas y posterior inactivación de peroxidasas endógenas con solución de peróxido de hidrógeno al 3% en PBS. Los cortes fueron lavados, permeabilizados y bloqueados previo a su incubación durante 18-20 hs con los anticuerpos primarios correspondientes. Luego de lavados, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado, posteriormente con el complejo avidina-biotina-peroxidasa, y revelados utilizando diaminobencidina como cromógeno. Algunos cortes fueron ligeramente coloreados con hematoxilina, y luego deshidratados con etanol, clarificados y montados con DPX. Los controles negativos se realizaron reemplazando el anticuerpo primario por solución bloqueante, mientras que como controles positivos se incluyeron cortes de tejidos donde la presencia de los antígenos respectivos ha sido bien caracterizada.

En los casos en que se buscó la colocalización de dos antígenos, se utilizaron anticuerpos secundarios ligados a fluoróforos para su visualización por microscopía de fluorescencia convencional o confocal.

Cada inmuno-reacción se realizó por triplicado incluyendo animales pertenecientes a diferentes camadas. Se utilizó una batería de anticuerpos primarios contra distintos receptores y enzimas (Santa Cruz Biotech) (Tabla 1) para reconocer la presencia de:

**Tabla 1.** Elementos a ser detectados y anticuerpos utilizados

	Anticuerpo	Origen	Catálogo	dilución	Control positivo
<b>Receptores esteroideos</b>	Receptor de andrógenos (RA)	conejo	sc-816	1:300	Próstata

<b>Enzimas implicadas en síntesis de esteroides</b>	3-beta HSD (3β HSD)	cabra	sc-30820	1:400	Glándula adrenal
	17 alfa hidroxilasa (17αOH)	conejo	Sc-66850	1:200	Glándula adrenal
	Aromatasa	conejo	Sc-30086	1:50	Ovario en proestro
<b>Factores de crecimiento y sus receptores</b>	Factor de Crecimiento Nervioso (NGF)	conejo	Sc-549	1:250	Glándula salival
	Sustancia Inhibidora Mulleriana (MIS)	cabra	Sc-6886	1:300	Ovario Testículo
	Inhibina alfa	conejo	Sc-30146	1:300	Ovario Testículo

### **Demostración histoquímica de nervios simpáticos**

Las fibras simpáticas fueron evidenciadas por su contenido de noradrenalina utilizando la técnica del ácido glioxílico (de la Torre & Surgeon 1976). Para ello los ovarios fueron rápidamente congelados sin fijar y cortados en criostato. Los cortes (30 μm de espesor) fueron levantados sobre portaobjetos, inmersos por 5 segundos en una solución de ácido glioxílico, secados al aire y calentados a 95°C durante 5 minutos cubiertos con una gota de aceite mineral. Las preparaciones fueron examinadas en un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot equipado con un filtro violeta y luego fotografiadas con una cámara digital Nikon DS-2M adosada al microscopio. La especificidad de la reacción fue controlada mediante el uso de cortes de glándula adrenal, la que contiene células tanto positivas como negativas (medulares y corticales respectivamente).

### **Análisis de la densidad de inervación catecolaminérgica**

Cada décima sección de cada ovario tratado con la técnica del ácido glioxílico fue fotografiada en su totalidad utilizando un objetivo 10X, y analizado usando el programa ImageJ (National Institutes of Health, Version 1.49i; <http://imagej.nih.gov/ij/>).

El procedimiento se realizó de acuerdo a trabajos previos de nuestro laboratorio (Anesetti *et al.* 2009). Para lograr una mejor determinación, las imágenes fueron separadas en los canales rojo, verde y azul y convertidas a escala de grises. Solo se utilizaron las imágenes correspondientes al canal azul ya que fueron las que brindaron el mejor contraste entre la coloración y el fondo. Se utilizó una herramienta del programa ImageJ de análisis de imágenes (Treshold), que permite determinar automáticamente un umbral basado en el contraste y que filtra la imagen, generando una nueva de tipo binario que muestra los sectores de interés de color negro y el resto de la imagen en blanco. A partir de estas imágenes se determinó el área ocupada por las fibras en cada campo, dividiéndolas por el área total del campo microscópico. Considerando que varias estructuras del ovario carecen de inervación (cuerpos lúteos, capa granulosa y antro folicular), para la determinación de la densidad de inervación se utilizó el método del hot-spot (Weidner *et al.* 1991). Para ello se seleccionaron por corte de ovario los diez campos que mostraran la mayor densidad de fibras, calculándose la densidad media de inervación y expresándola como el área ocupada por las fibras (en  $\mu\text{m}^2$ ) por  $\text{mm}^2$  de ovario. Un total de 8 a 10 cortes por ovario fueron analizados.

Durante las primeras determinaciones se realizó una prueba comparando los resultados de densidad de fibras simpáticas obtenidos utilizando el método del ácido glioxílico con aquellos obtenidos mediante inmunofluorescencia para la tirosinohidroxilasa (Anticuerpo producido en conejo anti-tirosinohidroxilasa (TH), Sigma, 1:1000; #T8700), no encontrándose diferencias significativas entre ambos. Por dicha razón, se optó por la utilización del método del ácido glioxílico dada su simplicidad, rapidez y menor costo.

### **Denervación quirúrgica**

Animales de los grupos control y androgenizados de 20-25 días de edad fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (Vetanarcol®, Laboratorios König, Buenos Aires, Argentina) y xilazina (Sedomin®, Laboratorios König, Buenos Aires,

Argentina) a dosis de 100 mg/kg y 5 mg/kg respectivamente. Una vez anestesiados, los animales fueron rasurados y en condiciones de asepsia, y a través de una incisión en la piel dorsal se expusieron ambos ovarios, procediéndose a la sección del nervio ovárico superior como se describe en Chavez & Dominguez (1994). Una vez relocalizados los ovarios, se cerró la incisión en piel con cianocrilato y se permitió la recuperación de los animales. Se controló diariamente la apertura vaginal y se realizaron frotis vaginales a partir del día de apertura hasta el día 40-43 de vida postnatal. Otro grupo de animales se dejó hasta los 180 días.

### **Inducción de la ovulación**

Para inducir un pico preovulatorio de LH, ratas de 90 días fueron tratadas con una única inyección s/c de PMSG (30 UI/animal). Después de 56 hs, fueron inyectadas con una única dosis i/p de hCG (20 UI/animal). Un grupo de animales fue tratado solo con la inyección de hCG (20 UI/animal). Todos los animales fueron sacrificados 20 hs después de la última inyección para recolectar los ovarios y trompas. En las trompas se realizó el conteo de ovocitos presentes.

### **Determinación de concentraciones plasmáticas de estradiol y testosterona.**

Las determinaciones hormonales fueron realizadas por el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay a partir de muestras de suero obtenidas de los animales al momento del sacrificio y mantenidas a -20°C hasta el ensayo. Las concentraciones de Estradiol fueron determinadas por un radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida utilizando kits de DPC (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, USA). Todas las muestras fueron analizadas en el mismo ensayo. Los antisueros utilizados (anti estradiol y anti testosterona muestran una reactividad cruzada baja (menor de 2,8%) con otros esteroides naturales o posibles contaminantes ambientales. La concentración mínima detectable de los ensayos de estradiol y testosterona fue de 14.9 pg/ml y 0.11 ng/ml respectivamente. Para el ensayo de estradiol, los coeficientes de variación intraensayo para controles bajos (20 pg/ml), medios (139 pg/ml) y altos (512 pg/ml) fueron 22.3%, 7.7% y 6.4%, respectivamente. Para el ensayo de testosterona, los coeficientes de variación intraensayo para controles bajos (1.05

ng/dl) y medios (8.25 ng/dl) fueron 3.5% y 3.9% respectivamente. Todas las muestras fueron analizadas en duplicado el mismo ensayo.

### **Injertos**

**Donantes.** Ratas del DPN17 pertenecientes a los grupos control o androgenizadas fueron anestesiadas y sacrificadas por decapitación. Se retiraron ambos ovarios en condiciones de asepsia, los que fueron colocados en solución salina balanceada de Hanks para su disección. Se retiró cuidadosamente todo el tejido adiposo circundante y la trompa.

**Receptoras.** Ratas adultas cíclicas (3 meses de edad) fueron castradas bajo anestesia y al día 10 post-castración, los animales fueron nuevamente anestesiados como se explicó anteriormente, en cada animal se realizó un bolsillo subcutáneo en la región lumbar, donde se colocaron los dos ovarios provenientes del animal donante (17DPN) tratado con Testosterona, DHT o control. Posteriormente se cerró la herida y una vez recuperados de la anestesia, fueron devueltos al bioterio. Durante la primer semana fueron vigiladas diariamente por posibles infecciones y a partir de los 10 días de realizado el injerto se controló la actividad estral. Los animales fueron sacrificados entre 20 y 25 días luego de realizado el injerto.

### **Análisis estadístico**

Los datos provenientes de las diferentes condiciones experimentales fueron comparados mediante el test de t de Student o el test de ANOVA según correspondiera para determinar diferencias significativas entre los grupos. Para la identificación del o los grupos que mostraron diferencias se utilizó el test de Tukey. En caso de que los datos no cumplieran con alguno de los supuestos de la estadística paramétrica, se procedió a comparar los datos utilizando el test de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis no paramétrico (ANOVA en rangos) seguido por el test de Dunn. En todos los casos se consideraron estadísticamente significativos valores de  $P \leq 0.05$ .

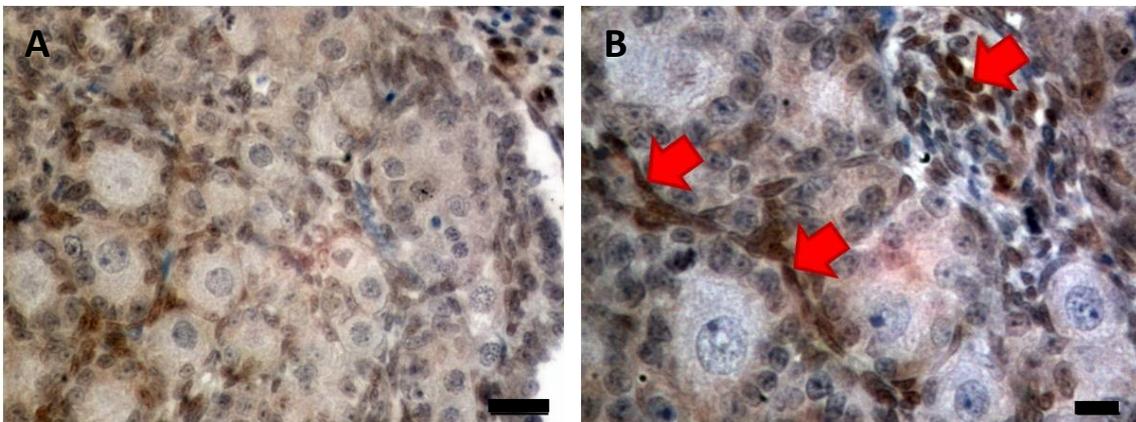
Los datos morfométricos se presentan como gráficos de cajas (box plots) donde el 50% de los valores están dentro de la caja, la media se marca con una línea punteada y la mediana con una línea sólida. Las barras representan los percentiles 5 y 95.

El diámetro folicular promedio fue correlacionado con el área de la capa granulosa utilizando el Coeficiente de correlación de Pearson. La transformación Fisher-Z se utilizó para analizar diferencias entre las correlaciones.

## RESULTADOS

Dado que los datos acerca de la expresión de RA durante el desarrollo del folículo ovárico son escasos y que su presencia nos permitiría mostrar al ovario como un posible efector directo de los efectos de los andrógenos neonatales, el primer análisis que realizamos consistió en la detección del RA en el periodo neonatal. Los ovarios de los animales de 3DPN presentaron una población celular inmunoreactiva para el RA. La mayoría de estas células se localizaron en el estroma del ovario que rodea a los folículos (Fig. 9). Esta confirmación permitió continuar con la realización de los objetivos planteados

**Figura 9- Detección inmunohistoquímica del receptor de andrógenos en ovarios neonatales en condiciones control.**



Los cortes corresponden a un ovario a los 3DPN. Numerosas células del estroma del ovario muestran marcado nuclear (flechas). Barras: A: 20  $\mu$ m; B: 10  $\mu$ m

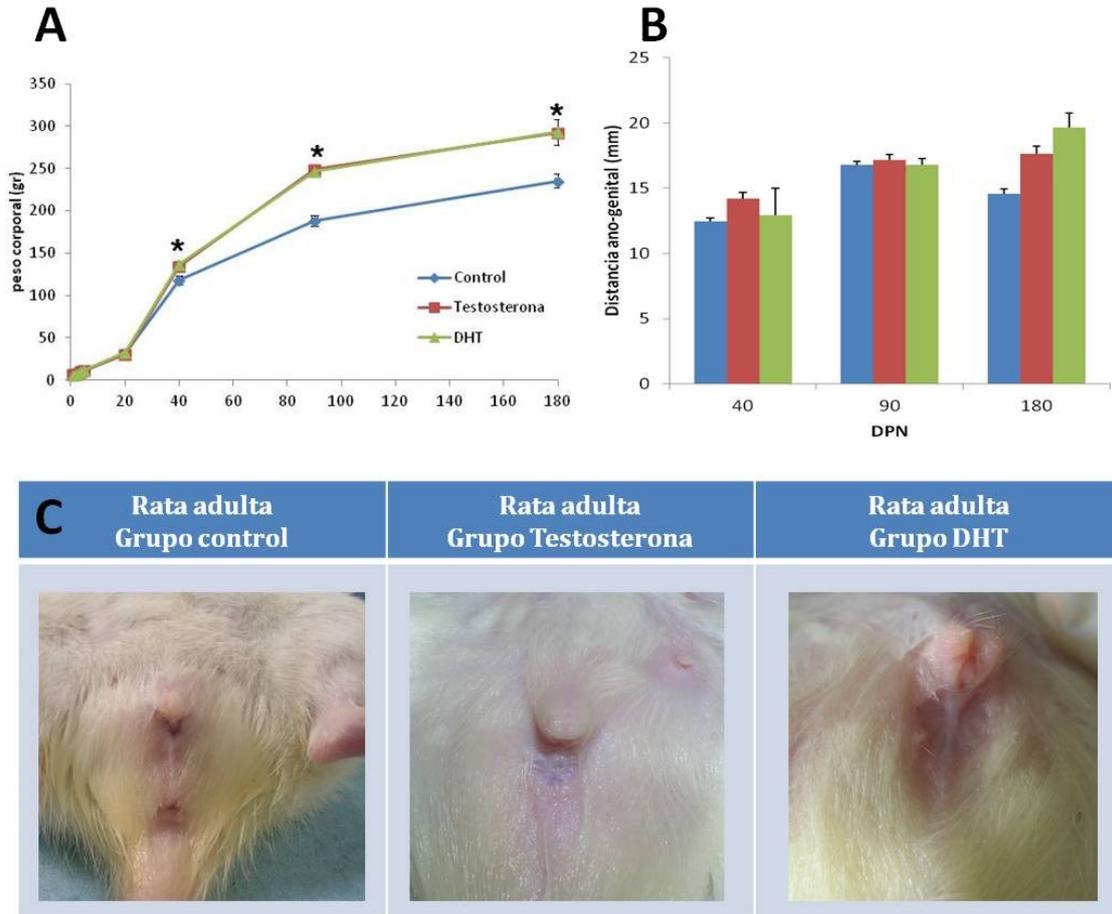
**Objetivo específico 1:** *Analizar el papel programador de los andrógenos neonatales sobre la función reproductiva.*

Como primera aproximación realizamos una caracterización del modelo de androgenización y sus **efectos sobre el crecimiento y desarrollo corporal y reproductivo.**

El tratamiento neonatal con andrógenos no modificó la tasa de supervivencia ni el ritmo de crecimiento de las crías durante las etapas infantil y juvenil. A la pubertad y edad adulta, las hembras androgenizadas (grupos T y DHT) mostraron un incremento significativo del peso corporal comparadas con el grupo control (Fig. 10A). No obstante, no se encontraron cambios en la distancia anogenital en ninguno de los grupos analizados a las diferentes edades (Fig. 10B).

La edad en que ocurre la canalización vaginal, como indicador de maduración reproductiva en roedores, se observó a los  $32 \pm 2$  días de vida postnatal en los animales del grupo control. Las hembras androgenizadas con testosterona no mostraron apertura vaginal en ninguna de las edades analizadas, y la mayoría de los animales expuestos a DHT desarrollaron un clítoris hendido sin apertura vaginal evidente (Fig. 10C). En los animales control, el evento de apertura vaginal, fue seguido por la presencia de ciclos regulares de 4 días en la vida adulta. La falta de apertura vaginal en los animales androgenizados imposibilitó la toma de muestras para determinar la ciclicidad estral por medio de frotis vaginales.

**Figura 10. - Efectos de los andrógenos neonatales sobre el crecimiento y desarrollo corporal y reproductivo.**



**A** - Evolución del peso corporal. Ambos grupos androgenizados mostraron un incremento significativo del peso corporal desde la pubertad. **B** - La distancia anogenital fue semejante en todos los grupos y edades analizadas. **C** - La exposición androgénica indujo alteración en el desarrollo de los genitales externos manifestados por la ausencia de apertura vaginal. En el grupo expuesto a DHT se sumaron además alteraciones en el desarrollo de los genitales externos (masculinización parcial del clítoris, clítoris hendido)

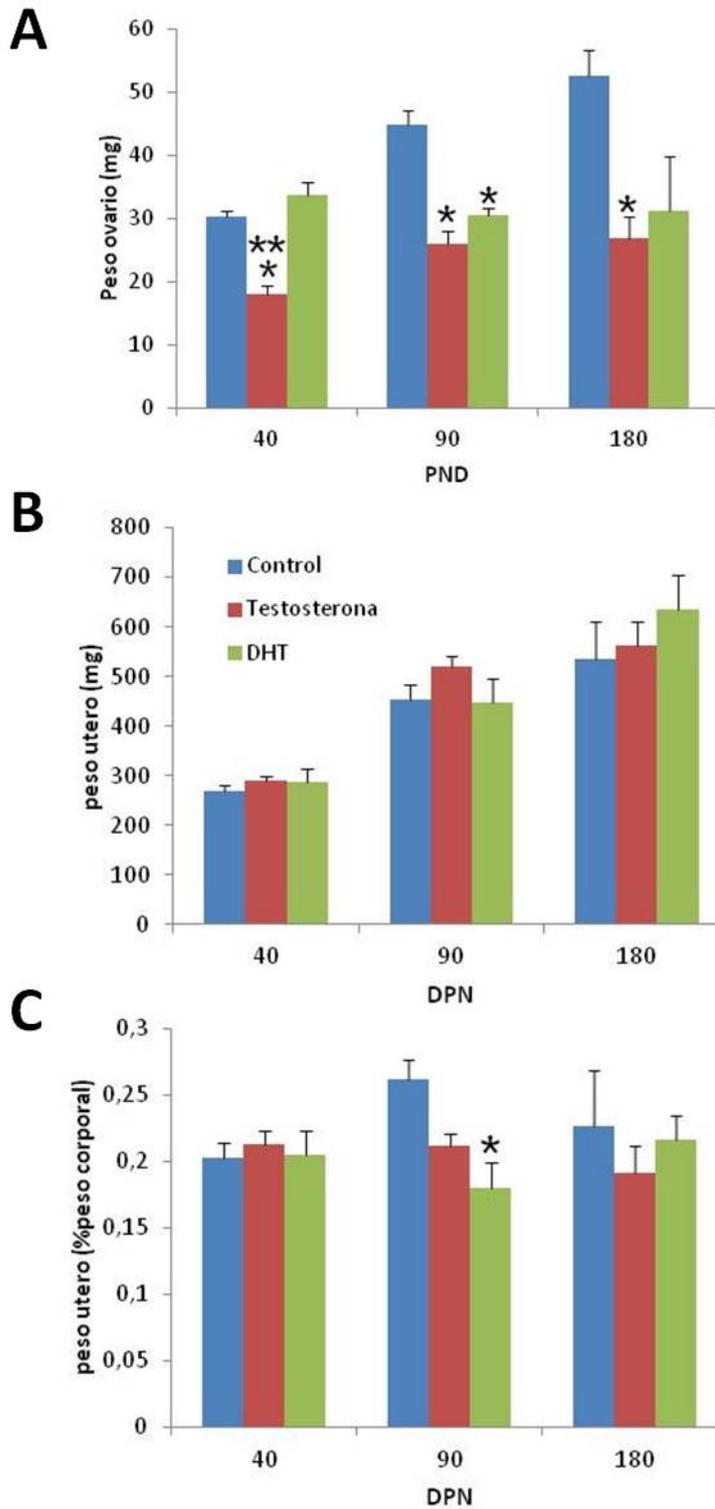
Dada la imposibilidad de determinar externamente si los animales androgenizados se encontraban ciclando una vez alcanzada la edad puberal, se procedió a analizar el desarrollo de los órganos internos del aparato reproductor.

### **Características macroscópicas del aparato reproductor**

El examen macroscópico de los ovarios del grupo control mostró una apariencia vascularizada y la coexistencia de folículos antrales y numerosos cuerpos lúteos. Su tamaño y peso incrementaron con la edad (Fig. 11A). En el grupo expuesto a Testosterona, los ovarios mostraron un aspecto blanquecino con grandes estructuras antrales y ausencia de cuerpos lúteos. Su peso fue siempre significativamente menor que el de los controles de la misma edad. En el grupo DHT la apariencia de los ovarios fue cambiando con la edad: a los 40DPN fueron similares a los del grupo control, mientras que estructuras foliculares de gran tamaño fueron identificables en la mayoría de los ovarios a los 90 y 180DPN. En el grupo tratado con DHT los cuerpos lúteos estuvieron presentes en todas las edades analizadas, aunque su número fue disminuyendo con la edad. El peso de los ovarios expuestos a DHT se mantuvo sin diferencias en las distintas edades estudiadas.

Dado que el desarrollo uterino es dependiente de las hormonas secretadas por los ovarios, y considerando el bajo peso de los ovarios de los animales expuestos a testosterona, se controló además el peso uterino como otro indicador de maduración reproductiva (Fig. 11B). En los animales del grupo control el peso uterino se incrementó con la edad. La administración neonatal de testosterona o DHT no provocaron cambios significativos sobre el peso del útero en ninguna de las edades estudiadas. Considerando que los animales androgenizados mostraron un incremento significativo del peso corporal, los datos del peso uterino fueron ajustados a este cambio y expresados como un porcentaje del peso corporal (peso relativo), no encontrándose diferencias (Fig. 11C).

Figura 11. - Efectos de la androgenización sobre el aparato reproductor.



**A** - El peso del ovario de los animales expuestos a testosterona fue significativamente menor en todas las edades analizadas. **B** - El peso del útero no fue modificado por ninguno de los tratamientos. **C** - Cuando el peso uterino se expresó en función del peso corporal tampoco se encontraron diferencias, excepto en el grupo DHT a los 90DPN.

## **Histología**

Con el objetivo de identificar posibles alteraciones morfológicas inducidas por el tratamiento androgénico, se realizó el análisis histológico de los ovarios de animales a diferentes edades pertenecientes a los grupos control y androgenizados.

En primera instancia se analizaron los efectos inmediatos (5DPN, Fig. 12A,C,E) de la exposición a andrógenos sobre las características morfológicas de los ovarios. En esta edad, no se identificaron cambios en la morfología de los ovarios androgenizados respecto a los controles. Estos se caracterizaron por la presencia de folículos primordiales y en crecimiento (correspondientes a primarios, secundarios y preantrales). En ninguno de los grupos se observaron nidos ovogoniales ni folículos antrales.

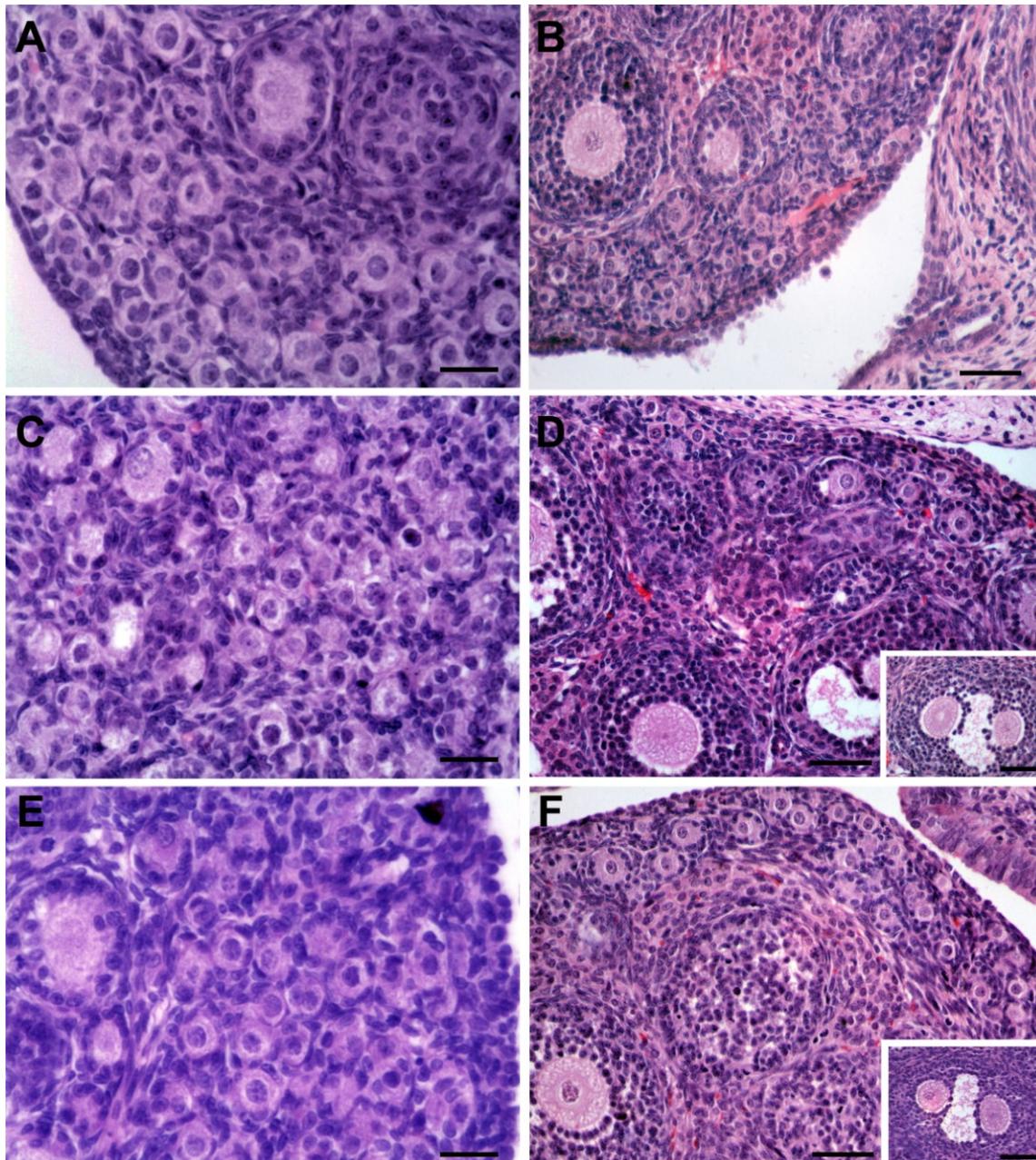
Al final del periodo infantil (20DPN, Fig. 12B,D,F) en los ovarios del grupo control se observaron folículos primordiales y en crecimiento, incluyendo la presencia de folículos con desarrollo antral temprano (antrales pequeños) y atrésicos. Como era de esperar, ni folículos preovulatorios ni cuerpos lúteos estuvieron presentes en estos ovarios. Las mismas estructuras se observaron en los ovarios de los animales androgenizados, siendo relativamente frecuente la presencia de folículos conteniendo dos o más ovocitos (multi-oocyte follicles: MOF), indicadores de fallas en el proceso de ensamblaje folicular

Durante el periodo puberal (40DPN) los ovarios de los animales del grupo control mostraron folículos en todas las etapas del desarrollo (primordiales, preantrales y antrales sanos y atrésicos), siendo la presencia de múltiples cuerpos lúteos la característica más llamativa. Todos los animales de este grupo (12 de 12) mostraron cuerpos lúteos, indicando que todos ellos habían ovulado por lo menos una vez. Los folículos antrales sanos se caracterizaron por presentar una capa granulosa con múltiples figuras mitóticas, acompañada por una teca interna bien desarrollada. La estructura histológica de los ovarios del grupo control en edades más avanzadas (90 y 180DPN, Fig. 13A) fue similar a esta última descripción.

Los animales de 40DPN que fueron tratados neonatalmente con testosterona mostraron folículos primordiales y en todas las etapas del crecimiento folicular. No se observó la presencia de cuerpos lúteos ni folículos luteinizados en ningún animal (15 de 15). La principal característica de estos ovarios fue la presencia de

estructuras foliculares muy grandes, con un diámetro entre 800 y 1000  $\mu\text{m}$ . Estas estructuras foliculares quísticas se caracterizaron por presentar una cavidad antral muy grande,

**Figura 12 - Aspecto histológico de cortes de ovario de 5 y 20 DPN**

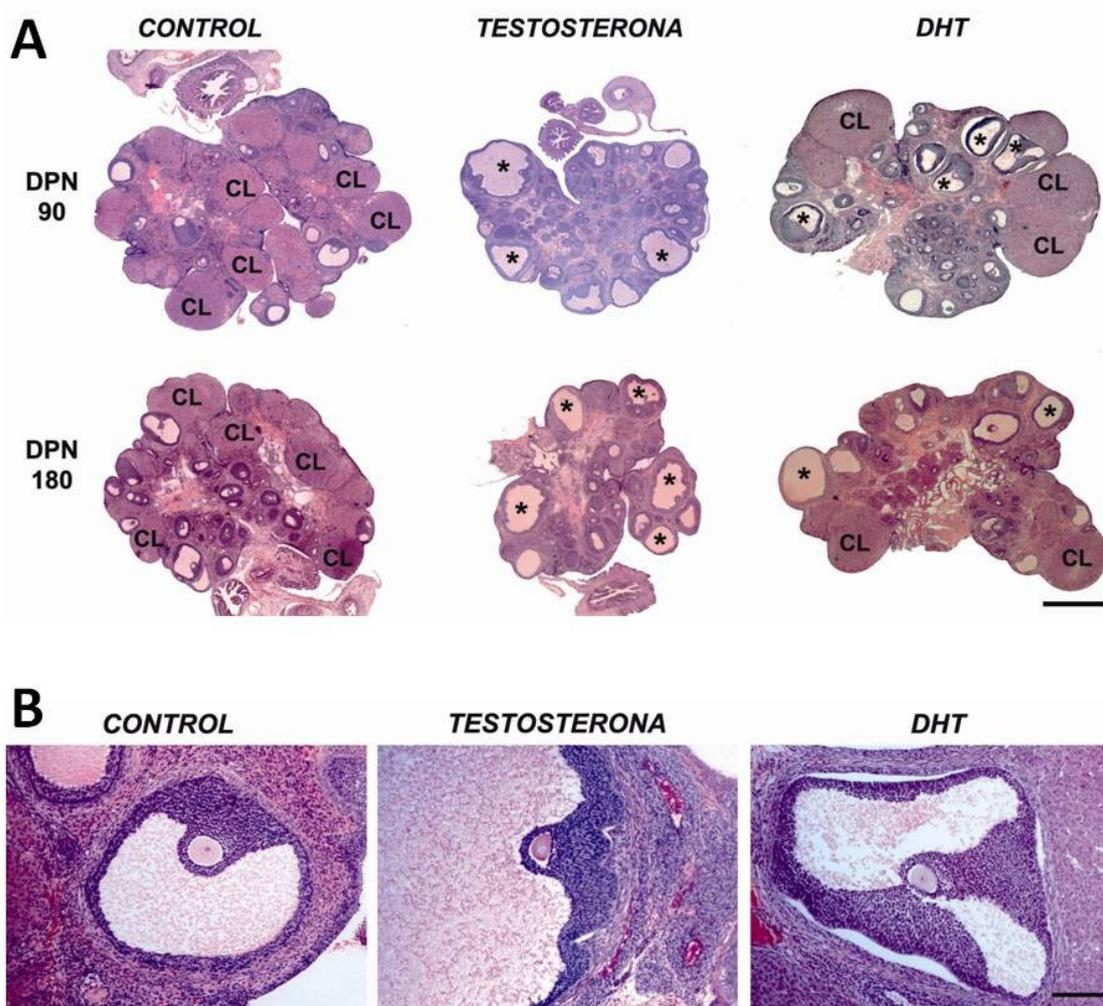


A y B - Ovarios del grupo Control correspondientes a los 5 y 20DPN respectivamente.  
C y D - Ovarios del grupo expuesto a Testosterona de 5 y 20DPN respectivamente. El inserto muestra un folículo antral con dos ovocitos presente en el ovario de 20DPN.  
E y F - Ovarios del grupo expuesto a DHT correspondientes a 5 y 20DPN respectivamente. El inserto muestra un folículo antral con dos ovocitos.  
Barras: A; C; E: 20  $\mu\text{m}$ ; B; D; F e insertos: 50  $\mu\text{m}$

presentando uno o a veces más de un ovocito, con una capa granulosa irregular, muchas veces muy gruesa y plegada con frecuentes mitosis. Un hallazgo frecuente fue la separación de la capa granulosa de su membrana basal en varios puntos a lo largo del perímetro del quiste. Características similares estuvieron presentes en los ovarios correspondientes a las edades puberales y adultas (Fig. 13B).

Aproximadamente el 85% de los animales con DHT presentaron un número importante de cuerpos lúteos, y sólo el 15% (2 de 12) no mostraban signos de ovulación. La población folicular se caracterizó por la presencia de folículos en reposo (primordiales) y en desarrollo en todas las etapas (primarios a preovulatorios). En los animales que no presentaron cuerpos lúteos, se encontraron algunas estructuras foliculares bien desarrolladas con algunas de las características propias de los quistes. A partir de los 90 días, se observó una disminución del número de cuerpos lúteos y el desarrollo de un número bajo de estructuras quísticas; el número de quistes tuvo un leve incremento a los 180 días de edad (Fig. 13A,B).

Figura 13. - Efectos de los andrógenos sobre el ovario.



**A** - Aspecto general de los ovarios de los distintos grupos. Note la presencia de numerosos cuerpos lúteos (CL) y folículos en varias fases de crecimiento en los ovarios del grupo control. Los ovarios del grupo testosterona son de menor tamaño, no presentan CL y se caracterizan por presentar abundantes estructuras foliculares quísticas (\*). Los ovarios del grupo DHT muestran simultáneamente un escaso número de CL y varias estructuras foliculares quísticas (\*). Barra: 1 mm. **B** - Aspecto histológico de folículos (control) y quistes foliculares (en ambos grupos androgenizados). Note en los quistes la permanencia del ovocitos, el desarrollo irregular de la capa granulosa y la presencia de sectores de separación entre la capa granulosa y la membrana basal. Barra: 100 μm

### **Concentraciones séricas de estradiol y testosterona.**

Considerando que los ovarios de los animales androgenizados mostraban folículos en todas las etapas del desarrollo, y que las estructuras quísticas conservaban un desarrollo importante de la capa granulosa, sumado a un desarrollo macroscópico normal del útero, se realizó la determinación de los niveles séricos de estradiol, tratando de establecer una correlación funcional. Las ratas androgenizadas neonatalmente con testosterona mostraron concentraciones elevadas de estradiol, en rangos similares a los de los animales del grupo control durante el proestro ( $62.4 \pm 9.9$  vs.  $60.9 \pm 3.9$  pg/ml). En los animales androgenizados con DHT se encontraron concentraciones similares a las mostradas por los animales del grupo control durante el día del estro ( $37.4 \pm 9.2$  vs.  $29.0 \pm 5.0$  pg/ml).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles circulantes de andrógenos entre los distintos tratamientos (control:  $142.8 \pm 14.8$  pg/ml; testosterona:  $165.9 \pm 40.5$  pg/ml; DHT:  $171.8 \pm 40.3$  pg/ml).

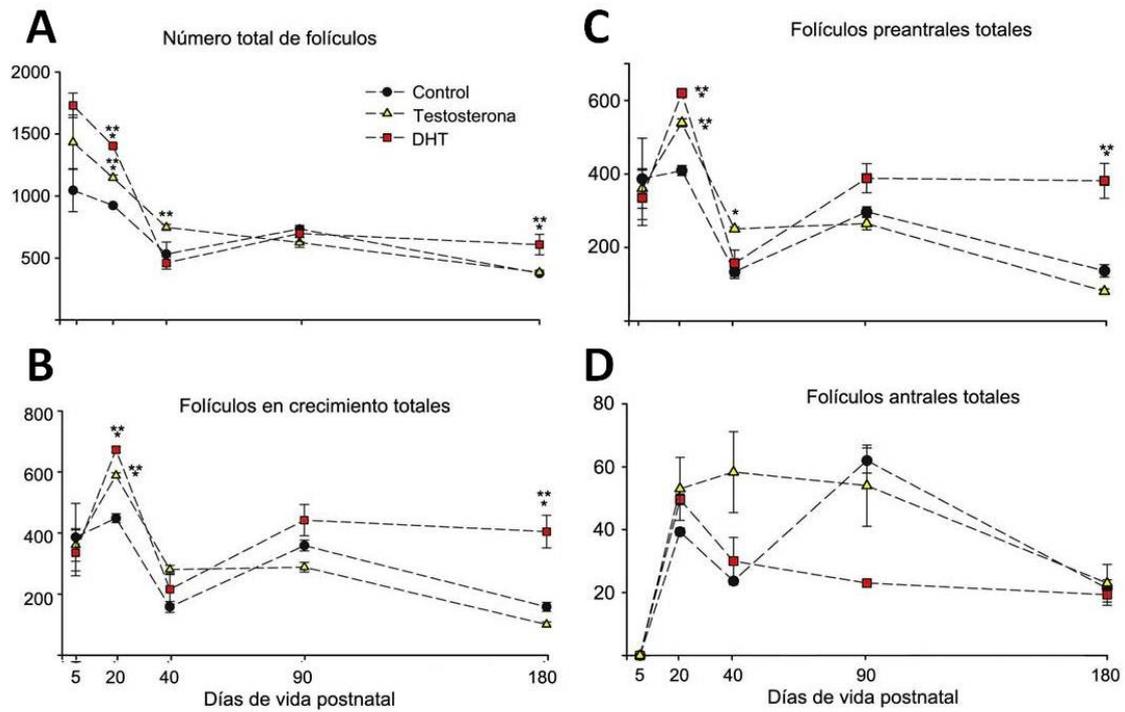
***En resumen, los andrógenos neonatales inducen efectos sobre el desarrollo corporal y la función reproductiva, propiciando la generación de estructuras quísticas funcionales (secretoras de estradiol) y alterando la capacidad ovulatoria dependiendo del andrógeno utilizado; desde la pubertad por la administración de testosterona o en edades más avanzadas por la DHT.***

**Objetivo específico 2:** *Caracterizar los efectos de la androgenización neonatal sobre el crecimiento y maduración de la población folicular del ovario.*

### **Análisis de la dinámica folicular**

Las características de la dinámica folicular se resumen en la figura 14. En todos los grupos el mayor número de folículos totales se encontró a los 5DPN, la mayoría de ellos perteneciendo al estadio primordial. Los animales androgenizados mostraron una tendencia a presentar un mayor número total de folículos, cantidad que fue corregida a la pubertad (Fig. 14A). A partir de dicha edad, los folículos en crecimiento del grupo tratado con testosterona presentaron patrones de distribución semejantes a los del grupo control, mientras que en el grupo tratado con DHT el número de folículos en crecimiento se incrementó hacia el final del periodo experimental (180DPN) (Fig. 14B,C). El número de folículos antrales varió dependiendo del grupo y tratamiento analizado, aunque estas variaciones nunca fueron significativas (Fig 14D).

**Figura 14. - Efectos de los andrógenos sobre la dinámica folicular del ovario.**



**A** - Efecto sobre el número total de folículos. Note el mayor número de folículos presentes en los ovarios de los animales androgenizados en las edades prepuberales. **B** - el análisis de los folículos en crecimiento muestra por un lado un incremento en los animales de ambos grupos androgenizados a los 20 DPN y por otro un incremento significativo a los 180 días solo en grupo DHT. **C** - El mismo comportamiento que en el caso anterior se observa cuando se analizan solo los folículos en crecimiento preantrales. **D** - La dinámica de los folículos antrales, si bien mostró variaciones entre los distintos grupos, nunca llegó a mostrar diferencias significativas. (\*)  $p \leq 0.05$  respecto al grupo control en la misma edad. (\*\*)  $p \leq 0.05$  respecto al otro grupo androgenizado en la misma edad.

## Ovulación y desarrollo de estructuras quísticas

Todos los animales adultos del grupo control ovularon, y en ningún caso se desarrollaron estructuras quísticas, tal y como quedó evidenciado en el análisis de los cortes histológicos (Fig. 15A). Por otra parte, los ovarios de los animales tratados con testosterona (Fig. 15B) no presentaron cuerpos lúteos. Los quistes foliculares estuvieron presentes desde edades muy tempranas (40DPN) con un diámetro de  $750,3 \pm 40,8 \mu\text{m}$ . Su número incrementó al aumentar la edad de los animales, pero su tamaño se mantuvo en rangos similares (Tabla 2). En el grupo tratado con DHT (Fig 14C) se observó una situación intermedia, caracterizada por la coexistencia de cuerpos lúteos y quistes. A los 40DPN se encontraron numerosos cuerpos lúteos y solo un 20% de los animales desarrollaron algún quiste. En edades más avanzadas el número de cuerpos lúteos disminuyó y se desarrollaron folículos quísticos, aunque en menor número que en el grupo tratado con testosterona. El diámetro promedio de los quistes fue en aumento a medida que se incrementaba la edad. Diferencias significativas de tamaño entre tratamientos estuvieron presentes a los 40 y 180DPN (Tabla 2).

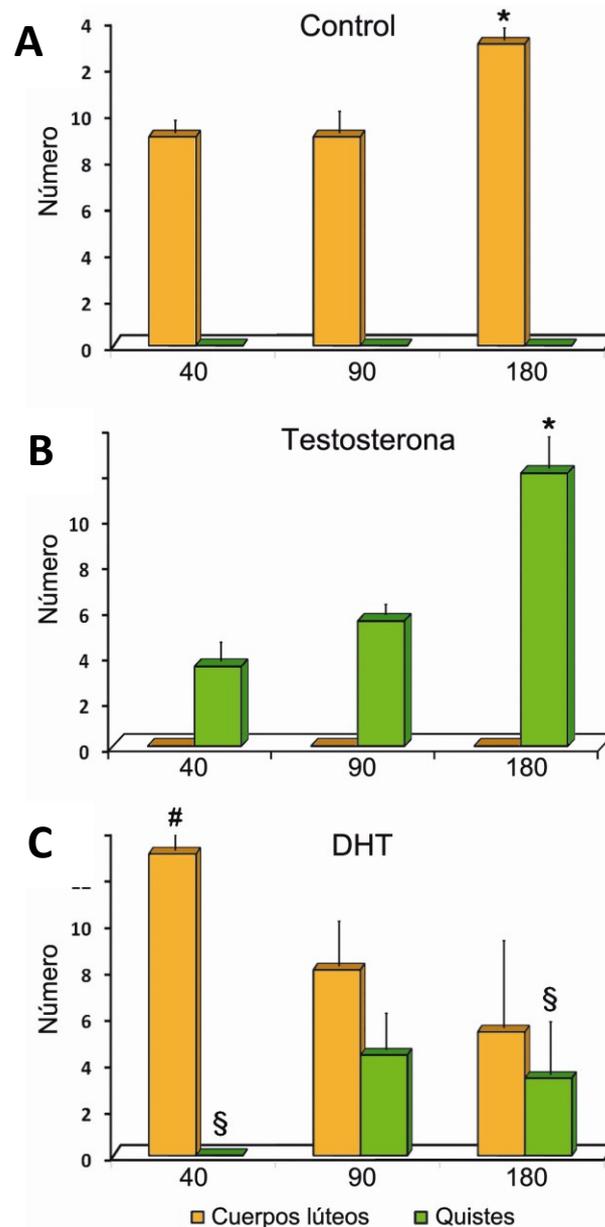
**Tabla 2 - Características morfométricas de las estructuras quísticas presentes en ovarios de animales androgenizados en las distintas edades analizadas**

Edad	Testosterona		DHT	
	Tamaño ( $\mu\text{m}$ ) (media $\pm$ SEM)	Min-max ( $\mu\text{m}$ )	Tamaño ( $\mu\text{m}$ ) (media $\pm$ SEM)	Min-max ( $\mu\text{m}$ )
40DPN	$750,3 \pm 40,8$	487,5 - 1033,7	$572,4 \pm 12,2$ (a)	513,1 - 641,5
90DPN	$676,9 \pm 24,5$	550,5 - 857,5	$614,9 \pm 14,7$	484,5 - 736
180DPN	$665,8 \pm 26,2$	479,2 - 901,5	$799,3 \pm 36,5$ (a,b)	511,7 - 1147,4

(a)  $p \leq 0.05$  comparado con grupo Testosterona a la misma edad

(b)  $p \leq 0.05$  comparado con diferentes edades del mismo grupo

**Figura 15. - Efectos de los andrógenos sobre la ovulación y la presencia de estructuras foliculares quísticas.**



**A** - En el grupo control no se observaron estructuras quísticas. El número de cuerpos lúteos se incrementó con la edad. **B** - En el grupo testosterona no se observaron cuerpos lúteos, mientras que los quistes estuvieron presentes desde la pubertad, aumentando su número con la edad. **C** - En el grupo DHT no se observaron estructuras quísticas en la edad puberal. Su número se incrementó con la edad mientras que el número de CL disminuyó en forma marcada.

(\*)  $p \leq 0.05$  respecto a las otras edades en el mismo grupo y categoría (CL o quiste).

(#)  $p \leq 0.05$  respecto al control en la misma edad y categoría (CL o quiste).

(§)  $p \leq 0.05$  respecto al grupo testosterona en la misma edad y categoría (CL o quiste).

## Morfometría

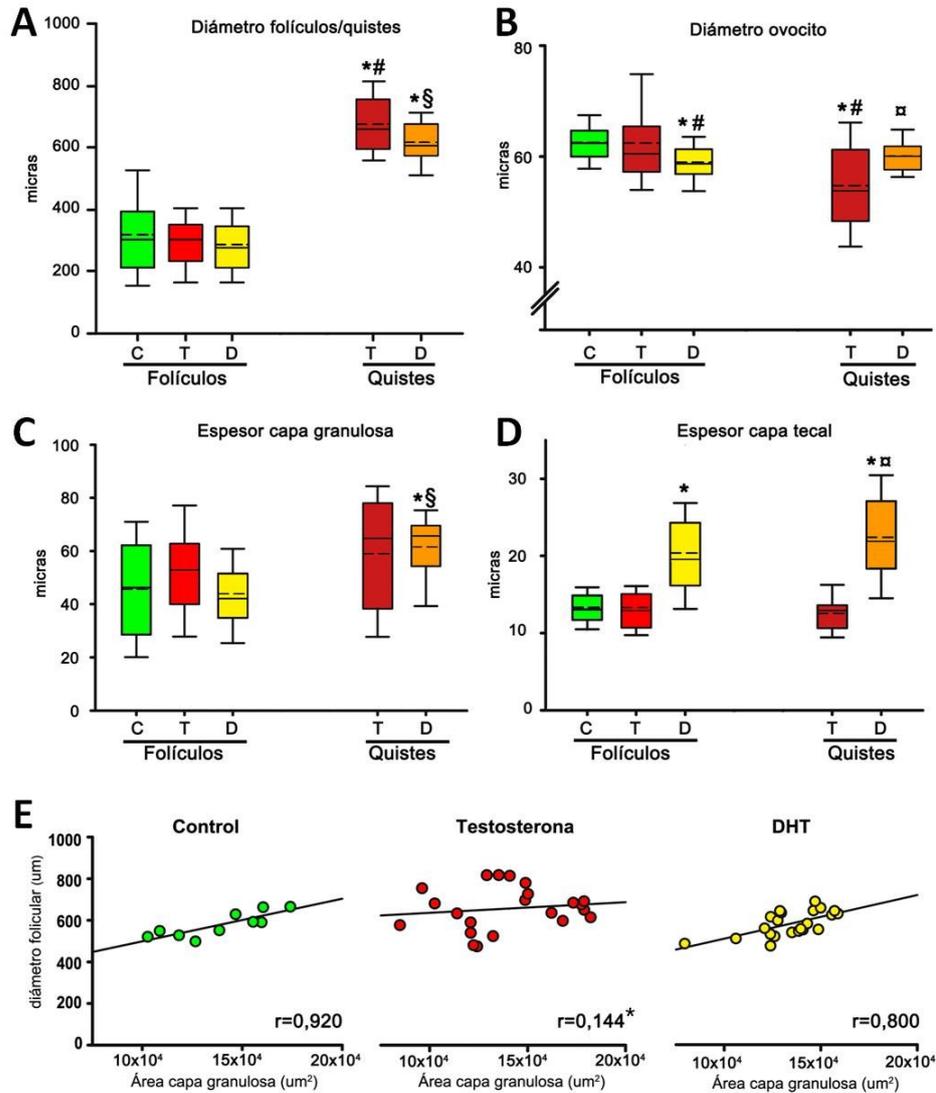
Con la finalidad de caracterizar detalladamente las alteraciones morfológicas inducidas por el tratamiento androgénico, se realizó un análisis morfométrico de folículos y quistes presentes en los ovarios de animales en la edad adulta (90DPN). Todos los folículos analizados se clasificaron además como “folículos antrales sanos” y/o “quistes”. Se analizaron el diámetro promedio de ambas estructuras, así como el diámetro del ovocito y el espesor de las capas granulosa y tecal.

El análisis morfométrico de los *folículos morfológicamente sanos* en los animales androgenizados no arrojó diferencias significativas ni en el diámetro folicular o el espesor de la capa granulosa respecto a lo que se observa en los animales del grupo control (Fig 16A,C). Las diferencias encontradas se relacionaron con el diámetro del ovocito y el espesor de la teca en el grupo de animales tratado con DHT (Fig 16B,D).

Los *quistes* inducidos por la administración neonatal de andrógenos se caracterizaron por presentar mayor tamaño que los folículos presentes en el ovario. Si bien los quistes de los animales expuestos a testosterona mostraron en promedio un incremento en el grosor de su capa granulosa, ésta presentó una alta variabilidad (Fig. 16A). En los animales expuestos a DHT los quistes presentaron incremento de grosor de la granulosa y la teca interna (Fig. 16C,D).

El área ocupada por la capa granulosa se correlacionó de forma positiva con el diámetro folicular, tanto en los folículos de ovarios de animales control ( $r=0,920$ ) como en aquellos expuestos a DHT ( $r=0,800$ ); en el grupo expuesto a Testosterona la correlación fue nula ( $r=0,144$ ) (Fig. 16E).

**Figura 16. – Análisis morfométrico de folículos antrales aparentemente sanos y estructuras foliculares quísticas al DPN 90.**



Diámetro medio de los folículos y estructuras quísticas (**A**) en ovarios de animales control y expuestos neonatalmente a testosterona o DHT (C-T-D respectivamente). Diámetro de ovocitos (**B**); espesor de las capas granulosa (**C**) y tecal (**D**) en los folículos y estructuras quísticas de ovarios de animales control (C) y expuestos neonatalmente a testosterona (T) o DHT (D). **E** – Correlación entre el área ocupada por las células de la granulosa y el tamaño folicular. En los grupos control y DHT el área se incrementó a medida que los folículos crecían. En el grupo Testosterona la correlación estuvo ausente.

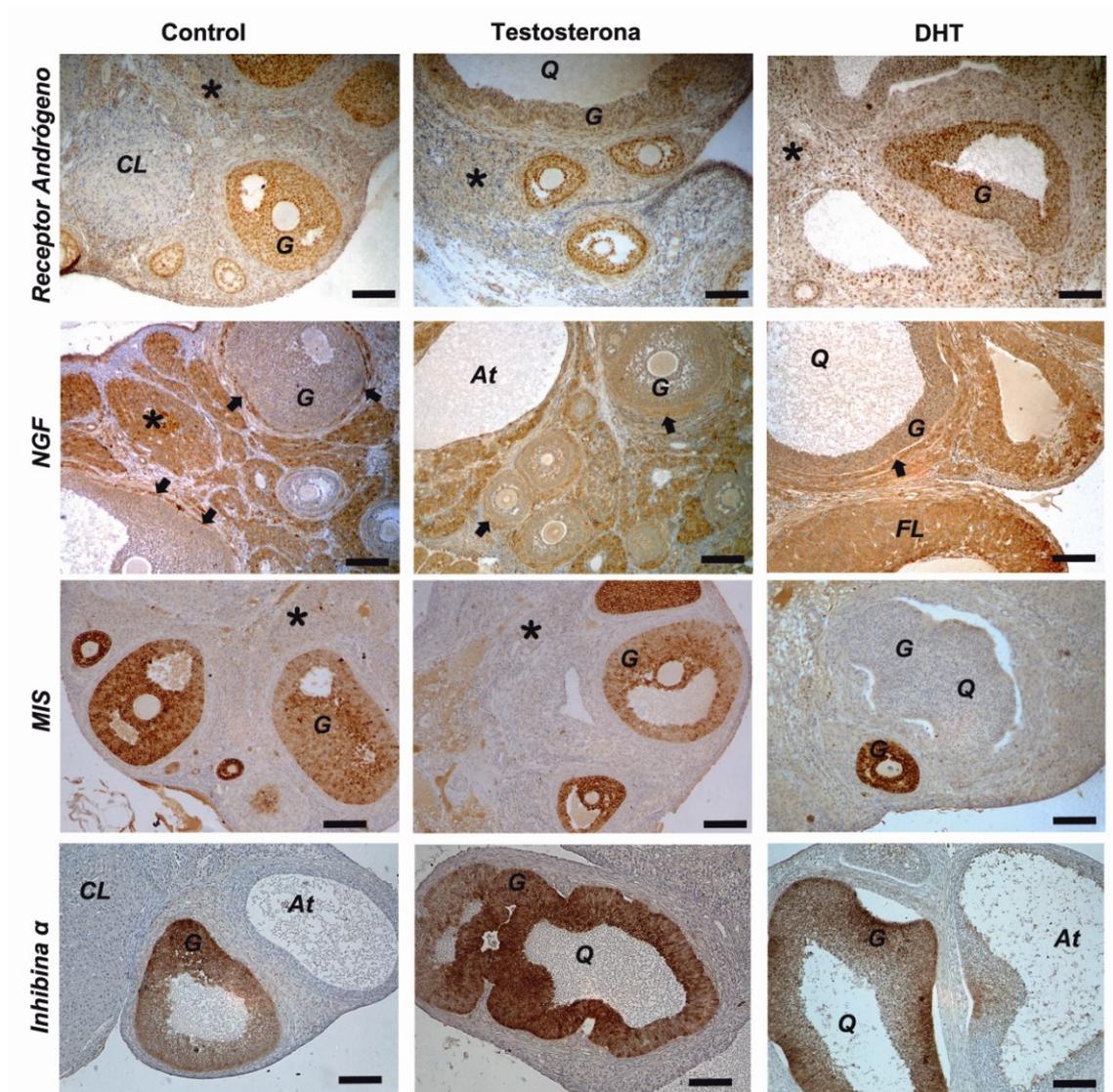
- (\*)  $p \leq 0.05$  comparado con folículos del grupo control;
- (#)  $p \leq 0.05$  comparado con folículos del grupo testosterona;
- (§)  $p \leq 0.05$  comparado con folículos del grupo DHT;
- (≡)  $p \leq 0.05$  comparado con quistes del grupo testosterona.

## **Inmunohistoquímica**

Sumado al análisis morfométrico, se realizó un análisis inmunohistoquímico utilizando una batería de anticuerpos dirigidos a dos grupos de marcadores de la función ovárica, uno que incluyó a moléculas que participan en el control del crecimiento y maduración folicular y otro dirigido a diferentes enzimas vinculadas a la síntesis de esteroides, y por lo tanto a la funcionalidad del folículo.

Los ovarios de los animales del grupo control mostraron fuerte inmunoreactividad para el RA en las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales tempranos sanos. Las células de la teca y el intersticio mostraron inmunoreactividad más leve. Tanto los cuerpos lúteos, los folículos primordiales así como los folículos en crecimiento con signos de atresia no presentaron marca evidente. Los ovarios de los animales androgenizados mostraron un patrón de expresión similar a los controles. Los quistes bien desarrollados con una capa granulosa gruesa mostraron una inmunoreactividad muy leve, y ausente cuando los quistes mostraban signos degenerativos (Fig. 17). La presencia de NGF fue detectada en el citoplasma de células tecales, intersticiales y luteales de los ovarios del grupo control. La androgenización neonatal no modificó el patrón de expresión de NGF en la vida adulta (Fig. 17). Como era de esperar, la AMH fue fuertemente expresada en las células de la granulosa de los folículos en crecimiento de tamaño pequeño y mediano, su presencia disminuyó en etapas más avanzadas del desarrollo folicular, hasta desaparecer en los folículos antrales de mayor tamaño o en los atrésicos. No se detectaron diferencias en la distribución de esta proteína en los ovarios de los animales androgenizados (Fig. 17). El inmunomarcado para inhibina alfa indicó la presencia de esta molécula en la capa granulosa de los folículos antrales sanos. La marca estuvo ausente en los folículos atrésicos, cuerpos lúteos, células tecales o intersticiales del grupo control. Un patrón similar fue detectado en los ovarios androgenizados, siendo llamativo el intenso marcado de la pared de los quistes. En aquellos quistes que presentaban una capa granulosa de grosor irregular, el inmunomarcado fue intenso en las áreas gruesas de la pared quística y débil o ausente en los sectores más adelgazados (Fig. 17).

**Figura 17 - Detección inmunohistoquímica de marcadores involucrados en el crecimiento y maduración folicular**

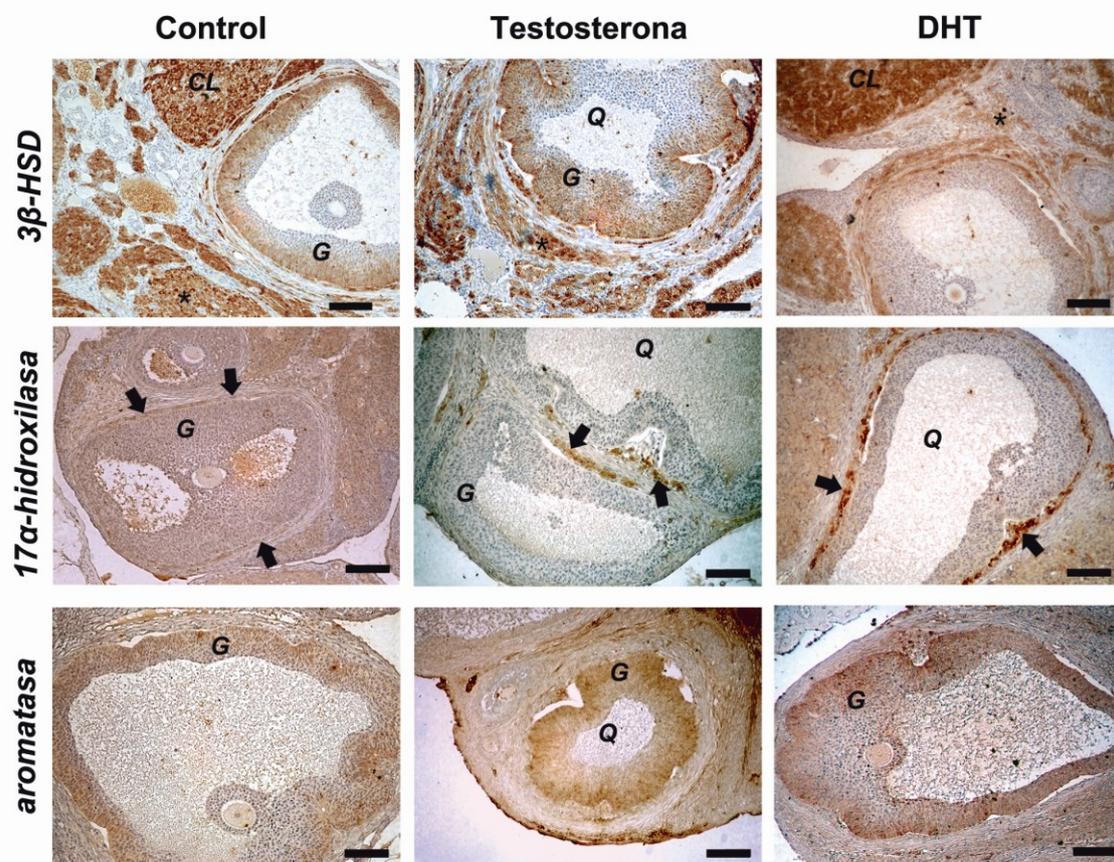


Se muestran cortes de ovarios adultos (DPN90) de los grupos Control, Testosterona y DHT. **NGF**: Factor de crecimiento nervioso; **MIS**: Sustancia inhibidora de Müller u Hormona antiMülleriana. CL: Cuerpo lúteo; G: capa granulosa; Q: quiste folicular; (\*): Tejido intersticial; Flechas: capa tecal. Barra: 100 μm.

El análisis inmunohistoquímico de enzimas clave en el proceso de esteroidogénesis en los folículos ováricos mostró que la enzima 3β-HSD estuvo presente en las células tecales de los folículos preantrales y antrales, así como en las células intersticiales y luteales de los ovarios del grupo control. Solo en los folículos de

mayor tamaño se apreció marca en la capa granulosa, limitada a las células basales. La enzima  $17\alpha$  hidroxilasa (CYP17 $\alpha$ ) tuvo una expresión mucho más restringida, limitándose a las células de la teca interna de los folículos antrales sanos y en vías de atresia, así como a algunas células intersticiales. La expresión de aromatasa (CYP19) estuvo limitada a la capa granulosa de los folículos de mayor tamaño (probablemente preovulatorios). En los ovarios de animales androgenizados el patrón de expresión de las tres enzimas analizadas fue similar. Las células granulosa de los quistes mostraron marca positiva para la enzima  $3\beta$ -HSD y aromatasa, mientras que sus células tecales fueron inmunomarcadas para la enzima  $17\alpha$  hidroxilasa (Fig. 18).

**Figura 18 - Detección inmunohistoquímica de enzimas involucradas en la esteroidogénesis en ovarios adultos (90DPN) de los grupos Control, Testosterona y DHT**



CL: Cuerpo lúteo; G: capa granulosa; Q: quiste folicular; (\*): Tejido intersticial; Flechas: capa tecal. Barra: 100  $\mu$ m.

***En resumen, los animales expuestos a andrógenos neonatales mostraron diferencias en la dinámica folicular vinculadas al tipo de andrógeno utilizado.***

*Estos cambios fueron más evidentes en los animales expuestos a DHT. Sin embargo, no se detectaron diferencias cualitativas en ninguna de las moléculas que regulan el crecimiento y maduración folicular ni en las enzimas esteroideogénicas que se analizaron por inmunohistoquímica.*

---

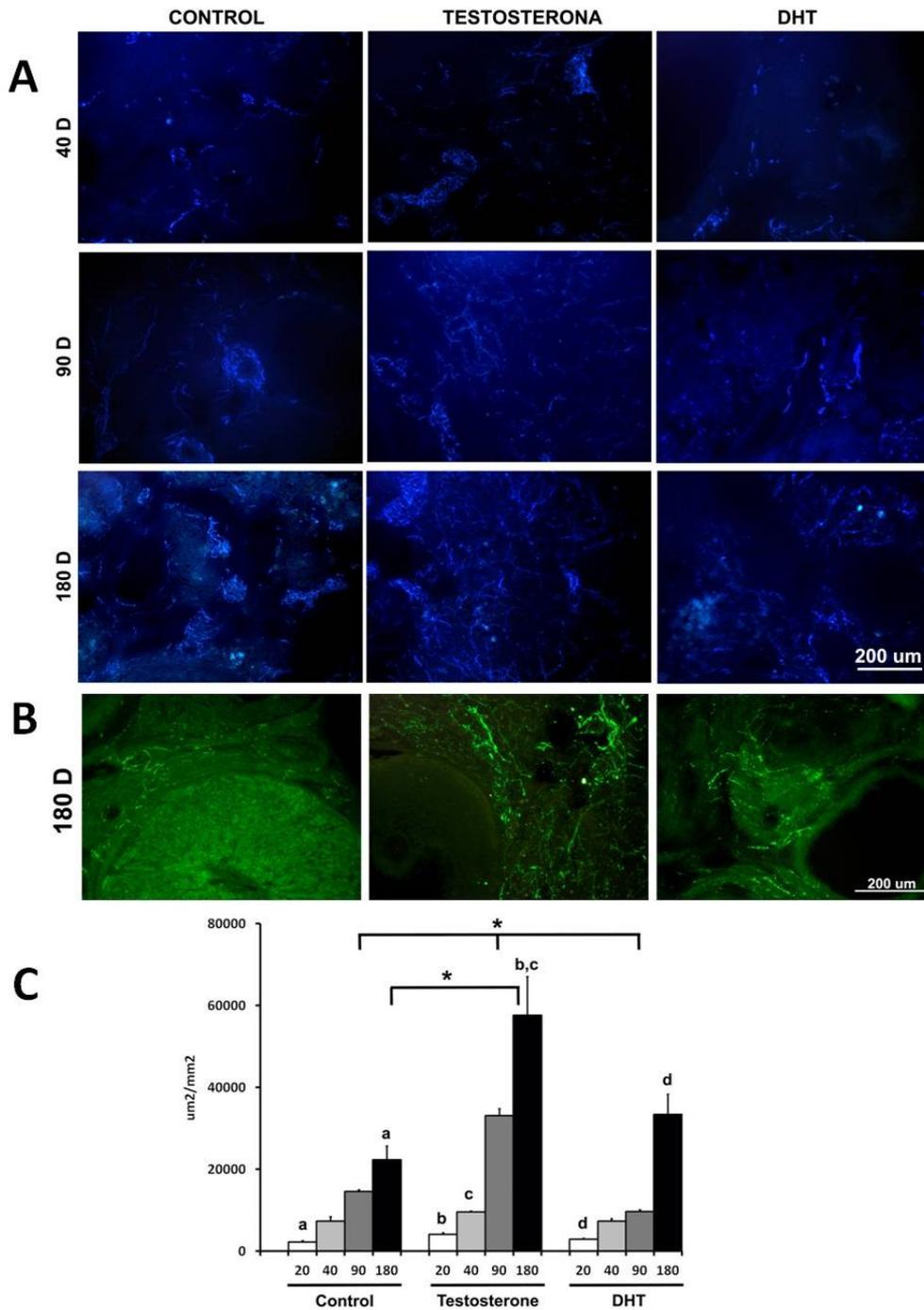
**Objetivo específico 3:** *Estudiar los efectos de la androgenización neonatal sobre la inervación simpática del ovario.*

Dado que varios reportes asocian un incremento de la actividad simpática con el desarrollo de la condición poliquística, y que en nuestro modelo se obtiene una condición similar, es que realizamos un **análisis de la inervación catecolaminérgica del ovario.**

En los ovarios del grupo control las fibras catecolaminérgicas (detectadas mediante la técnica del ácido glioxílico) estuvieron principalmente asociadas a la pared de los vasos sanguíneos, al tejido intersticial y la teca de los folículos en crecimiento. Ni la capa granulosa ni los cuerpos lúteos presentaron inervación simpática (Fig. 19A). En ambos grupos androgenizados el patrón de distribución de fibras simpáticas fue similar al del grupo control. El inmunomarcado con anticuerpos contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH, enzima limitante en la síntesis de las catecolaminas) confirmó los resultados de la histofluorescencia (Fig. 19B).

La densidad de fibras simpáticas en los ovarios de ratas del grupo control se incrementó con la edad. En los animales tratados durante el periodo neonatal con testosterona, la densidad de fibras simpáticas mostró valores similares a los de los animales controles en los 20 y 40 DPN, encontrándose un incremento significativo en la densidad de inervación en los días 90 y 180. Por su parte, el tratamiento con DHT no indujo modificaciones en la densidad de inervación simpática en ninguna de las edades estudiadas, respecto a la observada en animales control (Fig. 19C).

**Figura 19 - Inervación simpática del ovario.**



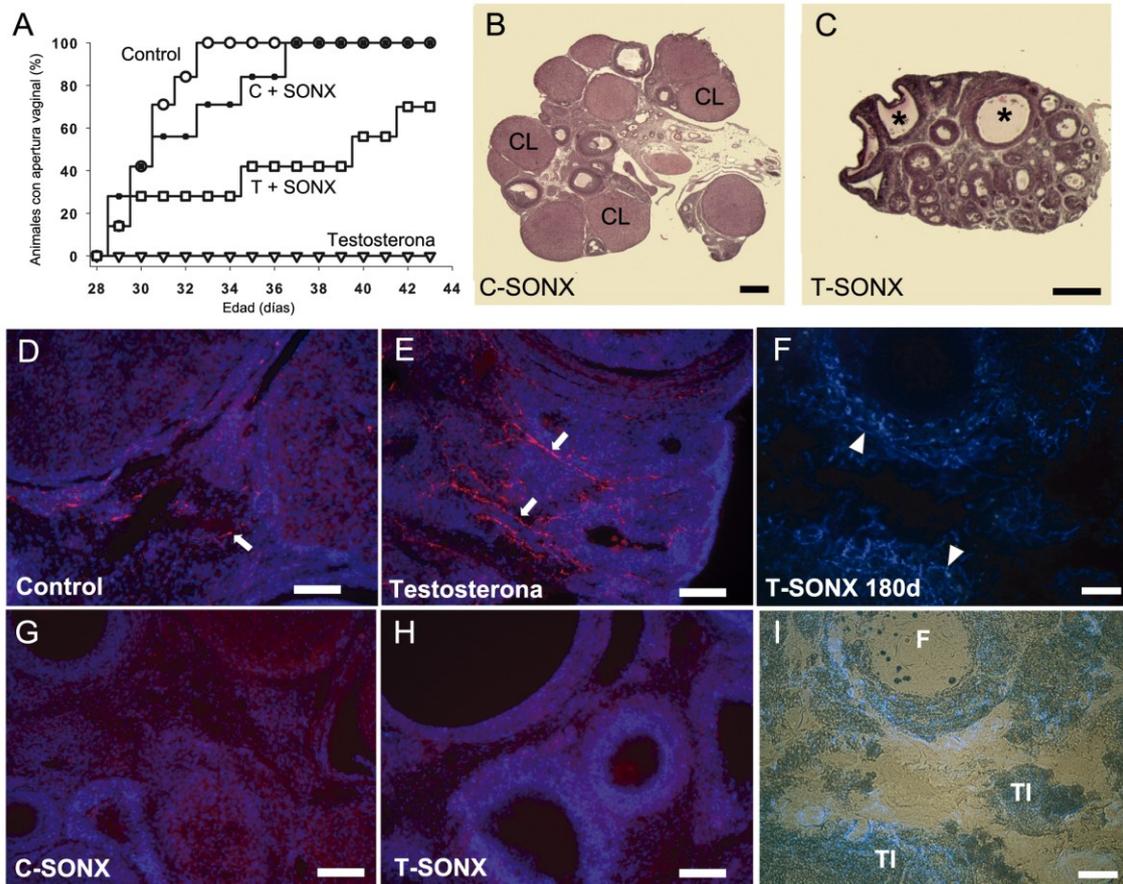
**A** - Detección histofluorescente de fibras noradrenérgicas en ovarios de los grupos Control, Testosterona y DHT a los 40, 90 y 180DPN. Las fibras aparecen asociadas a vasos sanguíneos, tejido intersticial y la teca de folículos en crecimiento. **B** - Detección inmunofluorescente de la enzima TH en ovarios los grupos Control, Testosterona y DHT a los 180DPN. La distribución de fibras inmunomarcadas es concordante con la observada en la histofluorescencia. **C** - Cuantificación de la densidad de fibras noradrenérgicas en ovarios de los grupos Control, Testosterona y DHT a los 20, 40, 90 y 180DPN. Letras iguales indican diferencias significativas entre edades en el mismo tratamiento. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre tratamiento a la misma edad ( $p \leq 0.05$ )

### **Denervación quirúrgica del ovario**

Aunque en nuestro modelo el incremento de la inervación simpática en el ovario, fue posterior al desarrollo de los quistes, intentamos determinar si la actividad simpática (no necesariamente acompañada por un incremento visible de la densidad de inervación) está implicada en los cambios morfológicos y funcionales detectados por la androgenización neonatal. Para ello se realizó una denervación simpática quirúrgica durante el periodo prepuberal y se analizaron parámetros indicadores de funcionalidad reproductiva. Los resultados obtenidos muestran que la denervación simpática del ovario en los animales del grupo control no modificó ninguno de los parámetros funcionales analizados: edad de apertura vaginal, capacidad de ovulación, ciclicidad. En el grupo androgenizado neonatalmente con testosterona, la denervación indujo apertura vaginal en un 70% de los animales, con un retraso significativo en la edad de perforación del canal vaginal ( $31.4 \pm 0.6$  vs.  $35.6 \pm 2.5$  días;  $P < 0.05$ ) (Fig. 20A-C). La denervación quirúrgica no permitió restablecer la ovulación ni a corto (40DPN) ni a largo plazo (180DPN). La efectividad de la denervación fue controlada mediante la técnica de histofluorescencia del ácido glioxílico e inmunofluorescencia con anticuerpos anti TH, no encontrándose fibras noradrenérgicas marcadas al día 40 en los ovarios de animales intervenidos quirúrgicamente (Fig. 20 D-E; G-H). A los 180DPN se había producido la reinervación, alcanzándose un patrón de distribución y una densidad similar a la de los animales tratados con testosterona y no intervenidos quirúrgicamente (Fig. 20 F,I).

***En resumen, los animales expuestos a testosterona durante el periodo neonatal mostraron un incremento de la inervación simpática en la edad adulta avanzada. Los efectos de la androgenización sobre la función ovárica no pudieron ser revertidos por la denervación quirúrgica. Los animales expuestos a DHT no mostraron incremento de la inervación simpática. Todo indica que en nuestro modelo la inervación simpática no juega un rol primario en el desarreglo del crecimiento folicular que lleva al desarrollo de los quistes, sino que probablemente se trate de un fenómeno secundario al desarrollo de los quistes.***

**Figura 20 - Efectos de la denervación simpática quirúrgica del ovario sobre la funcionalidad del ovario.**



**A** - Porcentaje de animales mostrando apertura vaginal en los grupos control, control denervado (C + SONX), testosterona y testosterona denervado (T + SONX). La denervación en los animales del grupo control no modificó el momento de apertura vaginal mientras que en los animales expuestos a testosterona provocó que casi un 70% se lograra la apertura vaginal aunque con un retraso significativo. **B-C** - aspecto histológico de ovarios a los 40DPN del grupo control denervado (C-SONX) y testosterona denervado (T-SONX). La denervación en el grupo control no impidió la ovulación, mientras que no fue suficiente para lograrla en el grupo tratado con testosterona. **D-E** - Detección de TH por inmunofluorescencia en los grupos Control y Testosterona a los 40DPN. Las flechas indican fibras inmunoreactivas. Note su mayor proporción en el grupo Testosterona. **G-H** - Detección de TH por inmunofluorescencia en los grupos Control denervado (C-SONX) y Testosterona denervado (T-SONX) a los 40DPN. Note la ausencia de fibras inmunoreactivas en ambas preparaciones. **F-I** - Presencia de fibras noradrenérgicas en el ovario a los 180DPN de un animal del grupo testosterona sometido a denervación (técnica del ácido glioxílico) vistas con fluorescencia (F) y con la superposición del campo claro correspondiente (I). Note la intensa reinervación.

CL - cuerpo lúteo; \* - quiste folicular; F: folículo antral; TI: tejido intersticial. Flechas: fibras inmunoreactivas para TH. Puntas de fleche: fibras simpáticas detectadas mediante histofluorescencia del ácido glioxílico. Barras (B, C): 500  $\mu$ m; (D-I): 100  $\mu$ m

**Objetivo específico 4:** *Analizar si los efectos de la androgenización ocurren primariamente sobre el ovario, el sistema hipotálamo-hipofisario o ambos.*

Para cumplir este objetivo se procedió a probar la capacidad de respuesta del ovario de animales control o androgenizados neonatalmente con Testosterona a un desafío gonadotrófico a los 90DPN. Para ello, se realizaron dos procedimientos, un grupo de animales fue estimulado en forma secuencial con PMSG (~FHS) y luego hCG (~LH), mientras que el otro solo recibió hCG. Los resultados se resumen en la Tabla 3. La administración de gonadotrofinas a los animales expuestos neonatalmente a testosterona indujo la ovulación en todos los animales tratados independientemente de si el tratamiento fue realizado con PMSG y hCG o solo con hCG. El número de ovocitos obtenidos fue menor que en los animales control con el mismo tratamiento de inducción pero la diferencia no alcanzó a ser significativa.

**Tabla 3. Número de ratas que ovularon y número de ovocitos recuperados de las trompas (media  $\pm$  s.e.m.) luego de la estimulación gonadotrófica**

Grupo	PMSG + hCG		hCG	
	No. Ratas ovulantes	Número de ovocitos	Ratas e ovularon	Número de ovocitos
Control	4 (4)	11.2 $\pm$ 0.5	4 (4)	10.5 $\pm$ 0.6
Testosterona	5 (5)	5.75 $\pm$ 3.3	5 (5)	7 $\pm$ 2.31

Los números entre parentesis indican el número total de animales utilizados por grupo

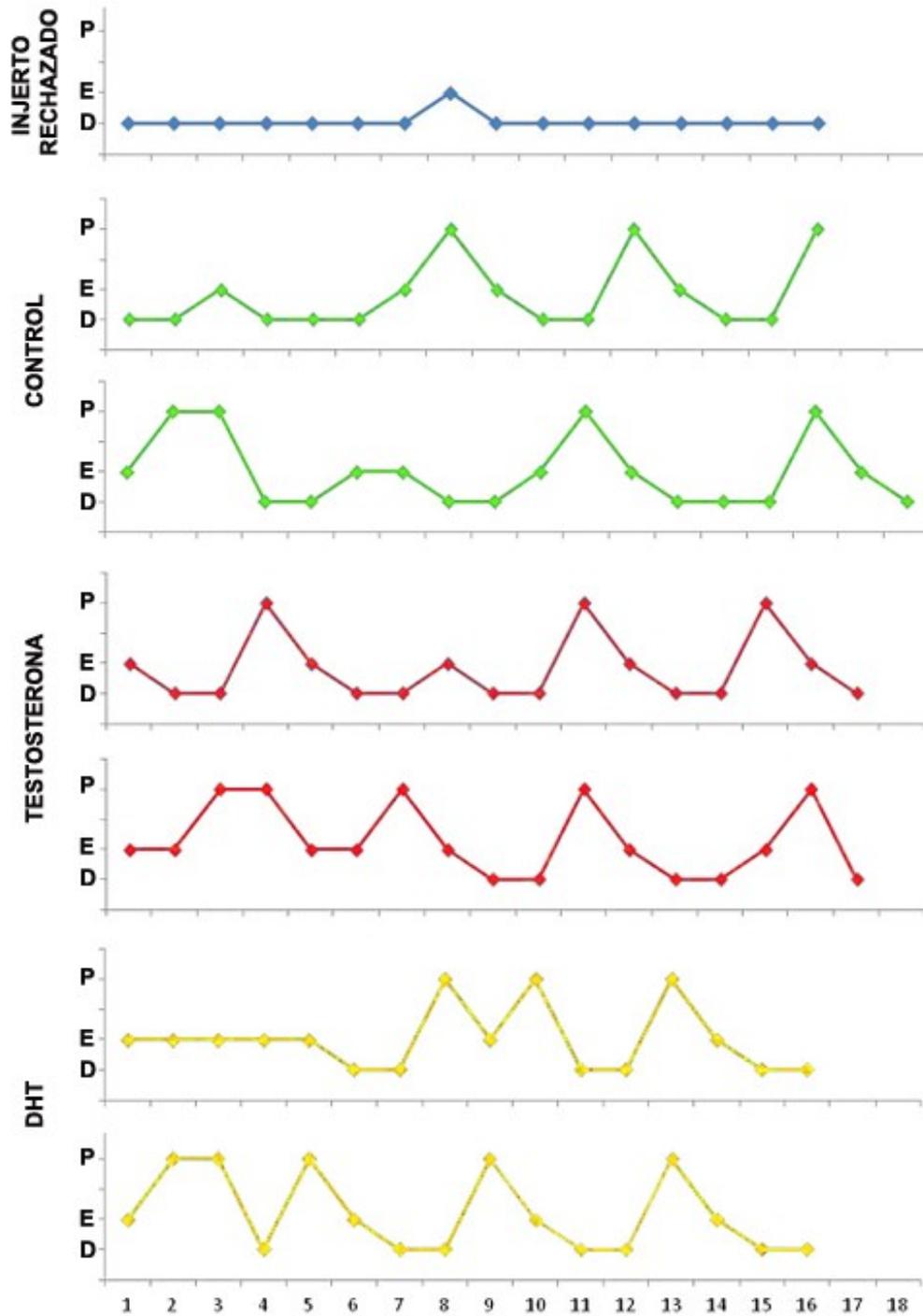
### **Injertos**

Para corroborar dichos resultados y asegurar que los folículos del ovario androgenizado son capaces de funcionar de manera normal, se diseñó un experimento en el que ovarios de animales prepuberes de los grupos control, Testosterona o DHT fue injertado en forma subcutánea en hembras adultas castradas y sacrificados 20 días después.

### **Ciclicidad**

El 100% de los animales que fueron injertados con ovarios del grupo control restablecieron la actividad cíclica (5 de 5). En el grupo que recibió injertos del grupo Testosterona un 75% mostraron signos de ciclicidad irregular (6 de 8) mientras que en el grupo DHT un 66% (4 de 6) reasumió algún tipo de actividad cíclica. En aquellos que se encontró diestro continuo se asumió que se produjo un rechazo al injerto (Fig. 21), lo cual fue comprobado posteriormente mediante el análisis histológico de los injertos. Estos se caracterizaron por una importante infiltración leucocitaria entre las estructuras ováricas que aún persistían. En los casos en que el injerto no fue rechazado, se logró una restitución de la actividad cíclica, algunas veces irregular, independientemente del grupo al que pertenece el injerto.

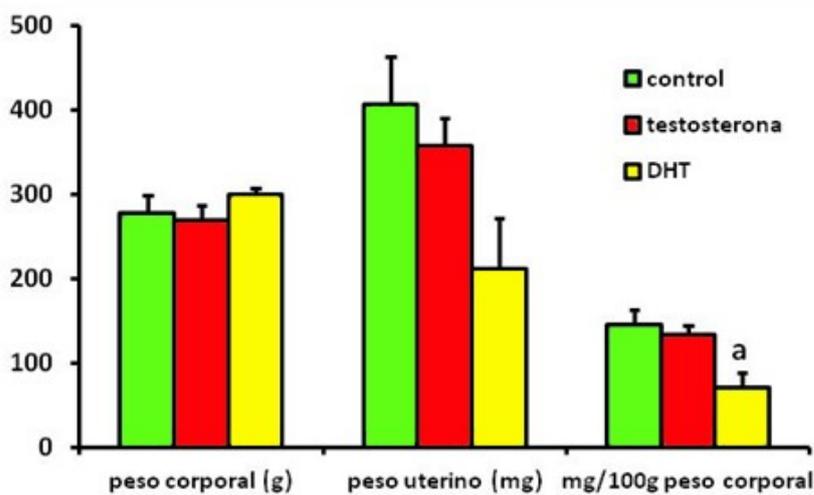
**Figura 21 – Control de la actividad estral de ratas adultas controles castradas e injertadas en forma subcutánea con ovarios prepuberales provenientes de los grupos control, testosterona o DHT.**



Note la ausencia de actividad cíclica en aquellos injertos que resultaron rechazados. . D- diestro; P- proestro; E- estro.

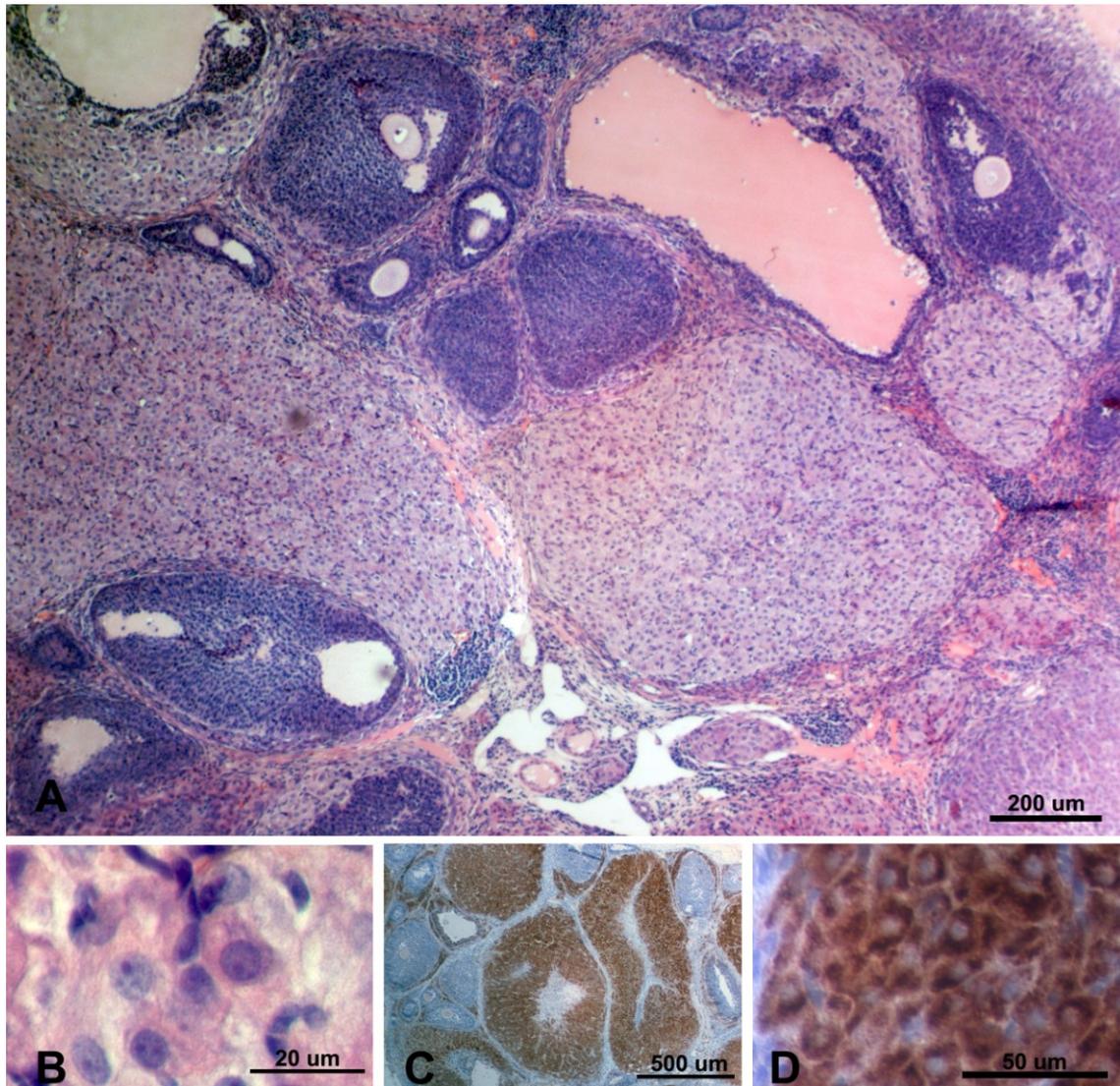
No se encontraron diferencias significativas en el peso uterino de las receptoras en que se restableció alguna actividad cíclica independientemente del grupo al que pertenecieran (Fig. 22), aunque los animales que recibieron injertos del grupo DHT mostraron una tendencia a un menor peso uterino. Al corregir los datos en base al peso corporal, este grupo alcanzó un peso uterino significativamente menor.

**Figura 22 - Efectos del injerto subcutáneo de ovario en ratas adultas controles castradas sobre el peso corporal y uterino.**



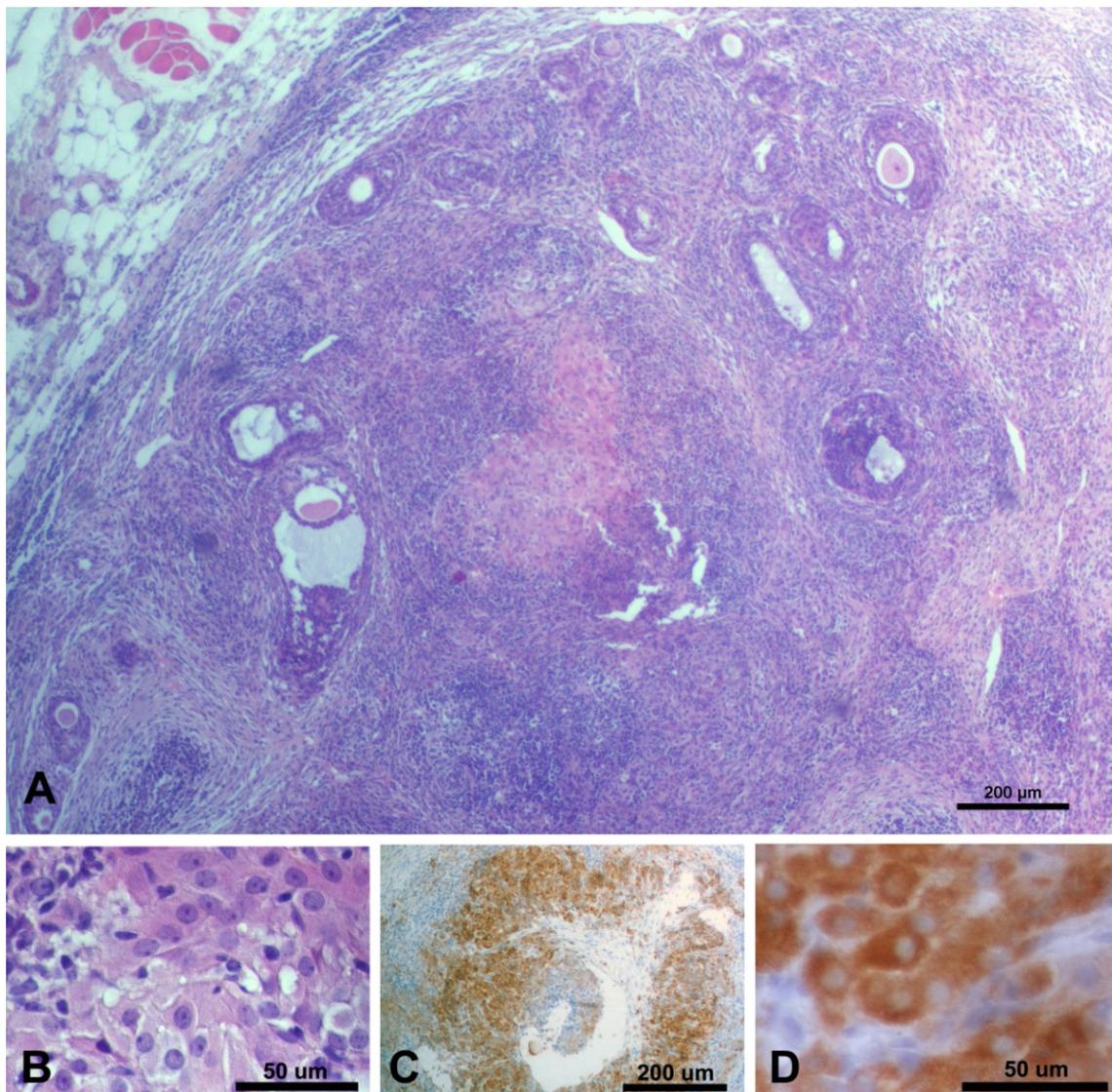
El examen histológico de los injertos que no fueron rechazados mostró la presencia de cuerpos lúteos en número variable, incluso en los animales pertenecientes al grupo de testosterona. En ningún caso se detectó la presencia de estructuras con características de quistes. La detección inmunohistoquímica de la enzima  $3\beta$ -HSD permitió confirmar su actividad sintetizadora de esteroides (Figs. 23-24-25)

**Figura 23 - Injerto de ovario prepuber control en receptora control castrada.**



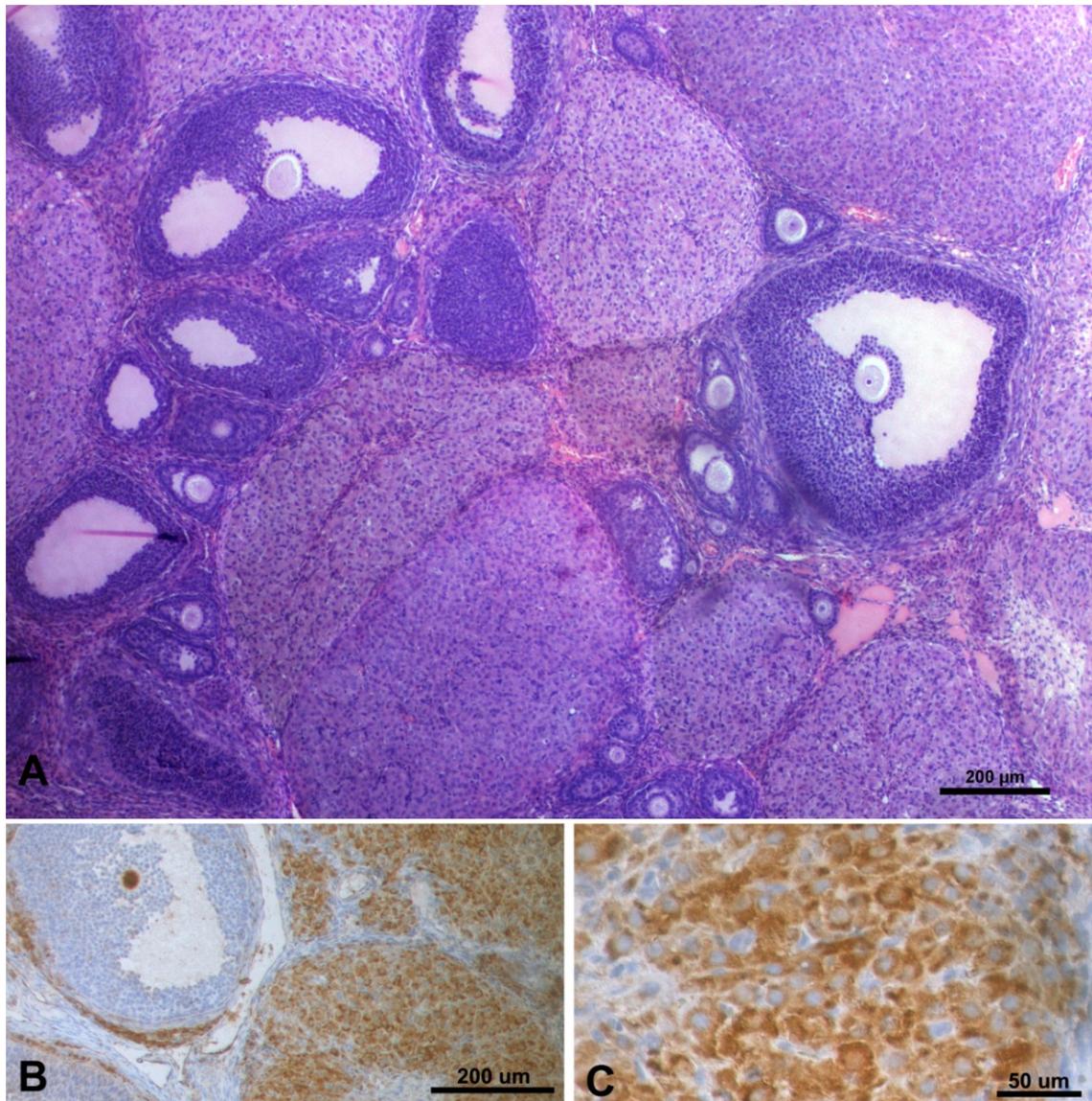
El injerto es equivalente a un ovario correspondiente a los 40DPN. **A** - Aspecto general del injerto. No se observan elementos de rechazo. Se reconocen varios folículos en diferentes fases de crecimiento así como cuerpos lúteos que indican la ocurrencia de ovulación. **B** - Sector de un cuerpo lúteo a gran aumento. La morfología es similar a la encontrada en ovarios *in situ*. **C** - Detección inmunohistoquímica de la enzima 3β-HSD que marca células de la teca interna y células luteales. **D** - Detalle de un cuerpo lúteo donde se observa la marca citoplasmática correspondiente a la presencia de la enzima en las células luteales.

**Figura 24 - Injerto de ovario prepuber expuesto a testosterona durante los 1 a 5DPN en receptora control castrada.**



El injerto es equivalente a un ovario correspondiente a los 40DPN. **A** - Aspecto general del injerto. Aunque se observan elementos que muestran cierto grado de infiltración leucocitaria, también se reconocen varios folículos en diferentes fases de crecimiento así como una estructura con aspecto de cuerpos lúteo en el centro de la fotografía. **B** - Sector del cuerpo lúteo a gran aumento. La morfología es similar a la encontrada en ovarios in situ. **C** - Detección inmunohistoquímica de la enzima 3β-HSD mostrando marca en las células luteales. **D** - Detalle a mayor aumento de las células luteales mostrando la marca citoplasmática correspondiente a la presencia de la enzima del mismo modo que en los injertos del grupo control.

**Figura 25 - Injerto de ovario prepuber expuesto a DHT durante 1 a 5DPN en receptora control castrada.**



El injerto es equivalente a un ovario correspondiente a los 40DPN. **A** - Aspecto general del injerto. Se reconocen folículos en crecimiento así como numerosos cuerpos lúteos indicando la ocurrencia de ovulación. **B** - Detección inmunohistoquímica de la enzima  $3\beta$ -HSD mostrando marcación en células de la teca interna y células luteales. Las células de la granulosa son negativas. **C** - Detalle a mayor aumento de un sector de un cuerpo lúteo inmunomarcado para la enzima  $3\beta$ -HSD. Se observa claramente la marca citoplasmática.

**Los ovarios de los animales androgenizados durante el periodo neonatal son capaces de ovular tanto al ser estimulados con gonadotrofinas como al ser colocados en un animal castrado. Es decir que la principal alteración en estos animales se vincula al hipotálamo-hipófisis, y en mayor medida a una secreción alterada de LH.**

**Objetivo específico 5:** *Comparar los efectos de dos andrógenos, uno aromatizable (testosterona) y otro no aromatizable (DHT) sobre la función ovárica.*

Los resultados obtenidos muestran que los efectos inducidos por la testosterona parecen concentrarse en el sistema hipotálamo-hipofisario sin un efecto directo sobre el ovario, mientras que los de la DHT afectan en mayor medida a la población folicular del ovario y con efectos acumulativos en un plazo mucho más largo llevando a una disminución de la capacidad ovulatoria y el desarrollo tardío de quistes. Las diferencias encontradas entre ambos modelos de androgenización neonatal podrían en parte ser debidos a la capacidad de aromatización de la testosterona y su posibilidad de estimular tanto receptores androgénicos como estrogénicos.

**Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que un ambiente neonatal hiperandrogénico promueve:**

1. El incremento de la **dotación folicular** post-tratamiento, la que se mantiene hasta la pubertad, momento en que dicho número se corrige.
2. Cambios en el **patrón de crecimiento folicular** que se relacionan con la capacidad de aromatización del andrógeno administrado.
3. El proceso de **transformación de folículo a quiste**. Esta transformación se observa desde la pubertad al administrar testosterona y en la adultez por la administración de DHT. Los cambios vinculados a la transformación de folículo a quiste, involucran a etapas foliculares antrales tardías.
4. Modificaciones en el **tamaño del ovocito** presente en las estructuras quísticas y alteraciones más marcadas en los animales expuestos a DHT, sin cambios aparentes en la presencia y distribución de varios factores asociados al crecimiento y la maduración folicular.
5. El bloqueo de la **ovulación espontánea** en los animales expuestos a testosterona. Dicho proceso puede inducirse después de la administración de hCG.
6. El incremento de la **densidad de inervación simpática** del ovario en etapas posteriores a la formación de quistes inducidos por la administración de testosterona. La denervación quirúrgica no revierte la condición quística y anovulatoria.

## DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta tesis apoyan la hipótesis de que la alteración del ambiente androgénico neonatal es capaz de producir cambios en los patrones de crecimiento folicular y funcionalidad del ovario, siendo más evidentes a medida que el animal madura. El hiperandrogenismo neonatal induce alteraciones tanto a nivel central como periférico. En el ovario neonatal los andrógenos actúan como un factor de supervivencia ovocitario, sin embargo no inducen cambios aparentes sobre la expresión de factores de crecimiento ni en la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de hormonas esteroideas en el folículo en crecimiento. Dado que la disfuncionalidad del ovario adulto, estuvo acompañada por un aumento de la cantidad de fibras simpáticas, postulamos que un ambiente neonatal hiperandrogénico induce un adelanto de los eventos fisiológicos que son propios del envejecimiento.

### **Efectos sobre el crecimiento y desarrollo corporal y reproductivo**

Como ha sido mostrado por varios autores (Hotchkiss *et al.* 2007, Wu *et al.* 2010, Dean *et al.* 2012), la androgenización indujo cambios corporales y reproductivos como parte de un evento de programación durante el periodo neonatal que permanecieron hasta la edad adulta. Uno de los efectos inducido por el tratamiento con cualquiera de los andrógenos utilizados fue un incremento postpuberal en el peso corporal. Este hallazgo está en concordancia con descripciones previas que muestran efectos similares de los andrógenos durante el periodo neonatal o prepuberal sobre la ganancia de peso corporal (Demissie *et al.* 2008, Tyndall *et al.* 2012, Nohara *et al.* 2013). Se ha demostrado que la presencia de disfunciones metabólicas (incluyendo sobrepeso y/o obesidad) durante la infancia y el periodo peripuberal del humano, son de los primeros signos que se observan en las adolescentes que desarrollan SOP. Dicha sintomatología está además, generalmente asociada con hiperandrogenemia (Ibáñez *et al.* 2003, Coviello *et al.* 2006, Rosenfield 2007, Mäntyselkä *et al.* 2014).

A nivel reproductivo, en nuestro estudio los animales androgenizados mostraron ausencia de apertura vaginal. En los roedores, en condiciones normales, la luz de la vagina en desarrollo se extiende progresivamente en sentido cráneo-caudal

durante los periodos neonatal e infantil, y el proceso culmina con su apertura alrededor de la quinta semana del desarrollo postnatal. Este proceso coincide con un incremento de los estrógenos circulantes producidos por el ovario y un rápido proceso de apoptosis que se produce en el epitelio del extremo distal de la vagina y en el septum que cierra la cavidad vaginal (Rodriguez et al. 1997). Se ha sugerido que la ausencia de apertura vaginal observada en hembras expuestas neonatalmente a estrógenos (o andrógenos como en nuestro estudio) puede deberse a alteraciones en el estroma vaginal que promueven la hiperplasia del epitelio vaginal (Yoshida *et al.* 2011, Katoh *et al.* 2013). Miyagawa et al. (Miyagawa *et al.* 2010) reportan que la androgenización temprana estimula la proliferación y diferenciación del epitelio vaginal independiente de los estrógenos, y que este efecto estaría mediado por la activación del receptor alfa de estrógenos (dado que en ratones KO para el receptor alfa de estrógenos expuestos a DHT el epitelio vaginal resulta atrófico); aunque no pueden descartarse efectos sobre el propio receptor de andrógenos o efectos epigenéticos. En nuestro caso, los efectos sobre los genitales externos fueron más marcados en los animales expuestos a DHT que en los expuestos a testosterona, lo que podría explicarse por el efecto androgénico más marcado de la DHT, y su natural efecto virilizante sobre los derivados del seno urogenital y el desarrollo de los genitales externos masculinos (Wilson *et al.* 2002).

### **Efectos sobre el ovario y la población folicular**

Además de los cambios en los genitales externos, la androgenización neonatal indujo el desarrollo de estructuras foliculares quísticas de forma similar a como ha sido reportado luego de la administración de valerato de estradiol, un estrógeno de depósito, como inductor de una condición similar al SOP (Lara *et al.* 2000b, Rosa *et al.* 2003). Los resultados presentados por Gorski (Gorski 1963) han indicado que las alteraciones ováricas inducidas por la administración postnatal de estrógenos son diferentes de aquellas inducidas por los andrógenos. Los datos encontrados en nuestro estudio agregan algunas diferencias morfológicas y funcionales a las características descritas en estudios previos y que hacen a los modelos de SOP inducidos por estrógenos o andrógenos diferentes. En nuestro estudio la presencia de estructuras quísticas en los ovarios de los animales expuestos a testosterona se detectó ya a los 40 DPN. Estas estructuras exhibían ovocitos y una capa granulosa

saludable, aún en los quistes de mayor tamaño, y su generación podría ser explicada por la supervivencia de folículos “preovulatorios” que carecen de una señal ovulatoria y que crecen en un medio en el que las señales de supervivencia prevalecen sobre las señales de atresia (Brawer *et al.* 1986). Por el contrario, los quistes inducidos por valerato de estradiol exhiben una cavidad antral muy grande, con una capa granulosa muy atenuada y un compartimiento tecal anormalmente engrosado, además de necesitar un periodo de 56 días para alcanzar las características de un quiste completamente desarrollado (Brawer *et al.* 1986, Lara *et al.* 2000b, Rosa *et al.* 2003). Si bien los quistes formados en los ovarios de animales expuestos a DHT presentaban características similares a los inducidos por el tratamiento con testosterona, su aparición fue más tardía y en un número más bajo, indicando que ambos andrógenos inducen diferentes alteraciones funcionales sobre el ovario.

Si bien las características diferenciales de los quistes resultaron muy llamativas, realizamos un análisis de la población folicular en un intento de dilucidar si las alteraciones encontradas podrían ser detectadas en estadios más tempranos del desarrollo folicular y así explicar las diferencias encontradas entre ambos tratamientos.

Nuestros resultados muestran que ambos andrógenos indujeron un incremento en la **dotación folicular** prepuberal comparado con los ovarios del grupo control. Dicho número fue parcialmente corregido a la pubertad. Este incremento en el número de folículos ováricos al fin del periodo de tratamiento (5 DPN) puede ser explicado por una reducción en el número de ovocitos que son normalmente perdidos durante el periodo de ensamblaje folicular. Varios estudios mostraron que la dotación folicular está determinada tanto por el número de ovogonias presentes en los nidos ovogoniales durante la vida fetal, como por la pérdida de ovocitos (por apoptosis) durante el periodo de ensamblaje folicular (Skinner 2005, Pepling 2012). En nuestro caso, los efectos sobre la dotación folicular no ocurrieron en el periodo fetal, por lo que descartamos su efecto sobre la formación y el número de ovogonias, y nos permite sugerir que los andrógenos actúan como un factor de supervivencia de los ovocitos durante el periodo neonatal en la rata. Varios mecanismos han sido identificados en la regulación de este proceso al nacimiento, incluyendo la modulación de moléculas anti o

proapoptóticas (Ratts *et al.* 1995, Flaws *et al.* 2001, Greenfeld *et al.* 2007). Incluso, los estudios de Salvetti *et al.* (2012) han mostrado que los esteroides sexuales son capaces de modificar la expresión de estas moléculas en el ovario, fundamentalmente disminuyendo la expresión de BAX, una molécula proapoptótica durante el periodo de ensamblaje folicular. Otra posibilidad podría estar relacionada a un incremento en el número de células pregranulosas que permita rescatar un mayor número de ovocitos durante el periodo de ensamblaje folicular (Mork *et al.* 2012, Pepling 2012). Se han identificado varias vías de señalización entre el ovocito y las células foliculares que se activan durante este periodo del desarrollo del ovario, entre ellas componentes de la vía Notch (Manosalva *et al.* 2013). Las células somáticas que participan en la ruptura de los nidos de células germinales expresan Notch, y su número se incrementa durante el ensamblaje folicular (Vanorny *et al.* 2014). Resultados obtenidos por DeFalco *et al.* (2013) sugieren que la testosterona puede facilitar el reclutamiento de células pregranulosas expresando Notch, facilitando así la supervivencia folicular. La expresión alterada de otras moléculas de señalización extracelular como factores de crecimiento (Bristol-Gould *et al.* 2006, Kerr *et al.* 2009) y hormonas (Kipp *et al.* 2007, Chen *et al.* 2009, Pepling 2012) podrían ser otro mecanismo implicado en la regulación de la dotación folicular que podría ser alterado por la administración de andrógenos. Varios estudios han mostrado la existencia de la maquinaria para producir y detectar múltiples vías de señalización esteroidea en estas etapas del desarrollo del ovario (Fowler *et al.* 2011, Dutta *et al.* 2014). Nuestros resultados constituyen un aporte más a las evidencias que apoyan la idea de los andrógenos como moduladores de la supervivencia del folículo primordial.

Otro hallazgo relevante de nuestro estudio es que el mayor número de folículos totales estuvo asociado a una disminución significativa del tamaño de los ovocitos presentes en los folículos primordiales de los ovarios de los animales androgenizados. Dado que el crecimiento folicular es un proceso coordinado de señalizaciones entre el ovocito y las células foliculares que lo rodean (Makker *et al.* 2014), es posible hipotetizar que esta modificación en el tamaño del ovocito encontrada tempranamente, se asocie a las alteraciones del desarrollo folicular en edades más avanzadas. Por otra parte, varios reportes muestran que luego de

procedimientos de fecundación in vitro los ovocitos humanos de diámetro menor a la media muestran más dificultades para completar su desarrollo que los ovocitos de tamaño normal (Leary *et al.* 2015, Sanchez *et al.* 2015).

Aunque nuestras observaciones muestran que la androgenización induce un aumento en la dotación folicular, luego este número fue rectificado en la edad puberal, alcanzando números similares a los encontrados en los animales del grupo control. Se ha postulado la existencia de mecanismos de control que sensorían la población folicular removiendo el exceso de folículos generados durante la ruptura de los nidos ovogoniales. Esto podría promover la calidad de los gametos durante la edad adulta por eliminación de aquellos que presenten algún tipo de alteración (Flaws *et al.* 2001, Bristol-Gould *et al.* 2006, Tingen *et al.* 2009) y sería concordante con nuestros hallazgos. Si la presencia de ovocitos de menor tamaño encontrados a los 5 DPN influye sobre estos mecanismos es un evento que debe ser explorado.

### **Los efectos de la exposición neonatal a testosterona o DHT sobre el ovario son diferentes**

Nuestros resultados muestran diferencias en la respuesta del ovario a la exposición neonatal a testosterona o DHT. Así, la administración de testosterona induce el desarrollo de estructuras quísticas ya desde la pubertad. El análisis de la población folicular no arrojó alteraciones ni en la dinámica de crecimiento folicular ni en la detección inmunohistoquímica de diversos factores de crecimiento o enzimas relacionadas con la esteroidogénesis en los folículos en crecimiento, sin embargo, en ningún caso se produjo la ovulación. Esto sugiere que los efectos del tratamiento neonatal con testosterona no son producidos primariamente sobre el ovario, y que probablemente su principal acción sea a nivel hipotálamo-hipofisario. La presencia de quistes tan pronto como la edad peripuberal podría estar asociada con la persistencia de folículos preovulatorios que no alcanzaron a ovular. La falla en la ovulación podría deberse a alteraciones en la secreción de gonadotrofinas, en particular de LH, ya que el crecimiento folicular dependiente de gonadotrofinas fue normal (indicando presencia de FSH) hasta las fases finales de maduración folicular, momento en que la LH debería

estimular la ovulación (Gorski 1963). Es posible sugerir entonces una alteración en la secreción gonadotrófica, en particular en la secreción de LH probablemente modificando el modo fásico de secreción. Estudios de androgenización prenatal en roedores han mostrado la existencia de una ventana temporal durante la cual se determina la feminización o virilización del sistema GnRHérgico hipotálamico que controla la secreción de gonadotrofinas (Rhees RW 1997, Sullivan & Moenter 2004, Foecking *et al.* 2005). En los fetos machos, los andrógenos producidos por los testículos fetales masculinizan el hipotálamo, el que se vuelve incapaz de producir picos preovulatorios de gonadotrofinas en la edad adulta. En ausencia de esta exposición a andrógenos, el hipotálamo sigue una vía por defecto y madura con la capacidad de realizar secreciones de gonadotrofinas en forma fásica, típico de la hembra adulta (Crowley 1988, Horvath *et al.* 1997). Esta determinación del sistema GnRHérgico en la rata ocurre durante los últimos días de la gestación (días 16 a 19), coincidente con el pico de testosterona producido por los fetos machos (Weisz & Ward 1980). Sin embargo, nuestros resultados nos permiten sugerir que la testosterona neonatal está actuando sobre este proceso de diferenciación hipotalámico por lo que probablemente la ventana temporal sea más amplia, extendiéndose hasta el periodo neonatal. Dado que el tratamiento neonatal con DHT no provoca estos cambios y permite la ovulación, es posible que los efectos sobre el sistema GnRHérgico se deban a la aromatización de la testosterona a estradiol. Apoyando esta interpretación, encontramos varios estudios en los que se ha descrito la aromatización local de testosterona en regiones hipotalámicas relacionadas con el control de las funciones reproductivas (Amateau *et al.* 2004, Konkle & McCarthy 2011). Además, es probable que los altos niveles de estradiol encontrados en los animales adultos que fueron expuestos neonatalmente a testosterona, sumados a los bajos niveles de progesterona debidos a la ausencia de luteinización, puedan contribuir al mantenimiento de este estado. La posibilidad de un efecto central inducido por testosterona es reforzada por la adecuada capacidad ovulatoria mostrada por estos animales luego del estímulo con hCG, o de la presencia de ovulación en el injerto subcutáneo de ovario expuesto a testosterona en ratas receptoras adultas castradas. No obstante todas las consideraciones previas, no podemos descartar que la testosterona tenga un efecto directo sobre el ovario, ya que tanto el receptor de andrógenos como el receptor de

estrógenos alfa han sido localizados en ovarios de ratas durante el periodo neonatal (Sar & Welsch 1999, Galas *et al.* 2012). La actividad aromatasas también ha sido descrita en el ovario en esta edad (George & Ojeda 1987).

Por otra parte, los resultados obtenidos utilizando un andrógeno no aromatizable (DHT) mostraron la ocurrencia de ovulación, y que el desarrollo quístico, si bien estuvo presente, tuvo lugar más tardíamente. Resultados de Sotomayor-Zárate *et al.* (2011) utilizando una única inyección neonatal de DHT no reportan cambios en la morfología de los ovarios a los 60 DPN. Nuestros datos apoyan la ausencia de modificaciones en la dinámica folicular en periodos tempranos luego de la exposición a DHT, pero también ponen en relevancia que la funcionalidad ovárica fue alterada más tardíamente. Este desarreglo se caracterizó por un incremento en el número de folículos preantrales a los 180 DPN. Considerando que el crecimiento folicular preantral es mayormente independiente de las señales gonadotróficas (Edson *et al.* 2009), el incremento encontrado permite apoyar la idea de un efecto directo de los andrógenos sobre los tejidos ováricos (Fowler *et al.* 2011, Lebbe & Woodruff 2013). El desarrollo de estructuras quísticas y la gradual desaparición de los cuerpos lúteos en ratas a partir de los 10 meses de edad ha sido descrito como un evento normal del envejecimiento (Acuna *et al.* 2009). Dado que la administración de DHT indujo la aparición más temprana de estas características, nuestros resultados nos permiten sugerir un envejecimiento prematuro del ovario que llevaría a un acortamiento de su funcionalidad.

Como hemos dicho previamente, los efectos diferentes de la exposición neonatal a uno u otro andrógeno sobre la función ovárica podrían ser explicados por una activación diferencial de receptores esteroideos durante el período de tratamiento. La DHT, como un andrógeno no-aromatizable, podría actuar solo sobre el receptor androgénico, mientras que la testosterona podría activar tanto el receptor androgénico como estrogénico, explicando la severidad más marcada del tratamiento con testosterona.

**Los cambios en la inervación simpática son secundarios a las alteraciones del crecimiento folicular**

Sumadas a las alteraciones del crecimiento folicular, nuestros resultados muestran en los animales tratados con testosterona, un incremento en la densidad de inervación simpática posterior al desarrollo de los quistes foliculares. Heider et al. (Heider *et al.* 2001) reportó un aumento de los nervios autonómicos asociados con la edad y la condición poliquística en el ovario humano. Estudios más recientes (Wojtkiewicz *et al.* 2014) han confirmado estos resultados, mostrando significativos cambios en el patrón de inervación de ovarios poliquísticos humanos, con un incremento en la inervación noradrenérgica. En modelos animales de ovario poliquístico, en particular aquellos obtenidos por el tratamiento con valerato de estradiol, la inducción o el mantenimiento del crecimiento folicular alterado ha sido asociado con una activación de la inervación simpática (Lara *et al.* 2000b, Rosa *et al.* 2003, Sotomayor-Zarate *et al.* 2008b, Mannerås *et al.* 2009). En nuestro caso, los quistes foliculares en las ratas androgenizadas aparecieron en forma previa al incremento de la densidad de fibras simpáticas, y la simpatectomía quirúrgica no logró restaurar la actividad cíclica ni la ovulación. El aumento de la densidad de inervación simpática del ovario posterior al desarrollo de los quistes podría ser asociado con un intento de restaurar la actividad hormonal normal o ser un signo de pérdida de funcionalidad ovárica asociado con el envejecimiento del órgano. Reportes anteriores de nuestro laboratorio mostraron un aumento de la actividad ovárica simpática asociada con cambios del desarrollo folicular en ovarios de animales viejos (Chavez-Genaro *et al.* 2007). El estradiol ha sido sugerido como un posible mediador de estos cambios dado que es capaz de modificar los niveles de expresión de TH (Shinohara *et al.* 1998, Lara *et al.* 2000b, Rosa *et al.* 2003, Anesetti *et al.* 2009). Otra explicación posible del aumento de fibras ováricas simpáticas implica una acción directa de los andrógenos sobre los tejidos ováricos durante el ensamblaje folicular, probablemente mediados a través de algún componente/s de la familia de las neurotrofinas. Estas están presentes en los ovarios en desarrollo y han sido implicadas en el ensamblaje de los folículos primordiales, el desarrollo folicular temprano, y la diferenciación inicial de los folículos secundarios en estructuras sensibles a las gonadotrofinas, además de estimular el crecimiento de las neuritas simpáticas (Dissen *et al.* 1995, Dissen *et al.* 2002, Kerr *et al.* 2009, Dorfman *et al.*

2014) lo que permitiría explicar tanto las alteraciones encontradas en la población folicular como en la inervación simpática del ovario.

En nuestro estudio, la denervación quirúrgica precoz del ovario no consiguió revertir la condición anovulatoria, sin embargo, otros estudios han mostrado que la denervación quirúrgica fue capaz de restaurar la actividad cíclica del ovario y la ovulación. Reportes por Lara *et al.* (2000a) y Rosa *et al.* (2003) mostraron que la exposición a EV durante los períodos adultos o infantiles causaron una condición poliquística que fue revertida después de la denervación quirúrgica del SON. Sin embargo, no se consiguieron los mismos resultados cuando se exponen al mismo tratamiento hembras durante el periodo neonatal (Sotomayor-Zarate *et al.* 2008b), en coincidencia con nuestros resultados. Por lo tanto, otro punto a considerar en la severidad de la condición poliquística inducida por la administración de testosterona neonatal es el período de la vida en el cual fue realizado el tratamiento. Nuestros resultados apoyan el concepto del período neonatal (o de ensamblaje folicular) como una ventana crítica para la exposición hormonal a esteroides sexuales, tal como ha sido propuesto por Cruz *et al.* (2012). Por otra parte, la exposición neonatal a DHT no indujo las mismas modificaciones en la inervación simpática que la testosterona. Esto puede atribuirse a la menor severidad de la condición poliquística que desarrollan estos animales, y si como proponemos, la hiperinervación simpática es secundaria al desarrollo de los quistes, es de esperar que animales que ovulan y que desarrollan un menor número de estas estructuras, no presenten importantes alteraciones en la inervación noradrenérgica, lo que no descarta que efectos semejantes sobre la inervación se puedan hacer patentes en plazos de tiempo más largos a los empleados en este estudio.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo mostramos que la exposición a andrógenos de ratas hembras neonatas ejerce un efecto programador sobre el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, y que la severidad de sus efectos está relacionada a la capacidad de aromatización a estrógenos. Además, aportamos evidencias que muestran que los andrógenos ejercen un efecto protector para los ovocitos durante el periodo de ensamblaje folicular.

Nuestros resultados muestran que la testosterona (y probablemente los estrógenos) actúa esencialmente sobre la unidad hipotálamo-hipofisaria, afectando principalmente la secreción de LH. Estos resultados apoyan la idea de que la ventana de programación del sistema GnRHérgico a nivel hipotalámico es más amplia de lo que se ha postulado, y que al menos en el periodo neonatal depende fundamentalmente del efecto de los estrógenos, ya que este efecto no estuvo presente en los animales expuestos a un andrógeno no aromatizable (DHT). Los efectos sobre la inervación simpática del ovario parecen ser secundarios al crecimiento de las estructuras quísticas.

Por su parte, la DHT no pareció afectar la secreción gonadotrófica, por lo menos en las etapas iniciales, y sus efectos se observaron fundamentalmente a largo plazo afectando la dinámica del crecimiento folicular favoreciendo el desarrollo de los estadios preantrales y disminuyendo la tasa ovulatoria.

En resumen, nuestros resultados evidencian el efecto programador de los andrógenos sobre el sistema reproductivo de la hembra.

Las variaciones en los efectos inducidos por los andrógenos durante el desarrollo dependen de la capacidad de aromatización de dicho esteroide.

Los hallazgos reportados en esta tesis podrían ayudar a explicar en parte la heterogeneidad en las manifestaciones clínicas presentes en patologías como el SOP, las que podrían estar asociadas a cambios hormonales sutiles durante el desarrollo de la población folicular.

## PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en la presente tesis permiten abrir distintas líneas de investigación:

**1.- Identificación de las señales o factores que podrían estar vinculados a la supervivencia de los ovocitos durante el periodo de ensamblaje folicular y que parecen ser estimuladas por los andrógenos.** Para ello proponemos utilizar aproximaciones in vivo e in vitro (cultivo de ovarios neonatales) y analizar la expresión de moléculas vinculadas con la supervivencia o muerte de ovocitos (activina, inhibina, folistatina) así como los índices de proliferación y muerte celular mediante el uso de indicadores de proliferación (Ki67, incorporación BrdU) y la expresión de marcadores pro y antiapoptóticos (Bax, Bcl-2) comparando el efecto de la androgenización neonatal con distintos andrógenos y la situación control.

**2.- Evaluar si los cambios en el ovario inducidos por los tratamientos androgénicos se asocian con modificaciones en la matriz extracelular del ovario.** Dado que el crecimiento folicular está estrechamente vinculado a modificaciones de la matriz extracelular que permiten los cambios de tamaño y posición que sufre el folículo a lo largo de su desarrollo así como también la matriz extracelular puede influir en la señalización paracrina que controla estos procesos, proponemos analizar desde el punto de vista morfológico y bioquímico la presencia y distribución de elementos de la matriz que podrían estar modificados por la exposición a andrógenos en tres momentos que parecen ser relevantes de acuerdo a los resultados presentados en esta tesis: 1) al finalizar el ensamblaje folicular; 2) en la pubertad, cuando aparecen los primeros quistes; 3) en la edad adulta, cuando se concentran las categorías preantrales. En particular, nos interesa analizar la expresión de fibrilina (que ha sido implicada en el desarrollo del SOP), colágenos y metaloproteinasas de la matriz.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM & Dumesic DA** 2005 Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update* **11** 357-374.
- Acuna E, Fornes R, Fernandois D, Garrido M, Greiner M, Lara H & Paredes A** 2009 Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7** 64.
- Ahmed CE, Dees WL & Ojeda SR** 1986 The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* **118** 1682-1689.
- Amalfi S, Velez LM, Heber MF, Vighi S, Ferreira SR, Orozco AV, Pignataro O & Motta AB** 2012 Prenatal hyperandrogenization induces metabolic and endocrine alterations which depend on the levels of testosterone exposure. *PLoS One* **7** e37658.
- Amateau SK, Alt JJ, Stamps CL & McCarthy MM** 2004 Brain Estradiol Content in Newborn Rats: Sex Differences, Regional Heterogeneity, and Possible de Novo Synthesis by the Female Telencephalon. *Endocrinology* **145** 2906-2917.
- Amer SAK, Gopalan V, Li TC, Ledger WL & Cooke ID** 2002 Long term follow-up of patients with polycystic ovarian syndrome after laparoscopic ovarian drilling: clinical outcome. *Human Reproduction* **17** 2035-2042.
- Anesetti G, Lombide P & Chavez-Genaro R** 2009 Prepubertal estrogen exposure modifies neurotrophin receptor expression in celiac neurons and alters ovarian innervation. *Auton Neurosci* **145** 35-43.
- Anesetti G, Lombide P, D'Albora H & Ojeda SR** 2001 Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell Tissue Res* **306** 231-237.
- Barker D & Clark P** 1997 Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod* **2** 105-112.
- Barria A, Leyton V, Ojeda S & Lara H** 1993 Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* **133** 2696 - 2703.
- Beckman DA & Feuston M** 2003 Landmarks in the development of the female reproductive system. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **68** 137-143.
- Begum S, Papaioannou VE & Gosden RG** 2008 The oocyte population is not renewed in transplanted or irradiated adult ovaries. *Hum Reprod* **23** 2326-2330.
- Brawer J, Munoz M & Farookhi R** 1986 Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod* **35** 647 - 655.
- Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Cook RW, Kipp JL, Shea LD, Mayo KE & Woodruff TK** 2006 Postnatal regulation of germ cells by activin: The establishment of the initial follicle pool. *Developmental Biology* **298** 132-148.
- Burden HW & Lawrence IE, Jr.** 1978 Experimental studies on the acetylcholinesterase-positive nerves in the ovary of the rat. *Anat Rec* **190** 233-241.
- Burden HW, Leonard M, Smith CP & Lawrence IE, Jr.** 1983 The sensory innervation of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *Anat Rec* **207** 623-627.
- Burger HG** 2002 Androgen production in women. *Fertil Steril* **77 Suppl 4** S3-5.
- Connor KL, Vickers MH, Beltrand J, Meaney MJ & Sloboda DM** 2012 Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *The Journal of Physiology* **590** 2167-2180.
- Coviello A, Legro R & Dunaif A** 2006 Adolescent girls with polycystic ovary syndrome have an increased risk of the metabolic syndrome associated with increasing androgen levels independent of obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* **91** 492 - 497.
- Crosignani PG & Nicolosi AE** 2001 Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity. *Human Reproduction Update* **7** 3-7.

- Crowley WR** 1988 Sex differences in the responses of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone and catecholamine systems to ovarian hormones and naloxone: implications for sexual differentiation of luteinizing hormone secretion in rats. *Brain Research* **461** 314-321.
- Cruz G, Barra R, Gonzalez D, Sotomayor-Zarate R & Lara HE** 2012 Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertil Steril* **98** 1283-1290.
- Chavez-Genaro R, Lombide P, Dominguez R, Rosas P & Vazquez-Cuevas F** 2007 Sympathetic pharmacological denervation in ageing rats: effects on ovulatory response and follicular population. *Reprod Fertil Dev.* **19** 954 - 960.
- Chavez R & Dominguez R** 1994 Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle. *J Endocrinol* **140** 197-201.
- Chen Y, Breen K & Pepling ME** 2009 Estrogen can signal through multiple pathways to regulate oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary. *Journal of Endocrinology* **202** 407-417.
- Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E & Pepling ME** 2007 Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology* **148** 3580-3590.
- D'Albora H & Barcia JJ** 1996 Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosci Lett* **205** 65-67.
- D'Albora H, Lombide P & Ojeda SR** 2000 Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* **300** 47-56.
- Davies MJ, March WA, Willson KJ, Giles LC & Moore VM** 2012 Birthweight and thinness at birth independently predict symptoms of polycystic ovary syndrome in adulthood. *Hum Reprod* **27** 1475-1480.
- de la Torre JC & Surgeon JW** 1976 Histochemical fluorescence of tissue and brain monoamines: results in 18 minutes using the sucrose-phosphate-glyoxylic acid (SPG) method. *Neuroscience* **1** 451-453.
- de Melo AS, Dias SV, Cavalli RdC, Cardoso VC, Bettiol H, Barbieri MA, Ferriani RA & Vieira CS** 2015 Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: multifactorial assessment from the foetal stage to menopause. *Reproduction* **150** R11-R24.
- Dean A, Smith LB, Macpherson S & Sharpe RM** 2012 The effect of dihydrotestosterone exposure during or prior to the masculinization programming window on reproductive development in male and female rats. *International Journal of Andrology* **35** 330-339.
- Dees WL, Ahmed CE & Ojeda SR** 1986 Substance P- and vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology* **119** 638-641.
- Dees WL, Hiney JK, Schultea TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA & Ojeda SR** 1995 The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology* **136** 5760-5768.
- DeFalco T, Saraswathula A, Briot A, Iruela-Arispe ML & Capel B** 2013 Testosterone Levels Influence Mouse Fetal Leydig Cell Progenitors Through Notch Signaling. *Biology of Reproduction* **88** 91, 91-12.
- Delgado SM, Sosa Z, Dominguez NS, Casais M, Aguado L & Rastrilla AM** 2004 Effect of the relation between neural cholinergic action and nitric oxide on ovarian steroidogenesis in prepubertal rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* **91** 139-145.
- Demissie M, Lazic M, Foecking EM, Aird F, Dunaif A & Levine JE** 2008 Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **295** E262-E268.
- Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Paredes A, Mayer C, Mayerhofer A & Ojeda SR** 2009 Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian

- morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology* **150** 2906-2914.
- Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S & Ojeda SR** 1995 Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology* **136** 4681-4692.
- Dissen GA, Romero C, Paredes A & Ojeda SR** 2002 Neurotrophic control of ovarian development. *Microsc Res Tech* **59** 509-515.
- Dorfman M, Arancibia S, Fiedler JL & Lara HE** 2003 Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biol Reprod* **68** 2038-2043.
- Dorfman MD, Garcia-Rudaz C, Alderman Z, Kerr B, Lomniczi A, Dissen GA, Castellano JM, Garcia-Galiano D, Gaytan F, Xu B, Tena-Sempere M & Ojeda SR** 2014 Loss of Ntrk2/Kiss1r Signaling in Oocytes Causes Premature Ovarian Failure. *Endocrinology* **155** 3098-3111.
- Drummond A** 2006 The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* **4** 16.
- Dunaif A, Segal KR, Futterweit W & Dobrjansky A** 1989 Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* **38** 1165-1174.
- Dutta S, Mark-Kappeler CJ, Hoyer PB & Pepling ME** 2014 The Steroid Hormone Environment During Primordial Follicle Formation in Perinatal Mouse Ovaries. *Biology of Reproduction* **91** 68, 61-12.
- Ebling FJP** 2005 The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* **129** 675-683.
- Edson MA, Nagaraja AK & Matzuk MM** 2009 The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocrine Reviews* **30** 624-712.
- Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM & Wagers AJ** 2006 Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature* **441** 1109-1114.
- Flaws JA, Hirshfield AN, Hewitt JA, Babus JK & Furth PA** 2001 Effect of Bcl-2 on the Primordial Follicle Endowment in the Mouse Ovary. *Biology of Reproduction* **64** 1153-1159.
- Foecking EM, Szabo M, Schwartz NB & Levine JE** 2005 Neuroendocrine Consequences of Prenatal Androgen Exposure in the Female Rat: Absence of Luteinizing Hormone Surges, Suppression of Progesterone Receptor Gene Expression, and Acceleration of the Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator. *Biology of Reproduction* **72** 1475-1483.
- Foradori CD, Weiser MJ & Handa RJ** 2008 Non-genomic actions of androgens. *Frontiers in Neuroendocrinology* **29** 169-181.
- Fowler PA, Anderson RA, Saunders PT, Kinnell H, Mason JI, Evans DB, Bhattacharya S, Flannigan S, Franks S, Monteiro A & O'Shaughnessy PJ** 2011 Development of Steroid Signaling Pathways during Primordial Follicle Formation in the Human Fetal Ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **96** 1754-1762.
- Galas J, Slomczynska M, Knapczyk-Stwora K, Durlej M, Starowicz A, Tabarowski Z, Rutka K & Szoltys M** 2012 Steroid levels and the spatiotemporal expression of steroidogenic enzymes and androgen receptor in developing ovaries of immature rats. *Acta Histochem* **114** 207-216.
- Gambineri A, Patton L, Altieri P, Pagotto U, Pizzi C, Manzoli L & Pasquali R** 2012 Polycystic Ovary Syndrome Is a Risk Factor for Type 2 Diabetes: Results From a Long-Term Prospective Study. *Diabetes* **61** 2369-2374.
- Gelmann EP** 2002 Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* **20** 3001-3015.
- George FW & Ojeda SR** 1982 Changes in aromatase activity in the rat brain during embryonic, neonatal, and infantile development. *Endocrinology* **111** 522-529.
- George FW & Ojeda SR** 1987 Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** 5803-5807.

- Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M & Laudet V** 2006 Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* **58** 685-704.
- Gheorghisan-Galateanu A, Hinescu M & Enciu A** 2014 Ovarian adult stem cells: hope or pitfall? *Journal of Ovarian Research* **7** 71.
- Gleicher N, Weghofer A & Barad D** 2011 The role of androgens in follicle maturation and ovulation induction: friend or foe of infertility treatment? *Reproductive Biology and Endocrinology* **9** 116.
- Godfrey KM & Barker DJ** 2001 Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr* **4** 611-624.
- Goodarzi MO, Carmina E & Azziz R** 2015 DHEA, DHEAS and PCOS. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **145** 213-225.
- Gorski RA** 1963 *Modification of ovulatory mechanisms by postnatal administration of estrogen to the rat.*
- Greenfeld CR, Pepling ME, Babus JK, Furth PA & Flaws JA** 2007 BAX regulates follicular endowment in mice. *Reproduction* **133** 865-876.
- Greiner M, Paredes A, Araya V & Lara HE** 2005 Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome. *Endocrine* **28** 319-324.
- Hanna CB & Hennebold JD** 2014 Ovarian germline stem cells: an unlimited source of oocytes? *Fertil Steril* **101** 20-30.
- Hartshorne GM, Lyrakou S, Hamoda H, Oloto E & Ghafari F** 2009 Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection? *Molecular Human Reproduction* **15** 805-819.
- Heider U, Pedal I & Spanel-Borowski K** 2001 Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertil Steril* **75** 1141 - 1147.
- Hild-Petito S, West NB, Brenner RM & Stouffer RL** 1991 Localization of androgen receptor in the follicle and corpus luteum of the primate ovary during the menstrual cycle. *Biology of Reproduction* **44** 561-568.
- Hillier SG, Tetsuka M & Fraser HM** 1997 Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary. *Hum Reprod* **12** 107-111.
- Horvath TL, Garcia-Segura LM & Naftolin F** 1997 Lack of gonadotropin-positive feedback in the male rat is associated with lack of estrogen-induced synaptic plasticity in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* **65** 136-140.
- Hotchkiss AK, Furr J, Makynen EA, Ankley GT & Gray Jr LE** 2007 In utero exposure to the environmental androgen trenbolone masculinizes female Sprague–Dawley rats. *Toxicology Letters* **174** 31-41.
- Hu Y-C, Wang P-H, Yeh S, Wang R-S, Xie C, Xu Q, Zhou X, Chao H-T, Tsai M-Y & Chang C** 2004 Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** 11209-11214.
- Ibáñez L, Ong K, De Zegher F, Marcos MV, Del Rio L & Dunger DB** 2003 Fat distribution in non-obese girls with and without precocious pubarche: central adiposity related to insulinaemia and androgenaemia from prepuberty to postmenarche. *Clinical Endocrinology* **58** 372-379.
- Ibáñez L, Potau N, Francois I & Zegher Fd** 1998 Precocious Pubarche, Hyperinsulinism, and Ovarian Hyperandrogenism in Girls: Relation to Reduced Fetal Growth. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **83** 3558-3562.
- Iliadou A, Cnattingius S & Lichtenstein P** 2004 Low birthweight and Type 2 diabetes: a study on 11 162 Swedish twins. *Int J Epidemiol* **33** 948-953; discussion 953-944.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK & Tilly JL** 2004 Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* **428** 145-150.
- Jones MR, Brower MA, Xu N, Cui J, Mengesha E, Chen Y-DI, Taylor KD, Azziz R & Goodarzi MO** 2015 Systems Genetics Reveals the Functional Context of PCOS Loci and Identifies

- Genetic and Molecular Mechanisms of Disease Heterogeneity. *PLoS Genet* **11** e1005455.
- Juengel JL, Heath DA, Quirke LD & McNatty KP** 2006 Oestrogen receptor alpha and beta, androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reproduction* **131** 81-92.
- Katoh T, HAYASHI S, IGUCHI T & SATO T** 2013 Epithelial–stromal Interactions in the Mouse Vagina Exposed Neonatally to Diethylstilbestrol. *In Vivo* **27** 333-337.
- Kerr B, Garcia-Rudaz C, Dorfman M, Paredes A & Ojeda SR** 2009 NTRK1 and NTRK2 receptors facilitate follicle assembly and early follicular development in the mouse ovary. *Reproduction* **138** 131-140.
- Kerr JB, Duckett R, Myers M, Britt KL, Mladenovska T & Findlay JK** 2006 Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction* **132** 95-109.
- Kezele P, Nilsson E & Skinner MK** 2002 Cell-cell interactions in primordial follicle assembly and development. *Front Biosci* **7** d1990-1996.
- Kipp JL, Kilen SM, Bristol-Gould S, Woodruff TK & Mayo KE** 2007 Neonatal Exposure to Estrogens Suppresses Activin Expression and Signaling in the Mouse Ovary. *Endocrinology* **148** 1968-1976.
- Klein CM & Burden HW** 1988 Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci Lett* **85** 217-222.
- Konishi I, Fujii S, Okamura H, Parmley T & Mori T** 1986 Development of interstitial cells and ovigerous cords in the human fetal ovary: an ultrastructural study. *J Anat* **148** 121-135.
- Konkle ATM & McCarthy MM** 2011 Developmental Time Course of Estradiol, Testosterone, and Dihydrotestosterone Levels in Discrete Regions of Male and Female Rat Brain. *Endocrinology* **152** 223-235.
- Kumar S, Saradhi M, Chaturvedi NK & Tyagi RK** 2006 Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: An overview. *Molecular and Cellular Endocrinology* **246** 147-156.
- Lansdown A & Rees DA** 2012 The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? *Clinical Endocrinology* **77** 791-801.
- Lara H, Dissen G, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler J & Ojeda S** 2000a An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* **141** 1059 - 1072.
- Lara H, Dorfman M, Venegas M, Luza S, Luna S, Mayerhofer A, Guimaraes M, Rosa E & Ramirez V** 2002 Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech* **59** 495 - 502.
- Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL & Ojeda SR** 2000b An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* **141** 1059-1072.
- Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y & Ojeda SR** 1993 Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* **133** 2690-2695.
- Lauritsen MP, Bentzen JG, Pinborg A, Loft A, Forman JL, Thuesen LL, Cohen A, Hougaard DM & Nyboe Andersen A** 2014 The prevalence of polycystic ovary syndrome in a normal population according to the Rotterdam criteria versus revised criteria including anti-Müllerian hormone. *Human Reproduction* **29** 791-801.
- Leary C, Leese HJ & Sturmey RG** 2015 Human embryos from overweight and obese women display phenotypic and metabolic abnormalities. *Hum Reprod* **30** 122-132.
- Lebbe M & Woodruff TK** 2013 Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Molecular Human Reproduction* **19** 828-837.

- Lee HJ, Selesniemi K, Niikura Y, Niikura T, Klein R, Dombkowski DM & Tilly JL** 2007 Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol* **25** 3198-3204.
- Legro RS, Driscoll D, Strauss JF, 3rd, Fox J & Dunaif A** 1998 Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** 14956-14960.
- Makker A, Goel MM & Mahdi AA** 2014 PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update. *Journal of Molecular Endocrinology* **53** R103-R118.
- Mannerås L, Cajander S, Lönn M & Stener-Victorin E** 2009 Acupuncture and exercise restore adipose tissue expression of sympathetic markers and improve ovarian morphology in rats with dihydrotestosterone-induced PCOS. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **296** R1124-R1131.
- Manosalva I, González A & Kageyama R** 2013 Hes1 in the somatic cells of the murine ovary is necessary for oocyte survival and maturation. *Developmental Biology* **375** 140-151.
- Mäntyselkä A, Jääskeläinen J, Lindi V, Viitasalo A, Tompuri T, Voutilainen R & Lakka TA** 2014 The presentation of adrenarche is sexually dimorphic and modified by body adiposity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **99** 3889-3894.
- Marchetti PM & Barth JH** 2013 Clinical biochemistry of dihydrotestosterone. *Annals of Clinical Biochemistry* **50** 95-107.
- Matsumoto T, Shiina H, Kawano H, Sato T & Kato S** 2008 Androgen receptor functions in male and female physiology. *J Steroid Biochem Mol Biol* **109** 236-241.
- Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME & Ojeda SR** 1997 A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* **138** 3320-3329.
- Mazaud S, Guigon CJ, Lozach A, Coudouel N, Forest MG, Coffigny H & Magre S** 2002 Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* **143** 4775-4787.
- McGee EA & Hsueh AJ** 2000 Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* **21** 200-214.
- Miyagawa S, Katsu Y, Ohta Y, Sudo T, Lubahn DB & Iguchi T** 2010 Estrogen receptor ESR1 is indispensable for the induction of persistent vaginal change by neonatal 5alpha-dihydrotestosterone exposure in mice. *Biol Reprod* **82** 497-503.
- Morales-Ledesma L, Linares R, Rosas G, Moran C, Chavira R, Cardenas M & Dominguez R** 2010 Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary. *Reprod Biol Endocrinol* **8** 99.
- Mork L, Maatouk DM, McMahon JA, Guo JJ, Zhang P, McMahon AP & Capel B** 2012 Temporal Differences in Granulosa Cell Specification in the Ovary Reflect Distinct Follicle Fates in Mice. *Biology of Reproduction* **86** 37, 31-39.
- Murashima A, Kishigami S, Thomson A & Yamada G** 2015 Androgens and mammalian male reproductive tract development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1849** 163-170.
- Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, 3rd & McAllister JM** 1999 Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol* **13** 946-957.
- Nestler JE, POWERS LP, MATT DW, STEINGOLD KA, PLYMATE SR, RITTMASER RS, CLORE JN & BLACKARD WG** 1991 A Direct Effect of Hyperinsulinemia on Serum Sex Hormone-Binding Globulin Levels in Obese Women with the Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **72** 83-89.
- Nohara K, Waraich RS, Liu S, Ferron M, Waget A, Meyers MS, Karsenty G, Burcelin R & Mauvais-Jarvis F** 2013 Developmental androgen excess programs sympathetic tone

- and adipose tissue dysfunction and predisposes to a cardiometabolic syndrome in female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **304** E1321-1330.
- Ojeda SR, Advis JP & Andrews WW** 1980 Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Fed Proc* **39** 2365-2371.
- Osman P** 1985 Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. *J Reprod Fertil* **73** 261-270.
- Ott J, Kurz C, Nouri K, Wirth S, Vytiska-Binstorfer E, Huber J & Mayerhofer K** 2010 Pregnancy outcome in women with polycystic ovary syndrome comparing the effects of laparoscopic ovarian drilling and clomiphene citrate stimulation in women pre-treated with metformin: a retrospective study. *Reproductive Biology and Endocrinology* **8** 45.
- Padmanabhan V, Salvetti NR, Matiller V & Ortega HH** 2014 Developmental Programming: Prenatal Steroid Excess Disrupts Key Members of Intraovarian Steroidogenic Pathway in Sheep. *Endocrinology* **155** 3649-3660.
- Padmanabhan V & Veiga-Lopez A** 2011 Developmental Origin of Reproductive and Metabolic Dysfunctions: Androgenic Versus Estrogenic Reprogramming. *Semin Reprod Med* **29** 173-186.
- Pelletier G, Labrie C & Labrie F** 2000 Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* **165** 359-370.
- Pepling ME** 2012 Follicular assembly: mechanisms of action. *Reproduction* **143** 139-149.
- Picut CA, Dixon D, Simons ML, Stump DG, Parker GA & Remick AK** 2014a Postnatal Ovary Development in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. *Toxicol Pathol*.
- Picut CA, Remick AK, Asakawa MG, Simons ML & Parker GA** 2014b Histologic features of prepubertal and pubertal reproductive development in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* **42** 403-413.
- Prizant H, Gleicher N & Sen A** 2014 Androgen actions in the ovary: balance is key. *Journal of Endocrinology* **222** R141-R151.
- Rajah R, Glaser EM & Hirshfield AN** 1992 The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn* **194** 177-192.
- Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM & Tilly JL** 1995 Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology* **136** 3665-3668.
- Rhees RW, KB, Sephton S, Lephart ED.** 1997 Effects of prenatal testosterone on sexual behavior, reproductive morphology and LH secretion in the female rat. *Dev Neurosci*. **19** 430-437.
- Rice S, Ojha K, Whitehead S & Mason H** 2007 Stage-Specific Expression of Androgen Receptor, Follicle-Stimulating Hormone Receptor, and Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor in Single, Isolated, Human Preantral Follicles: Relevance to Polycystic Ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **92** 1034-1040.
- Rodriguez I, Araki K, Khatib K, Martinou J-C & Vassalli P** 1997 Mouse Vaginal Opening Is an Apoptosis-Dependent Process Which Can Be Prevented by the Overexpression of Bcl2. *Developmental Biology* **184** 115-121.
- Rosa ESA, Guimaraes MA, Padmanabhan V & Lara HE** 2003 Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* **144** 4289-4297.
- Rosenfield RL** 2007 Identifying Children at Risk for Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **92** 787-796.
- Sajjad Y, Quenby SM, Nickson P, Lewis-Jones DI & Vince G** 2004 Expression of androgen receptors in upper human fetal reproductive tract. *Human Reproduction* **19** 1659-1665.

- Salvetti NR, Ortega HH, Veiga-Lopez A & Padmanabhan V** 2012 Developmental Programming: Impact of Prenatal Testosterone Excess on Ovarian Cell Proliferation and Apoptotic Factors in Sheep. *Biology of Reproduction* **87** 22, 21-10.
- Sanchez F, Romero S, De Vos M, Verheyen G & Smitz J** 2015 Human cumulus-enclosed germinal vesicle oocytes from early antral follicles reveal heterogeneous cellular and molecular features associated with in vitro maturation capacity. *Hum Reprod* **30** 1396-1409.
- Sar M & Welsch F** 1999 Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology* **140** 963-971.
- Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ & McNatty KP** 2002 Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod* **66** 1134-1150.
- Sen A & Hammes SR** 2010 Granulosa Cell-Specific Androgen Receptors Are Critical Regulators of Ovarian Development and Function. *Molecular Endocrinology* **24** 1393-1403.
- Shinohara Y, Matsumoto A, Hayashi S & Mori T** 2000 Prenatal exposure to diethylstilbestrol decreases the number of estrogen receptor alpha-containing neurons innervating the ovary in rat celiac ganglion. *Neuroscience* **101** 779-783.
- Shinohara Y, Matsumoto A & Mori T** 1998 Effects of prenatal exposure to diethylstilbestrol on the sympathetic nervous system in the rat ovary. *Neurosci Lett* **255** 123-126.
- Sir-Petermann T, Ladron de Guevara A, Codner E, Preisler J, Crisosto N, Echiburu B, Maliqueo M, Sanchez F, Perez-Bravo F & Cassorla F** 2012 Relationship between anti-Mullerian hormone (AMH) and insulin levels during different tanner stages in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci* **19** 383-390.
- Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Pérez-Bravo F & Recabarren SE** 2002 Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Human Reproduction* **17** 2573-2579.
- Sir-Petermann T, Maliqueo M, Codner E, Echiburu B, Crisosto N, Perez V, Perez-Bravo F & Cassorla F** 2007 Early metabolic derangements in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **92** 4637-4642.
- Skinner MK** 2005 Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update* **11** 461-471.
- Smith LB & Walker WH** 2014 The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **30** 2-13.
- Smith PR, Wilhelm D & Rodgers R** 2014 New concepts of mammalian ovarian development. *Journal of Endocrinology*.
- Sosa Z, Delgado M, Casais M, Aguado L & Rastrilla AM** 2004 Release of ovarian progesterone during the rat oestrous cycle by ganglionic cholinergic influence: the role of norepinephrine. *J Steroid Biochem Mol Biol* **91** 179-184.
- Sotomayor-Zarate R, Dorfman M, Paredes A & Lara H** 2008a Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol Reprod* **78** 673 - 680.
- Sotomayor-Zarate R, Dorfman M, Paredes A & Lara HE** 2008b Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol Reprod* **78** 673-680.
- Sotomayor-Zárate R, Tiszavari M, Cruz G & Lara HE** 2011 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. *Fertility and Sterility* **96** 1490-1496.
- Spritzer PM, Lecke SB, Satler F & Morsch DM** 2015 Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reproduction* **149** R219-R227.
- Stein IF & Leventhal ML** 1935 Amenorrhoea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* **29**.

- Sullivan SD & Moenter SM** 2004 Prenatal androgens alter GABAergic drive to gonadotropin-releasing hormone neurons: implications for a common fertility disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** 7129-7134.
- Sverrisdóttir YB, Mogren T, Kataoka J, Janson PO & Stener-Victorin E** 2008 Is polycystic ovary syndrome associated with high sympathetic nerve activity and size at birth? *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **294** E576-E581.
- Teede H, Deeks A & Moran L** 2010 Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med* **8** 41.
- Tetsuka M & Hillier SG** 1997 Differential regulation of aromatase and androgen receptor in granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **61** 233-239.
- Tetsuka M, Whitelaw PF, Bremner WJ, Millar MR, Smyth CD & Hillier SG** 1995 Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *Journal of Endocrinology* **145** 535-543.
- Tingen CM, Bristol-Gould SK, Kiesewetter SE, Wellington JT, Shea L & Woodruff TK** 2009 Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biol Reprod* **81** 16-25.
- Tyndall V, Broyde M, Sharpe R, Welsh M, Drake AJ & McNeilly AS** 2012 Effect of androgen treatment during foetal and/or neonatal life on ovarian function in prepubertal and adult rats. *Reproduction* **143** 21-33.
- Vanorny DA, Prasasya RD, Chalpe AJ, Kilen SM & Mayo KE** 2014 Notch Signaling Regulates Ovarian Follicle Formation and Coordinates Follicular Growth. *Molecular Endocrinology* **28** 499-511.
- Vega Orozco A, Daneri C, Anesetti G, Cabrera R, Sosa Z & Rastrilla AM** 2012 Involvement of the oestrogenic receptors in superior mesenteric ganglion on the ovarian steroidogenesis in rat. *Reproduction* **143** 183-193.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR & Folkman J** 1991 Tumor Angiogenesis and Metastasis — Correlation in Invasive Breast Carcinoma. *New England Journal of Medicine* **324** 1-8.
- Weisz J & Ward IL** 1980 Plasma Testosterone and Progesterone Titers of Pregnant Rats, Their Male and Female Fetuses, and Neonatal Offspring. *Endocrinology* **106** 306-316.
- Wickenheisser JK, Biegler JM, Nelson-DeGrave VL, Legro RS, Strauss JF, III & McAllister JM** 2012 Cholesterol Side-Chain Cleavage Gene Expression in Theca Cells: Augmented Transcriptional Regulation and mRNA Stability in Polycystic Ovary Syndrome. *PLoS One* **7** e48963.
- Wilhelm D, Palmer S & Koopman P** 2007 Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* **87** 1-28.
- Wilson JD, Leihy MW, Shaw G & Renfree MB** 2002 Androgen physiology: unsolved problems at the millennium. *Molecular and Cellular Endocrinology* **198** 1-5.
- Wojtkiewicz J, Jana B, Kozłowska A, Crayton R, Majewski M, Zalecki M, Baranowski W & Radziszewski P** 2014 Innervation pattern of polycystic ovaries in the women. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **61–62** 147-152.
- Wood JR, Nelson VL, Ho C, Jansen E, Wang CY, Urbanek M, McAllister JM, Mosselman S & Strauss JF** 2003 The Molecular Phenotype of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Theca Cells and New Candidate PCOS Genes Defined by Microarray Analysis. *Journal of Biological Chemistry* **278** 26380-26390.
- Wu XY, Li ZL, Wu CY, Liu YM, Lin H, Wang SH & Xiao WF** 2010 Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats. *Endocr J* **57** 201-209.
- Xu N, Kwon S, Abbott DH, Geller DH, Dumesic DA, Azziz R, Guo X & Goodarzi MO** 2011 Epigenetic Mechanism Underlying the Development of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)-Like Phenotypes in Prenatally Androgenized Rhesus Monkeys. *PLoS One* **6** e27286.

- Yan X, Yuan C, Zhao N, Cui Y & Liu J** 2014 Prenatal androgen excess enhances stimulation of the GNRH pulse in pubertal female rats. *Journal of Endocrinology* **222** 73-85.
- Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A & Nishikawa A** 2011 Delayed Adverse Effects of Neonatal Exposure to Diethylstilbestrol and Their Dose Dependency in Female Rats. *Toxicologic Pathology* **39** 823-834.