

# IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN A UN EXCESO DE TESTOSTERONA DURANTE EL DESARROLLO FETAL EN EL EJE GONADAL DE MACHOS OVINOS

Sergio Edmundo Recabarren Morgado



TESIS DOCTORAL, MAYO 2017  
FACULTAD DE VETERINARIA, UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, ESPAÑA

TITULO: *Impacto de la exposición a un exceso de testosterona durante el desarrollo fetal en el eje gonadal de machos ovinos*

AUTOR: *Sergio Edmundo Recabarren Morgado*

---

© Edita: UCOPress. 2017  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



Universidad de Concepción

TESIS DOCTORAL  
FACULTAD DE VETERINARIA  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (ESPAÑA)

**IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN A  
UN EXCESO DE TESTOSTERONA DURANTE  
EL DESARROLLO FETAL EN EL EJE GONADAL  
DE MACHOS OVINOS**

**Sergio Edmundo Recabarren Morgado**

**Mayo 2017**




**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL**  
**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN A UN EXCESO DE  
TESTOSTERONA DURANTE EL DESARROLLO FETAL EN  
EL EJE GONADAL DE MACHOS OVINOS**

**Memoria de Tesis presentada por Sergio E. Recabarren Morgado, Licenciado en  
Biología, para optar al grado de DOCTOR**

**El director:**



**Dr. CARLOS C. PÉREZ MARÍN**

**Prof. Titular  
Dpto. de Medicina y Cirugía Animal  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de Córdoba**





---

Departamento de Medicina  
y Cirugía Animal

**CARLOS C. PÉREZ MARÍN, DOCTOR EN VETERINARIA POR LA  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO  
DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,**

**INFORMA:**

**Que D. Sergio E. Recabarren Morgado ha realizado bajo mi dirección desde el  
Departamento de Medicina y Cirugía Animal, el trabajo titulado "Impacto de la  
exposición a un exceso de testosterona durante el desarrollo fetal en el eje gonadal de  
machos ovinos", y que reúne los méritos científicos necesarios para optar al grado de  
Doctor en Veterinaria.**

**Y para que así conste, firmo el presente informe en Córdoba a 18 de mayo de 2017.**

**Dr. CARLOS C. PÉREZ MARÍN**

**Prof. Titular  
Dpto. de Medicina y Cirugía Animal  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de Córdoba**







**TÍTULO DE LA TESIS:** IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN A UN EXCESO DE TESTOSTERONA DURANTE EL DESARROLLO FETAL EN EL EJE GONADAL DE MACHOS OVINOS.

**DOCTORANDO/A:** Sergio Edmundo Recabarren Morgado

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

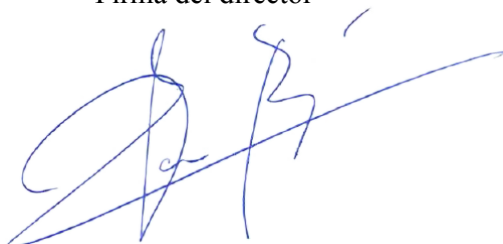
El doctorando D. Sergio Edmundo Recabarren Morgado ha llevado a cabo a lo largo de su vida profesional una trayectoria investigadora impecable, centrada en el estudio de la influencia de agentes hormonales exógenos sobre el desarrollo fetal y su repercusión posterior en la vida de esos individuos. Numerosas aportaciones a Congresos en forma de ponencias invitadas, comunicaciones y presentación de posters han sido realizadas en torno al tema antes mencionado, y desde el año 2011 ha trabajado en la confección de su Tesis Doctoral dentro del Programa de Doctorado de la Universidad de Córdoba correspondiente al área de Biociencias y Ciencias Agroaliminetarias (P:D: con mención de calidad), la cuál ha sido cimentada sobre tres publicaciones científicas y apoyada en otras aportaciones realizadas en diversos foros científicos.

En este tiempo, el doctorando ha demostrado su inquietud por la investigación y la presentación de resultados en foros de alta calidad, además de esforzarse en que las publicaciones aparecieran en revistas de alto índice de impacto, lo que ha permitido que la Tesis que de todo esto se ha derivado, haya podido presentarse por compendium de artículos.

Por todo lo expuesto y como Director de esta Tesis Doctoral, **autorizo la presentación y defensa de la misma**, que ha sido toda una lección de ilusión y pundonor por parte del doctorando, que pone punto y seguido a su carrera científica y universitaria con este compendium que resume su esfuerzo de muchos años y le permite alcanzar la mayor distinción docente.

Córdoba, 18 de mayo de 2017

Firma del director

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'C. Pérez Marín', written in a cursive style.

Fdo.: Dr. CARLOS C. PÉREZ MARÍN

# IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN A UN EXCESO DE TESTOSTERONA DURANTE EL DESARROLLO FETAL EN EL EJE GONADAL DE MACHOS OVINOS

## Publicaciones científicas realizadas por el doctorando y relacionadas con el presente trabajo de Tesis Doctoral:

- Recabarren S.E., Lobos A, Figueroa Y, Padmanabhan V, Foster DL, Sir-Petermann T. 2007. Prenatal testosterone treatment alters LH and testosterone responsiveness to GnRH agonist in male sheep. *Biological Research* 40:329-338.
- Recabarren S.E., Smith R, Rios R, Maliqueo M, Echiburú B, Codner E, Cassorla F, Rojas P, Sir-Petermann T. 2008. Metabolic profile in sons of women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93:1820-1826.
- Recabarren S.E., Sir-Petermann T, Rios R, Maliqueo M, Echiburú B, Smith R, Rojas-García P, Recabarren M, Rey RA. 2008. Pituitary and testicular function in sons of women with polycystic ovary syndrome from infancy to adulthood. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93:3318-3324.
- Recabarren S.E., Rojas-García PP, Recabarren MP, Alfaro VH, Smith R, Padmanabhan V, Sir-Petermann T. 2008. Prenatal testosterone excess reduces sperm count and motility. *Endocrinology* 149:6444-6448.
- Recabarren S.E., Rojas-García PP, Recabarren MP, Norambuena K, Sir-Petermann T. 2009. Impacto de la exposición prenatal a testosterona sobre parámetros biométricos y endocrinos en ovejas recién nacidas. *Archivos Medicina Veterinaria* 41:43-51.
- Padmanabhan V, Veiga-Lopez A, Abbott DH, Recabarren S.E., Herkimer C. 2010. Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess and postnatal weight gain on insulin sensitivity index and transfer of traits to offspring of overweight females. *Endocrinology* 151: 595-605.
- Rojas-García, P.P. Recabarren MP, Sarabia L, Schön J, Gabler Ch, Einspanier R, Maliqueo M, Sir-Petermann T, Rey R, Recabarren S.E.. 2010 Prenatal testosterone excess alters Sertoli and germ cell number and testicular FSH receptor expression in rams. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 299: E998-E1005
- Recabarren S.E., Recabarren M, Rojas-García PP, Cordero M, Reyes C, Sir-Petermann T. 2012. Prenatal exposure to androgen excess increases LH pulse amplitude during postnatal life in male sheep. *Hormone and Metabolic Research* 44:688-693.

- Nugent B.M., Tobet S.A., Lara H.E., Lucion A.B., Wilson M.E., Recabarren S.E., Paredes A.H. 2012. Hormonal Programming across the lifespan. *Hormone and Metabolic Research* 44: 1-10.
- Witchel S F, Recabarren SE, Gonzalez F, Diamanti-Kandarakis E., Cheang K.I., Duleba A.J., Legro RS., Homburg R., Pasquali R., Lobo R.A., Zouboulis, Ch.C. , Kelestimur F., Fruzzetti, F., Futterweit W., Norman R.J., Abbott D.H. 2012. Emerging concepts about prenatal genesis, aberrant metabolism and treatment paradigms in polycystic ovary syndrome. *Endocrine* 42:526-534
- Sir-Petermann T, Ladrón de Guevara A., Villarroel A.C. Preisler, Echiburú B, Recabarren S. 2012. Síndrome de Ovario Poliquístico y Embarazo. *Revista Médica de Chile* 140: 919-925
- Rojas-García, PP, Recabarren MP, Sir-Petermann T, Rey R, Palma S, Carrasco A, Pérez-Marín C.C., Padmanabhan V., Recabarren SE. 2013. Altered testicular development as a consequence of increase number of Sertoli cell in male lambs exposed prenatally to excess testosterone. *Endocrine* 43: 705-713.
- Recabarren MP, P P Rojas-García, R Einspanier, V Padmanabhan, T Sir-Petermann, S E Recabarren. 2013. Pituitary and testis responsiveness in young males exposed to testosterone excess during fetal development. *Reproduction* 145:567-576.
- Rojas-García P.P, Recabarren M.P, Palma S, Maliqueo M, Carrasco A, Sir-Petermann T, S.E. Recabarren 2014. Ovarian morphometry and mRNA expression of antimüllerian hormone (AMH), follicle stimulating hormone receptor (FSHR) and nuclear factor kappa B (NFkB) in growing follicles of female lambs prenatally exposed to testosterone. *Archivos Medicina Veterinaria.* 46:13-21.
- Zubeldia-Brenner L, Roselli CE, Recabarren SE, Gonzalez Deniselle MC, Lara HE. 2016. Developmental and functional effects of steroid hormones on the neuroendocrine axis and spinal cord. *Journal of Neuroendocrinology* 28 (7). doi: 10.1111/jne.12401. Review.

### **Aportaciones a congresos internacionales derivadas del presente trabajo de Tesis Doctoral:**

- Recabarren SE, P P Rojas-García, M.P Recabarren, R. Einspanier, Ch Gabler, T Sir-Petermann. Testicular overexpression of FSH and TGF beta1 receptor mRNA may contribute towards sperm abnormalities induced by prenatal testosterone excess in adult sheep. 90th Annual Meeting Endocrine Society. 15-18 junio 2008. San Francisco, CA, USA.
- Recabarren SE, T Sir-Petermann, R. Ríos, M Maliqueo, B Echiburú, R Smith, PP Rojas-García, M Recabarren, R.A. Rey. Testicular function in sons of women with

polycystic ovary syndrome (PCOS) from infancy to adulthood. 47° Reunión de la European Society of Pediatric Endocrinology. 20-23 sept 2008, Estambul. Turquía.

- Recabarren MP, Recabarren SE, Rojas-García PP, Arrate F, Sir-Petermann T. Evaluation of the gonadal axis function in males exposed to excess exogenous testosterone during fetal development. 92th Annual Meeting Endocrine Society, San Diego June 2010.
- Recabarren M P, Rojas-García PP, Vizcarra PC, Palma S, Sir-Peterman T, Recabarren SE. Effects of prenatal exposure to testosterone may be due to its conversion to estradiol in female lambs. 92th Annual Meeting Endocrine Society, San Diego June 2010.
- Rojas-García PP., Palma S, Maliqueo M, Recabarren MP, Tovar H, Rey R, Sir-Petermann T, Recabarren SE. Expression of key receptors in testis of lambs prenatally exposed to an excess of testosterone. 92th Annual Meeting Endocrine Society, San Diego June 2010.
- Rojas-García P, Recabarren MP, Palma S, Tovar H, Gabler C, Einspanier R, Maliqueo M, Sir-Petermann T, Recabarren SE. Prenatal testosterone excess alters seminal and cellular characteristics in male sheep via its androgenic actions. 8<sup>th</sup> Annual Meeting, Androgen Excess & PCO Society, Munich 12 Sep 2010.
- Rojas-García PP, Recabarren MP, Palma S, Carrasco A, Maliqueo M, Sir-Petermann, Recabarren SE. mRNA expression of AMH, FSHR and NFKappaB in growing follicles of female lambs prenatally exposed to testosterone. 93th Annual Meeting Endocrine Society. Boston, Junio 2011.
- Rojas-García PP, Recabarren MP, Sir-Petermann T, Rey R, Carrasco A, Fornes R, Recabarren SE. Prenatal testosterone excess decreases FSH levels in umbilical cord blood and modifies the expression of key reproductive factors in testis of fetal male lambs. 94<sup>th</sup> Annual Meeting Endocrine Society, San Diego, USA, Junio 2012.
- Recabarren MP, Rojas-García PP, Carrasco A, Parra N, Sir-Petermann T, Recabarren SE. Prenatal exposure to excess testosterone modifies the feedback to testosterone in ovariectomized adult female sheep. 94<sup>th</sup> Annual Meeting Endocrine Society, San Diego USA, Junio 2012.
- Rojas-García PP, Recabarren MP, Sandoval D, Carrasco A, Fornes R, Rey R, Sir-Petermann T, Recabarren SE. 2013. Prenatal testosterone programming: ontogeny of changes in testis of fetal and prepubertal male sheep. Abstract ECE 2013 Copenhagen, Denmark. Endocrine Abstract 32: P645.
- Rojas-García PP, Sandoval D, Recabarren MP, Carrasco A, Sir-Petermann T, Recabarren SE. 2014. Prenatal testosterone excess alters the number of Sertoli and Germ Cells associated to a higher expression of SOX9, AMH and a lower expression of Lhr and AR in prepubertal male sheep. MON 0102. Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo, June 21–24, 2014 – Chicago. USA.

- Recabarren S.E, Recabarren M.P, Rojas-García P.P, Sandoval D, Carrasco A, Sir-Petermann T. 2015. Testosterone programming of insulin sensitivity (IS) in sheep males. 13<sup>th</sup> Androgen Excess & PCOS Society Meeting, Siracusa, Sicilia, Italia, 4-6 octubre 2015.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, mis hijos por su cariño y respaldo a todas las aventuras en las que me he enfrascado.

A Teresa por su apoyo, disciplina, consejos y cariño en mi vida profesional y personal.

A la Universidad de Concepción, sus autoridades y colegas.

Al Dr. Carlos Pérez Marín por su paciencia, fraternal compromiso y por su esfuerzo y dedicación admirable a un estudiante de tan lejos.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt) del Gobierno de Chile, que financió parte de estos estudios experimentales.

A la Universidad de Córdoba, a la Facultad de Veterinaria por su programa de doctorado que ha permitido lograr esta meta a varios colegas universitarios.

A mis colaboradores en los proyectos: Dr. Pedro P. Rojas-García, Dr. Mónica P. Recabarren, Dr. Daniel Sandoval.

A mis alumnos de postgrado y pregrado que participaron en los estudios experimentales.





---

## INDICE

1. Introducción.....	17
2. Hipótesis y objetivos .....	37
3. Publicaciones que conforman esta Tesis Doctoral	
Trabajo de investigación 1 .....	43
Trabajo de investigación 2 .....	51
Trabajo de investigación 3 .....	63
4. Otras aportaciones científicas derivadas directamente de la Tesis Doctoral.....	75
5. Discusión .....	89
6. Conclusiones generales .....	101
6. Resumen (español) .....	103
7. Abstract (inglés) .....	107
8. Referencias bibliográficas .....	109

---

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado que un órgano o un tejido específico puede ser programado *in utero* durante un período crítico del desarrollo fetal con consecuencias adversas en su función en la vida postnatal. Este fenómeno se generaría por efecto de un estímulo o insulto precoz en un periodo sensible del desarrollo fetal, lo que resulta en consecuencias funcionales adversas en la vida adulta. Se ha definido la programación fetal como el “setting” fisiológico por efecto de un estímulo o insulto precoz en un periodo sensible del desarrollo fetal, lo que resulta en consecuencias funcionales adversas a largo plazo (Lucas, 1991, Lucas y col 1999). Así, la programación fetal ocurre por la inducción, delección o impedimento del desarrollo de ciertas estructuras somáticas, asociado al estímulo o insulto ocurrido en un periodo crítico. Recientemente se ha descrito que la programación fetal se basa en fenómenos epigenéticos (Egger y col., 2004, Portela y Esteller, 2010, Skinner y col., 2011, Jenkins y col 2016) que alteran la expresión del ADN, Desde este punto de vista parece más adecuado utilizar el término **reprogramación fetal** ya que la programación estaría dada por el ADN, mientras que la reprogramación se asociaría a fenómenos epigenéticos. En esta tesis se utilizará el término reprogramación fetal para describir los cambios funcionales derivados de la acción de estímulos que actúan sobre el feto en desarrollo y que desvían la expresión funcional definida por la programación.

Una de las primeras observaciones epidemiológicas vinculada a la reprogramación fetal fue la de Barker y Clark (1997), quienes lograron establecer que un cierto patrón de desarrollo intrauterino, como es el retardo del crecimiento intrauterino, se relacionaba con una mayor incidencia de patologías específicas de la vida postnatal tales con hipertensión arterial, enfermedad coronaria, insulino resistencia, diabetes tipo 2, dislipidemia, obesidad y alteraciones de tipo reproductivas en los adultos de ambos sexos (De Bruin y col.,1998; Ghirri y col., 2002). Se pudo establecer además, que la asociación entre el retardo del crecimiento intrauterino y estas patologías se presentaba en sujetos adultos de diferente origen étnico, edad y sexo, y eran independientes del grado de obesidad y actividad física (Barker y Clark, 1997; Rhind y col., 2001).

Debido a que las hormonas regulan el crecimiento fetal y el desarrollo de tejidos específicos, se propuso que ellas jugarían un papel central en la reprogramación fetal. Hormonas tales como la insulina, los factores de crecimiento insulínicos (IGFs), la tiroxina,

---

los glucocorticoides y los esteroides sexuales (andrógenos y estrógenos) actuarían como señales nutricionales o de maduración que adaptarían el desarrollo fetal a condiciones intrauterinas adversas, maximizando las condiciones de supervivencia tanto *in utero* como al nacer, pero a su vez condicionando un mayor riesgo de ciertas patologías en la vida postnatal (Ozanne, 2001, Ross y Desai, 2005, Desai y col., 2007).

El papel de las hormonas en la regulación del crecimiento fetal y en el desarrollo específico de órganos y tejidos se ha identificado utilizando diferentes técnicas tales como: ablación de glándulas endocrinas del feto, administración de hormonas al feto o a la madre y *knockout* de ciertos genes (Fowden 1995; Efstratiadis, 1998). Estos estudios establecen que las hormonas afectan tanto el crecimiento como la diferenciación de los tejidos *in utero*. También establecen que las hormonas pueden actuar directamente (vía genómica) o indirectamente modificando el desarrollo placentario, el metabolismo fetal y/o la producción de factores de crecimiento y de otras hormonas por la unidad feto-placentaria, o bien mediante mecanismos epigenéticos similar a lo que ocurre con disruptores endocrinos medioambientales (Fowden y Forhead 2001; Fowden 2003, Stel y Legler, 2015).

Las hormonas presentes en la circulación fetal podrían tener cuatro orígenes principales. En primer lugar serían secretadas por las propias glándulas fetales (tales como hormonas tiroideas, pancreáticas, adrenales e hipofisarias); en segundo lugar derivarían de los tejidos útero-placentarios (como por ejemplo esteroides, péptidos y glicoproteínas) que son secretados tanto a la circulación umbilical como a la circulación uterina (Challis y col 2001); en tercer lugar, las hormonas lipolíticas tales como esteroides y hormonas tiroideas pasarían desde la madre por difusión transplacentaria. La cantidad de hormona transferida por esta vía depende del gradiente materno-fetal y la permeabilidad de la barrera placentaria, que varían según la especie (Sibley y col., 1997). Por último, las hormonas presentes en la circulación fetal derivarían de precursores que son metabolizados en el feto o en la placenta.

La concentración de hormonas en la circulación fetal varía normalmente con el desarrollo del mismo y en respuesta a estímulos nutricionales y de otra naturaleza. En condiciones experimentales o patológicas los cambios hormonales dependerán de la magnitud, duración, naturaleza y momento en que se ejerza el estímulo o noxa, lo que alterará el patrón de desarrollo global o específico de ciertos órganos o tejidos del feto.

---

## **1.1. Desarrollo de los órganos reproductores en el feto masculino normal**

La unión del gameto masculino con el femenino inicia una serie de eventos moleculares y bioquímicos en un orden exquisito, y que está programado genéticamente. En las etapas iniciales de la embriogénesis se forman 3 capas germinales, de las cuales se derivarán todos los tejidos y órganos del nuevo individuo: el ectodermo, el mesodermo y el endodermo.

El aparato reproductivo masculino, en ovinos, se desarrolla a partir del mesodermo intermedio. El testículo en los mamíferos es un órgano complejo que se caracteriza por cumplir dos funciones principales: síntesis de hormonas esteroidales y no esteroidales, y producción de espermatozoides o espermatogénesis. Tanto las células troncales que originan las células espermátogénicas como las células somáticas que sustentan este proceso se forman durante el período embrio-fetal. La gónada indiferenciada se diferencia a masculino o femenino por efecto de hormonas gonadales (Jost y col., 1973; Mc Laren, 1999). Las evidencias experimentales han reafirmado el concepto de que la hormona anti-Mülleriana (AMH), derivada de las células de Sertoli, y la testosterona, derivada de la células de Leydig, poseen un rol en la regresión de los conductos de Müller y en la diferenciación de los conductos de Wolf en conductos deferentes, epidídimo y glándulas anexas, respectivamente. En el feto hembra, la ausencia de AMH y andrógenos permite el desarrollo de los derivados de los conductos de Müller (el tracto genital y los dos últimos tercios de la vagina y la vulva) y la regresión pasiva de los conductos de Wolf (Lee y Donahoe, 1993).

En ovinos, la gónada indiferenciada aparece entre los días 23 a 24 de la vida fetal, la cual se aprecia en forma de un par de eminencias longitudinales del mesonefro, denominadas pliegues o crestas genitales o gonadales (Juengel y col. 2002). Las células germinales primordiales (CGP) migran desde el saco vitelino a las gónadas primitivas invadiendo los pliegues genitales y se establecen entre el día 18 a 28 de gestación. En esta etapa, la gónada es bipotente y tanto las células somáticas como las células germinales tienen la capacidad de diferenciarse en células ováricas o testiculares (Jost y col., 1973). Las células somáticas darán origen a las células de soporte, que pueden diferenciarse en células de Sertoli o células de la granulosa, y a las células secretoras de esteroides, que se diferenciarán a células de Leydig y células de la teca. Las CGP pueden a su vez dar origen a ovocitos

---

meióticos o a proespermatozonias. Estudios recientes sugieren que la diferenciación gonadal es controlada por un efecto antagónico entre las vías de señalización SOX9/FGF9 y Wnt4. La diferenciación en testículo u ovario va a depender del desequilibrio entre estas dos vías (Kim y col. 2006). En la gónada XY, la expresión del gen SRY del cromosoma Y inicia la diferenciación sexual. Este gen codifica el factor de transcripción SRY. El efecto de SRY es inhibir a DAX-1 para que se exprese el factor de transcripción nuclear esteroidogénico, SF-1, cuyo gen se encuentra en cromosoma 9q33, el cual a su vez, estimula la expresión de las enzimas P450 esteroidogénicas y promueve la diferenciación de las células de Sertoli (Ikeda, 1996). La sobre-expresión de SOX9, gen ubicado en cromosoma 17q24.1-25.1, inducida por SF-1, conduce a la diferenciación de las células de soporte en células de Sertoli. SOX9 sobrerregula la expresión de FGF9 (Fibroblast Growth Factor 9) que junto con su receptor, RFGF2, estarían involucrados en la migración, proliferación y organización de las células de Sertoli en epitelios (Schmahl y col., 2004; Kim y col. 2007). Al diferenciarse, las células de Sertoli adquieren una marcada polarización, formando agregados epiteliales que se ensamblan dentro de cordones testiculares que posteriormente formarán los túbulos seminíferos (Frojdman y col.1992). Las células de Sertoli actúan como un centro organizador y dirigen la diferenciación de otros tipos celulares del testículo en desarrollo, entre ellas, las células de Leydig fetales (Clark y col., 2000, Brennan & Capel 2004). La acción de SF-1 en las células de Sertoli embrionarias incluyen la secreción de PDGFs y otros factores paracrinos como IGF-1 y VIP que promueven la diferenciación y función de la célula de Leydig (Yao y Barsoum, 2007, Ge y Hardy, 2007).

En humanos, SRY induce la diferenciación de las células de Sertoli en la séptima semana de gestación. Las células de Leydig se observan hacia el final de la octava semana de gestación y la síntesis de testosterona empezaría en la novena semana de gestación por acción de la HCG (Jockenhövel y Schubert, 2009). En ovinos, la expresión de SRY se detecta a partir del día 23 de gestación, con un aumento en su expresión entre los días 27 al 44 de gestación (Payen y col., 1996). A partir del día 29 se forma la túnica albugínea, se organizan los cordones seminíferos, túbulos rectos y los cordones de la rete testis (Zamboni y Upadhyay, 1982). Los túbulos seminíferos y las células de Sertoli se pueden identificar a partir del día 35 de gestación (Mauleon 1961) y el incremento en el número de células somáticas y germinales ocurre a partir del día 45 (Hochereau-de Reviers y col. 1995).

---

En la gónada XX, la vía de señalización Wnt4 antagonizaría la sobre-expresión de SOX9 y la diferenciación hacia una gónada masculina (Kim y col., 2006, Biason-Lauber y Konrad, 2008).

## **1.2 Regulación de la función testicular**

Está ampliamente aceptado que la espermatogénesis en los mamíferos está controlada por un sistema complejo de variados factores que incluyen a las hormonas y a las interacciones locales entre las células testiculares. Las hormonas involucradas en la regulación de la espermatogénesis son las gonadotrofinas y la testosterona. Ambas gonadotrofinas, LH y FSH, son esenciales tanto para el inicio de la espermatogénesis en el período puberal como para la mantención cuantitativa de la actividad espermatogénica, esto es, para la producción de un número normal de espermatozoides. Sin embargo, cuando existe una deficiencia en los niveles de gonadotrofinas adquirida en la adultez (Hipogonadismo Hipogonadotropo) o inducida experimentalmente (como por ejemplo, administrando dosis altas de testosterona), la producción de espermatozoides puede ser reestablecida administrando sólo LH (Matsumoto, 1996; Plant y Marshall, 2001).

La célula de Sertoli juega un papel crucial en el desarrollo de las células germinales y en la regulación de la función testicular y, por lo tanto, en la expresión del fenotipo masculino. Durante el desarrollo embrio-fetal, la célula de Sertoli dirige la diferenciación de la gónada indiferenciada hacia testículo. Además, la célula de Sertoli, a través de la producción de la hormona anti-Mulleriana (AMH), asegura la regresión del conducto de Müller (Josso y col., 2001, Cotinot y col., 2002;), mediante la activación de dos receptores tipo 1 de la familia de TGFbeta y de 3 receptores BMP en una acción redundante (Orvis y col., 2008). A partir de la pubertad, la célula de Sertoli es esencial en la regulación de la espermatogénesis, es decir, en la diferenciación de las células germinales, la meiosis y la transformación de la espermátida en espermatozoide maduro. Así, el número de células de Sertoli es determinante para el número de células germinales que pueden desarrollarse a través de la espermatogénesis y, por lo tanto, condiciona el tamaño testicular y la extensión de la producción diaria de espermatozoides (Orth y col., 1988, Sharpe, 1994). A nivel local, las funciones de la célula de Sertoli y la espermatogénesis están reguladas por factores paracrinos secretados por las células de Leydig, células peritubulares y células germinales



---

en desarrollo. De la misma manera, las células de Sertoli producen factores (IGF-1, TGF-Beta, IL-1) que regulan la esteroidogénesis en la célula de Leydig (Hikim y col., 2005). Estas interacciones paracrinas recíprocas, Leydig-Sertoli, son cruciales para el éxito de la producción de espermatozoides (Foucault y col., 1994, Barsoum y Yao, 2010). En este sentido, en humanos se ha establecido que los defectos en la regulación paracrina del testículo, consecuentes a alteraciones del microambiente testicular, contribuyen a la fisiopatología de la oligozoospermia y azoospermia idiopática observable en el 40 a 60% de los sujetos infértiles. Estos sujetos muestran defectos de la espermatogénesis a pesar de presentar niveles normales de gonadotropinas (Foresta y col., 2001, Bar-Shira y col., 2000).

La célula de Sertoli inmadura se caracteriza por presentar actividad proliferativa durante el desarrollo fetal, bajo el control de la FSH (Orth, 1984) quedando el número definitivo de células determinado antes de la pubertad. La maduración funcional de la célula de Sertoli, es decir, la adquisición de un fenotipo adulto, ocurre al inicio de la etapa puberal e involucra la pérdida de su capacidad proliferativa regulada por hormonas tiroideas (Van Haaste y col., 1993, Fumel y col., 2012), formación de uniones inter-Sertoli y expresión de funciones celulares específicas (Sharpe y col., 2003). En general, considerando que pueden existir diferencias importantes entre distintas especies, el aumento en las concentraciones de FSH y testosterona en la pubertad, coincidentes con la expresión de receptores de andrógenos, jugarían un papel importante en la maduración de las células de Sertoli (Atanassova y col., 2005, Griswold y McLean, 2006). Aún cuando la maduración funcional de este tipo celular está temporalmente separada del desarrollo y función de la célula de Leydig en la vida fetal, el microambiente testicular durante el período fetal (que se extiende a la vida neonatal) va a ser determinante en su función y comportamiento en el testículo adulto (Kilcoyne y col., 2014). En este sentido, las alteraciones de la actividad proliferativa de las células de Sertoli van a conducir, en el adulto, a una falla testicular primaria. En efecto, se ha propuesto que una serie de patologías andrológicas, tales como, criptorquidia, hipospadias, tumores de células germinales y bajo recuento espermático, tendrían un origen común en una disfunción de las células somáticas del testículo, Sertoli y Leydig, en la etapa fetal. Estos efectos pueden manifestarse en etapa temprana afectando al descenso testicular y masculinización, o en la tardía, induciendo la aparición de cáncer o disminución en el número de espermatozoides (Atanassova y col., 1999; Sharpe y col., 2003)

---

Otras hormonas que juegan un papel fisiológico importante en la regulación de la espermatogénesis son los estrógenos; no obstante, su mecanismo de acción no está claramente establecido, aunque hay una creciente evidencia que los estrógenos ejercen su acción a través de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ . La presencia de estos receptores se ha descrito en varios segmentos del tracto genital (Carreau y Levallet, 2002). La distribución diferencial sugiere que las acciones biológicas del estradiol intratesticular se ejercerían principalmente mediante la activación de receptores beta y en el tracto genital a través de receptores alfa. La fuente de los estrógenos testiculares son los andrógenos sintetizados en la célula de Leydig y en algunos tipos celulares de la línea germinal, particularmente en espermatocitos y espermátidas elongadas en el adulto (Carreau y col., 2006). Los andrógenos por acción de la P450 aromatasa se convierten en estradiol. La P450 aromatasa es un complejo enzimático microsomal presente en varios tejidos compuesto de 2 proteínas: una NADPH-citocromo P450 reductasa y una P450 aromatasa, la cual contiene el grupo heme y la zona de unión al esteroide. En los humanos, la P450 aromatasa es producto del gen Cyp19, el cual pertenece a una familia de más de 500 miembros (Simpson y col. 1994). La aromatasa está presente en las células de Leydig y en las células de Sertoli, proponiéndose que los estrógenos derivan principalmente de la célula de Leydig en el sujeto adulto y de la célula de Sertoli en animales inmaduros. Independiente de la edad, la aromatasa se encuentra en ambos tipos de células pero predomina en las células de Leydig en cerdos, carneros y humanos (Carreau y Levallet, 2000). La presencia de la P450 aromatasa y de receptores alfa y beta se ha descrito en células germinales, particularmente en espermatocitos en paquiteno, en espermátidas y en espermatozoides en ratas machos así como en espermatocitos de ratones y en una especie de reproducción estacional como es el Bank vole o topillo rojo (Carreau y col., 1999, Bilinska y col., 2000). Se ha demostrado que las células germinales no sólo producen estrógenos, sino que tanto los meiocitos como los espermatozoides maduros (incluido humanos) poseen receptores para estos, lo que podría explicar en parte el papel (intracrino/paracrino) de esta hormona en el desarrollo de las células germinales. En el varón, la deficiencia congénita de aromatasa, debida a una mutación en el gen de la P450 aromatasa se asocia a problemas de infertilidad que frecuentemente cursan con bajo recuento espermático (Rochira y col., 2002, Herrmann y col. 2002). Estudios en ratones knockout para aromatasa testicular respaldan los hallazgos en humanos. Estos ratones se caracterizan por una interrupción completa en la

---

espermio genesis a partir de los cinco meses de edad, la cual no sería consecuencia de una hipertrofia de las células de Leydig, o un exceso de testosterona o LH (Robertson y col., 1999).

En contraste con lo anterior, existen evidencias experimentales que demuestran el efecto negativo de la exposición a estrógenos durante el período fetal/neonatal sobre la eficiencia de la espermatogénesis y producción de espermatozoides en roedores. Los resultados de estos estudios sugieren que el efecto estaría mediado a través de una disminución en el número y función de la célula de Sertoli (Sharpe y Skakkebaek 1993). No obstante, aún cuando en humanos la disminución espermática y la calidad del semen ha sido descrita y la evidencia es limitada (Carlsen y col., 1992, 1995, Irvine y col., 1996, Irvine, 1997), es probable que las acciones y consecuencias de la exposición prenatal a estrógeno sean similares a la observada en modelos animales y, en algunos casos, sean consecuencia de xenobioticos con acción estrógenica (Tabb y Blumberg, 2006) En general, la información disponible indica que los estrógenos administrados durante la vida fetal pueden alterar en forma permanente los niveles de FSH (no de LH), de testosterona (y por lo tanto la funcionalidad de la célula de Leydig) y posiblemente también los niveles de inhibina B en el adulto. Resultados similares se han conseguido en carneros expuestos in utero a dietilstilbestrol (DES) desde el día 70 de gestación hasta el parto, en cuanto al número de células de Sertoli y niveles de gonadotropinas al nacimiento (Sweeney y col. 2000). Concomitante con ello, se determinó que la síntesis de FSH estaba reducida y el número de gonadotropos con FSH era menor al de corderos controles (Sweeney y col., 2000). En síntesis, los efectos adversos a la exposición a estrógenos en el macho presentan notables similitudes con aquellos inducidos por una reducción en la exposición a andrógenos, tanto al nacimiento como en la vida adulta. En concentraciones suprafisiológicas, los estrógenos generan “down regulation” de los receptores de andrógenos; por esto, el balance adecuado entre las acciones de andrógenos y estrógenos es crucial para asegurar una función y desarrollo testicular normal.

Se ha propuesto que los estrógenos o compuestos químicos con actividad estrógenica interfieren con la diferenciación y multiplicación de las células de Sertoli durante el desarrollo fetal, alterando la fertilidad futura (Sharpe y Skakkebaek 1993). Sin embargo, resulta particularmente interesante que uno de los posibles efectos negativos de los

---

estrógenos en el testículo es que alterarían la biosíntesis de testosterona disminuyendo la actividad de algunas enzimas que participan en este proceso (Abney, 1999). Debido a que FSH, testosterona e inhibina B reflejan la funcionalidad de la hipófisis, de las células de Leydig y de Sertoli, la disrupción del ambiente hormonal del testículo durante el período prenatal puede inducir una reprogramación de estos distintos tipos celulares con importantes secuelas fisiopatológicas para la fertilidad del individuo (Kilcoyne y col., 2014).

### **1.3. Factores que regulan la expresión de AMH en el testículo de mamíferos**

La AMH es una glicoproteína dimérica, miembro de la superfamilia de los TGF- $\beta$ . La AMH señala intracelularmente a través de un complejo heterodimérico, consistente en 2 receptores relacionados con actividad serina/treonina kinasa. Tras la unión de AMH al receptor tipo II, el receptor tipo I es reclutado al complejo y es fosforilado por el receptor tipo II. La AMH es producida principalmente en las células de la granulosa ovárica y células de Sertoli, pero no exclusivamente ya que su presencia y de su receptor ha sido demostrada en otros tejidos (Catlin y col., 1997, Wang y col., 2005, Wittmann y McLennan, 2011). Su expresión diferencial en el ovario y en el testículo es crucial para la diferenciación normal de las estructuras reproductivas (Cate y col.1986). En los testículos se expresa desde la vida fetal temprana (Picon 1969; Taguchi y col., 1984), mientras que en el ovario se expresa desde la etapa fetal tardía (Rajpet-De Meyts y col. 1999; Rey y col. 2003).

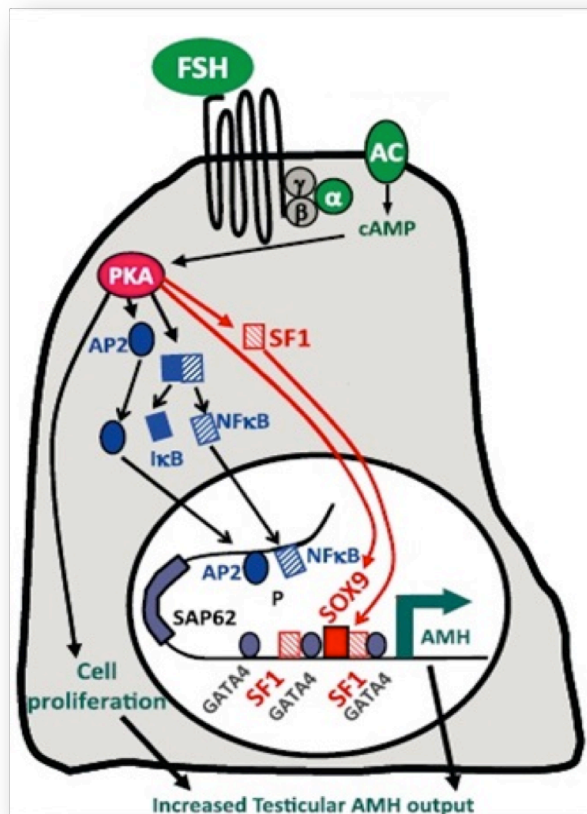
En las células de Sertoli, la síntesis de AMH es regulada por SOX9 (Sry –related HMG BOX9), SF1 (steroidogenic factor) y GATA-4 (promoter Zinc finger transcription factor) a través de sus respectivos sitios de unión (Lasala y col. 2011). GATA-4 aumenta la expresión de AMH uniéndose directamente al DNA, cooperando con SF1. A su vez, la transactivación por SF1 puede ser sinergizada por WT1 (Wilms Tumour 1 protein). Por otro lado, DAX 1 tiene un efecto antagónico y se opone al efecto sinérgico entre WT1 y SF1, y entre GATA-4 y SF1 (Shen y col.1994; Giuli y col.1997; Viger y col.1998; Arango y col.1999, De Santa Barbara y col.1998, De Santa Barbara y col. 2000). Algunos de estos

---

factores, tales como SOX-9, WT-1 y SF1 han sido detectados en testículo fetal ovino (Payen y col. 1996, 1997).

Se ha demostrado que en el testículo, altos niveles de FSH son capaces de aumentar la producción de AMH (Lukas-Croissier y col. 2003) a través de la activación de la subunidad Gs de la proteína G, lo que conduce a un aumento del AMPc y a la activación de la PKA, utilizando secuencias que se encuentran a más de 400pb sobre el sitio de inicio de transcripción de AMH (Lukas-Croissier y col., 2003; Lasala y col., 2004). A diferencia de la mayoría de los genes regulados por PKA, el promotor de AMH no cuenta con un elemento de respuesta a AMPc (CRE). Sin embargo, se han encontrado sitios de unión a NFkappaB en la posición -2208 y un sitio de unión a AP2 a -1936 del promotor de AMH. Estos, al ser fosforilados por PKA, serían los responsables de la activación transcripcional de AMH en respuesta a FSH en el testículo (Lukas-Croissier 2003). Lasala y col. (2011) han propuesto que FSH, al aumentar el cAMP, activa varias kinasas. PKA es la principal kinasa que aumenta junto a los niveles nucleares de SOX9, SF1 y GATA4 (en la región proximal del promotor) y de AP2 y NF-KB (en la región distal de las secuencias del promotor), conduciendo a un aumento en la expresión de AMH. El aumento de la FSH circulante lleva a la activación del cAMP, lo que se traduce en un aumento de la proliferación de las células de Sertoli y la expresión de la AMH en cada célula de Sertoli, aumentando la secreción de AMH. Esto se observa durante la segunda parte de la vida fetal, en los primeros estados de la vida postnatal y hasta el inicio de la pubertad (Lasala y col., 2011).

Los factores de transcripción que se expresan en las células de Sertoli también se expresan en la célula de la granulosa (Salmon y col., 2004, Salmon y col., 2005) con excepción de SOX9, que es esencial para la expresión de AMH en Sertoli (Kent, 1996). El receptor de AMH en el ovario se expresa desde la vida fetal hasta la etapa adulta en las células de la granulosa de los folículos pre-antrales y antrales (Baarends y col., 1995).



*Figura 1. Representación esquemática de la producción de AMH en condiciones basales y bajo estímulo de FSH (Lasala y col., 2011).*

#### 1.4. Célula de Sertoli durante el desarrollo

Como se mencionó anteriormente, las células de Sertoli diferenciadas secretan AMH y factores de crecimiento que regulan la función de la célula de Leydig e inducen la diferenciación de las CMP (Mackay y Smith 2007). Las CMP expresan una alta proporción de receptores de andrógenos y, por lo tanto, son un blanco de acción para los andrógenos (Vornberger y col., 1994; Zhou y col., 2002), los cuales estimulan la producción de los llamados factores peritubulares que modulan la función de la célula de Sertoli (P-mod-S), tales como transferrina, inhibina, activina y ABP (Mullaney y col., 1994; Norton y col., 1994). En relación al receptor de andrógenos (RA), este no se expresa en células de Sertoli inmaduras; sin embargo, como se mencionó anteriormente, las CMP son ricas en este tipo

---

de receptor y modelos knock-out selectivos para RA en CMP han mostrado una disminución del volumen testicular y del número de células germinales (Zhang y col., 2006). Recientemente, se ha descrito la presencia de un RA funcional en gonocitos, el cual al parecer está relacionado con la inhibición de la proliferación de estas células (Merlet y col., 2007). En base a estos antecedentes es factible pensar que los andrógenos puedan afectar el desarrollo del testículo fetal. Sin embargo, el rol de los andrógenos en la función testicular durante la vida fetal es menos conocido que en la vida postnatal. En los ovinos, la AMH y testosterona son detectables desde del día 30 de gestación (Attal 1969; Payen col., 1996). El RA se expresa a partir del día 40 de gestación en las células intesticiales. En las células de Sertoli, al igual que en los primates, el RA no se expresa durante toda la vida fetal (Sweeney y col., 1997).

En humanos, exceptuando una disminución transitoria durante el periodo perinatal, la secreción de AMH por las células de Sertoli se mantiene elevada hasta la pubertad (Rey y col., 2003), momento en el cual estas células maduran adquiriendo la funcionalidad necesaria para sustentar la espermatogénesis (Rey y col., 1996a; Rota y col., 2002). Durante el desarrollo puberal humano, la expresión de AMH disminuye concomitantemente con el inicio de la meiosis de las células germinales (Rey y col., 1996b; Rajpert-De Meyts y col., 1999) y el aumento de los andrógenos intratesticulares (Pasqualini y col., 1981). Al comenzar la espermatogénesis se produce un incremento en el número de receptores de FSH, lo que aumenta la sensibilidad a esta hormona (Heckert & Griswold 1993). Se ha demostrado que los altos niveles de FSH son una importante señal proliferativa y de producción de AMH en las células de Sertoli, aunque al parecer durante la pubertad prima el efecto inhibitorio de los andrógenos sobre la síntesis de esta (Rey y col., 2003). En la oveja, las células de Sertoli continúan proliferando desde el nacimiento hasta la pubertad donde alcanzan su número máximo alrededor de los 40 a 80 días postnatal (Hochereau-de Reviers y col., 1987). En ovinos, al igual que en humanos, la secreción de FSH durante la etapa fetal presenta una elevación característica en la mitad de la gestación (Sklar y col., 1981; Mulchahey y col., 1987), lo que podría estimular la proliferación de las células de Sertoli; sin embargo, en la fases iniciales del desarrollo testicular, la célula de Sertoli no es dependiente de FSH (Rey y col., 2003).

---

Existen diversos marcadores que nos permiten obtener información sobre la función de la célula de Sertoli tanto en su estado inmaduro como maduro. Por ejemplo, la expresión de P450arom y de AMH son desensibilizadas cuando éstas adquieren el fenotipo maduro. La expresión de AMH es característica de las células inmaduras y su desaparición, en la pubertad, es coincidente con la aparición de células meióticas y de receptores androgénicos. La presencia de altas concentraciones de AMH en el plasma sanguíneo y seminal es indicativa de una falla en la maduración funcional de la célula de Sertoli. Por otra parte, el número de células de Sertoli/testículo determina los niveles de inhibina B, hormona secretada por las células de Sertoli y que inhibe la secreción de FSH por retroalimentación, de tal forma que constituiría un buen marcador de funcionalidad de la célula de Sertoli (Anderson y Sharpe, 2000, Sharpe y col., 2003).

### **1.5. Barrera hemato-testicular**

Las células de Sertoli en su trayectoria de maduración establecen interacciones muy complejas entre ellas y con las células germinales. Esas interacciones dan origen a la barrera hemato-testicular (BHT), que es un componente esencial en la función testicular ya que permite la separación de las células germinales del sistema inmunológico. La BHT como barrera física está constituida por un gran complejo inter-células de Sertoli, compuesto de las uniones estrechas (tight junctions), las uniones Gap, la especialización ectoplásmica y las uniones tipo desmosoma (Stanton, 2016). Este complejo, localizado cerca de la base del epitelio tubular, permite la creación de 2 compartimientos, uno basal y el otro adluminal (Dym y Fawcett, 1970; Cavicchia y Sacerdote, 1988, Stanton, 2016). En el compartimiento basal residen las espermatogonias y los espermatocitos en preleptoteno y leptoteno, y en el compartimiento adluminal residen los espermatocitos meióticos y espermátidas en diversas etapas de la espermiogénesis. Se establecen diferentes uniones en la BHT, las cuales se ensamblan y desensamblan para permitir el paso de las células germinales en maduración hacia el lumen del túbulo (Mruk & Cheng, 2004). En la BHT, entre células de Sertoli y células germinales se establecen uniones adherentes formadas por caderinas, cateninas, y vinculinas (Cheng & Mruk, 2002). Las uniones de tipo gap-junction están formadas por conexinas, entre las cuales conexina 43 es la más abundante, y se ha observado que esta molécula es esencial para la maduración y proliferación de las células de Sertoli (Sridharan y col., 2007; Brehm y col., 2007). En ratones knock out para conexina



---

43, las células de Sertoli no se diferencian totalmente, se reduce la espermatogénesis y en algunos túbulos seminíferos se observan solo células de Sertoli (Brehm y col., 2007). Connexina 43 de las gap junctions entre células de Sertoli y células germinales indirectamente también controlan el número de células germinales y la integridad de las ocludinas o cadherinas (Guilleron y col., 2009, Carette y col., 2010, Kidder y Cyr, 2016). Los mecanismos que regulan la formación de uniones estrechas y de la barrera hemato-testicular son parcialmente conocidos (Yan y col., 2008). Algunos estudios *in vivo* han sugerido que los andrógenos estarían relacionados con la regulación de la síntesis y localización de ocludinas y claudinas (Mruk y Cheng, 2004). En ratas, la testosterona modula la expresión de claudina 11 y su localización junto con ocludina en las uniones Sertoli-Sertoli (Kaitu'u-Lino TJ 2007). Lo que si se acepta es que la formación de la BHT coincide con el aumento de las gonadotropinas durante el desarrollo puberal (Russell y Peterson, 1985). Durante la espermatogénesis, la BHT se abre y cierra para permitir que las células germinales avancen hacia el compartimiento adluminal. Este mecanismo permitiría un determinado número de espermios en el eyaculado, de tal forma que cualquier alteración de la BHT repercutiría en la concentración espermática y como resultado de ello, en la fertilidad masculina. Es probable que las alteraciones podrían empezar en la etapa fetal, tal como ha sido propuesto para el efecto de contaminantes ambientales (Guilleron y col., 2011), y por extensión de esa hipótesis, se podría postular el efecto de la hiperestimulación con testosterona en la reprogramación fetal del funcionamiento gonadal.

### **1.6. Control neuroendocrino prenatal en el feto macho**

El eje hipotálamo-hipófisis-testículo forma el eje gonadal masculino, el cuál es altamente activo durante el desarrollo fetal para asegurar que la gónada fetal masculina secrete testosterona para asegurar la masculinización del cerebro y el desarrollo de otros órganos, incluyendo la misma gónada. Se considera que en el feto, el control neuroendocrino está dado por la relación GnRH-Gonadotropinas y testosterona, tal como ocurre en el adulto. Sin embargo, en la rata, las primeras células de Leydig aparecen a los 14.5 días post fecundación y secretan testosterona a los 15 días post fecundación (Habert y col., 2001). La detección de LH en plasma ocurre a los 18.5 días post fecundación, por lo cual se considera que los primeros estadios del desarrollo y de la función de las células de Leydig son LH-

---

independientes. Después de esta fecha, la célula de Leydig fetal, al igual que la célula de Leydig adulta, es altamente dependiente de LH (Roullier-Fabre y col., 2003).

En el carnero se ha establecido que la diferenciación gonadal ocurre antes del día 50 de gestación (duración de la preñez: 150 días), por lo que se considera que entre los 30 y 90 días es la etapa crítica de sensibilidad del SNC a los esteroides gonadales. En el feto, la exposición a la testosterona determina que la red de neuronas GnRH se organice para iniciar una secreción de tipo pulsátil (Robinson y col., 2002, Robinson y col., 2003). La testosterona fetal conduce a cambios en la estructura tisular del hipotálamo organizando una zona especial presente en machos que se conoce como núcleo dimórfico sexual ovino del área preóptica del hipotálamo y que se organiza después de la masculinización de los genitales (Rosselli y col., 2007; Roselli y col., 2011). Por otro lado, la LH y FSH se han detectado en el plasma a partir de los 81 días de gestación (Clarke y col., 1984) y la testosterona alrededor de los 50 días de gestación (Rae y col., 2002). Es altamente probable que, al igual que se ha observado en roedores, la esteroidogénesis y el desarrollo gonadal temprano del ovino sean independientes de las gonadotrofinas. El aumento de gonadotrofinas en la mitad de la gestación ovina, particularmente la FSH, tendría una relación con el número futuro de células de Sertoli. El bloqueo de la secreción de gonadotropinas en fetos ovinos ocasiona una disminución en el tamaño del testículo al nacimiento, asociado a una reducción en el número de células de Sertoli (Thomas y col., 1994). Una situación similar se ha descrito en ratas machos, en las cuales el bloqueo de la secreción de gonadotrofinas durante el periodo neonatal influye en el peso del testículo, en el número de células de Sertoli y en la producción de espermios en el macho adulto (Orth, 1984; Orth y col., 1988).

En humanos, las células de Leydig presentes en la gónada fetal comienzan a secretar testosterona a la 9ª semana, el descenso de los testículos hacia las cavidades escrotales se inicia en la 10ª semana, y los niveles de testosterona en el suero alcanzan sus máximos valores entre las semanas 12ª a 16ª (Prince, 2001). Durante el período fetal, la producción inicial de andrógenos está controlada por la hormona hCG placentaria, mientras que en las etapas finales de la vida fetal y en la vida postnatal ésta es dependiente de la LH.

Los andrógenos producidos por las células intersticiales de Leydig, en el testículo fetal y neonatal, juegan un papel central en el desarrollo del fenotipo masculino. Sus acciones son

---

cruciales en la regulación de los procesos que llevan a establecer el dimorfismo sexual y que incluyen la diferenciación y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, la regulación de la conducta sexual y las características masculinas de diversos tejidos extragenitales tales como cerebro, músculo, riñón y testículo, entre otros (Kacsoh, 2000, Jockenhövel y Schubert, 2009). Los efectos biológicos de los andrógenos están mediados por un receptor de andrógenos (RA), el cual se une tanto a la testosterona como a su metabolito dehidrotestosterona (DHT), siendo este último el que demuestra una mayor afinidad por el receptor. Durante el período fetal, la célula de Leydig exhibe la capacidad de metabolizar la testosterona a DHT por acción de la enzima microsomal  $5\alpha$  reductasa-2 (Yao y Barsoum, 2007). La DHT es determinante en el desarrollo de los genitales externos masculinos, proceso que se inicia en humanos en la novena semana de gestación y se completa en la semana 15. Es ampliamente conocido que tanto la deficiencia de  $5\alpha$  reductasa como la resistencia a la acción androgénica por defectos en el gen del receptor de T son las causas más comunes que conducen a ambigüedad genital y al síndrome de resistencia a la testosterona (insensibilidad a andrógenos) (Griffin, 1992, Brown, 1995). En humanos, los niveles de DHT están elevados antes de la pubertad, experimentando una disminución a medida que aumenta la concentración de las enzimas responsables de la síntesis de testosterona. Por esto, el incremento en la secreción de testosterona en la pubertad no sólo se debe a un aumento de las enzimas que promueven su síntesis, sino también a una disminución de aquellas que intervienen en su metabolización. Es probable que en ovinos, el rol fisiológico de la DHT postnatal sea escasa, a diferencia de los humanos.

### **1.7. Reprogramación fetal y función reproductiva**

La función reproductiva de los animales y humanos puede ser afectada por numerosas influencias ambientales, las cuales actuarían en diferentes etapas del desarrollo fetal y modificarían la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. El aumento de infertilidad en humanos en los últimos años se explicaría en base a fenómenos que ocurren en la gónada masculina durante el desarrollo fetal y que incluyen a la célula de Sertoli y a la célula de Leydig, producto de fenómenos genéticos, epigenéticos y del microambiente uterino (Juul y col., 2014).

---

En humanos, la actividad del generador de pulsos de GnRH, la secreción gonadotrópica y la función del testículo fetal se pueden alterar por factores provenientes de la madre como son la restricción del aporte energético, el tabaco, el alcohol, el estrés y la presencia de los denominados “disruptores endocrinos”, que son compuestos químicos exógenos (xenobióticos) que imitan o bloquean a las hormonas esteroideas interactuando con su receptor (McLachlan 2001). De acuerdo a estudios experimentales, ha surgido la hipótesis de que compuestos químicos con efecto masculino o femenino podrían actuar como disruptores endocrinos produciendo alteraciones en el desarrollo del sistema reproductivo (Mori 2001; Anderson y col., 2000). Además, hay que tener presente que las hormonas endógenas del feto pueden actuar como “disruptores endocrinos” cuando se encuentran en concentraciones supra fisiológicas. Por lo tanto, un disruptor endocrino es cualquier hormona que produce un desequilibrio en el sistema endocrino (Fisher, 2004). En ovinos, el efecto reprogramador de disruptores endocrinos de origen ambiental se ha estudiado sobre todo en la hembra.

En humanos se ha propuesto que habría un aumento en la incidencia de alteraciones reproductivas masculinas tales como anormalidades de los genitales externos, cáncer testicular, disminución de la calidad del semen y posiblemente aumento de la frecuencia de criptorquidia, hipospadia y subfertilidad (Boisen y col., 2001; Shakkeback y col., 2001, Den Hond y col., 2015). Todas estas anormalidades se han englobado bajo una entidad común denominada síndrome de disgenesia testicular (TDS o testicular dysgenesis syndrome). Se ha postulado que este síndrome se debería a una disrupción de la programación embrionaria y del desarrollo gonadal durante la etapa fetal, y que su aumento tendría una asociación causal con disruptores endocrinos medioambientales (Boisen y col., 2001, Martin y col., 2008). La evidencia epidemiológica en un estudio reciente plantea que hay un pequeño aumento en el riesgo de desordenes reproductivos en los varones producto de la exposición a xenobióticos pero aun faltan estudios en este sentido (Bonde y col., 2016).

Un ejemplo conocido del efecto negativo de un disruptor hormonal sobre la espermatogénesis en la etapa adulta la constituyen los estrógenos. Se sabe que la exposición prenatal o neonatal de fetos machos a altas concentraciones de estradiol resulta en una disminución del número de células de Sertoli, eficiencia de la espermatogénesis y aumento

---

de la apoptosis (dependiente de la concentración) en la etapa adulta (Sharpe y col., 1998, Viguera-Villaseñor y col., 2006, Lassarguere y col., 2003). El uso de dietilestilbestrol (DES) en la prevención de parto prematuro se encontró claramente asociado a un aumento de cáncer testicular, criptorquidia e hipospadía en los hijos varones de las mujeres tratadas (Veurink y col., 2005, Reed y Fenton, 2013). Paralelamente, en el varón se ha observado una disminución en el número de espermatozoides en los últimos 50 años, asociado al aumento del uso y presencia ambiental de numerosos compuestos con actividad estrogénica (Carlsen y col., 1995). Estos resultados demuestran claramente que la exposición a concentraciones suprafisiológicas de estrógenos durante el período prenatal, es crítica e induce una reprogramación permanente del eje hipotalamo-hipófisis-gónada que se va a traducir en una alteración de la función testicular en el adulto. El efecto reprogramador de la deficiencia de testosterona también ha sido estudiado y sus consecuencias previsibles en la concentración espermática, en el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis gónada, que consecuentemente determina una disminución en la concentración sanguínea de testosterona. La deficiencia de andrógenos o su ausencia durante la diferenciación sexual culmina con intersexualidad y ausencia de masculinización de los genitales externos, anormal posición de los testículos y micropene (Jockenhövel y Schubert, 2009). No obstante, el efecto de concentraciones suprafisiológicas de andrógenos durante la etapa fetal sobre la función del eje reproductivo masculino ha sido menos documentada. Nuestros estudios han resaltado un fenómeno opuesto a lo encontrado con exposición a altas concentraciones de estradiol, y que es la presencia de un mayor número de células de Sertoli en el túbulo seminífero en machos ovinos nacidos de madres tratadas con un exceso de testosterona y que presentan hiperandrogenemia. Si ese fenómeno fuese consecuencia de una aromatización de la testosterona, en base a los fenómenos observados con altas concentraciones de estrógenos como se mencionó más arriba, se debería haber observado el fenómeno opuesto, es decir, reducción en el número de células de Sertoli.

### **1.8. Exposición prenatal a andrógenos y función reproductiva**

Estudios clínicos y experimentales demuestran que la exposición prenatal a andrógenos tiene una serie de consecuencias deletéreas en la vida adulta. Estudios en animales (monas, ovejas, ratas) establecen que la exposición prenatal a testosterona conduce a retardo del crecimiento intrauterino, infertilidad, obesidad, insulino resistencia y cambios de conducta

---

de las crías hembras en su vida postnatal (Clarke y col.1977, Abbott y col.1998; Ozanne, 2001, Birch y col. 2003; Wolff y col. 2002, Recabarren y col. 2003; Rosser y col. 2003; Recabarren y col, 2005; Manikkam y col. 2006). Además, estudios en hembras ovinas androgenizadas *in útero* muestran que la exposición a la testosterona durante el periodo crítico del desarrollo cerebral puede adelantar el inicio del aumento característico de la secreción de LH, que conduce a la pubertad en la hembra ovina, fenómeno que además se hace independiente del fotoperíodo, lo que es una característica del macho. Adicionalmente, la administración de dihidrotestosterona (DHT) a la madre permite diferenciar el efecto de los andrógenos aromatizables de los no aromatizables, estableciéndose que la aromatización es necesaria para prevenir el incremento preovulatorio de GnRH, una característica de la hembra (Masek y col., 1999; Sharma y col., 2002).

En humanos, un modelo clásico de EPA es la hiperplasia virilizante congénita por un déficit de la 21-hidroxilasa, una enzima clave en la esteroidogénesis adrenal. En ella, la excesiva producción de andrógenos por la adrenal del feto produce una autoandrogenización, lo que en la vida post natal se evidencia por la presencia de genitales ambiguos y trastornos menstruales en las niñas, virilización progresiva, disminución de la fertilidad en nacidos de ambos sexos y, finalmente, aumento de la conducta agresiva, semejante a lo descrito en modelos animales (New 2001; New y col., 2001; Barenbaum y col. 2000). El síndrome hiperplasia adrenal congénita además presenta varias características que exhiben las mujeres con SOP, lo que llevó a proponer que la hiperandrogenemia materna es la que programa el SOP en las hijas de esas madres. En varones con hiperplasia adrenal congénita se ha demostrado que los parámetros seminales están alterados, con una alta prevalencia en fecundidad reducida (Reisch y col., 2009, King y col., 2016), y además no alcanzan la altura que predeterminan sus padres (Cabrera y col., 2001). Si bien estos estudios y nuestras observaciones sugieren un compromiso de la función reproductiva masculina por el exceso de andrógenos durante la vida fetal, ésta ha sido menos estudiada que el impacto que genera la EPA sobre el eje reproductivo de la hembra o de la mujer. En este sentido, estudios previos realizados por nuestro equipo de investigación muestran que la EPT en machos ovinos conduce a modificaciones importantes en el eje gonadal masculino. En un primer estudio se estableció que la secreción de LH y testosterona en respuesta al test de análogo de GnRH se encontraba alterada (Recabarren y col. 2007). Además, se pudo establecer que la concentración de espermatozoides en el eyaculado de

---

machos ovinos nacidos de madres expuestas a un exceso de testosterona y DHT era significativamente menor que la observada en machos nacidos de madres controles en el período comprendido entre las 26 (edad postpuberal) y las 40 semanas de edad (edad adulta). Este fenómeno se asoció a un menor perímetro escrotal y alteraciones en la motilidad espermática (Recabarren y col. 2008). El análisis histológico del testículo de estos machos adultos (40 semanas de edad) mostró la presencia de un mayor número de células de Sertoli, con tendencia a presentar una menor altura del epitelio, menor diámetro tubular, menor diámetro del lumen de los túbulos seminíferos y un menor número de células intratubulares, espermatoцитos I y espermátidas, que los machos nacidos de madres controles (Rojas-García y col., 2010). Estas observaciones indican un marcado compromiso testicular como consecuencia de la exposición prenatal a testosterona y DHT, sugiriendo un efecto androgénico directo. Estos resultados se asocian a la observación de una mayor expresión del gen del receptor de FSH y del receptor de TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante  $\beta$ ) en estos machos (Rojas-García y col. 2010). Tanto el receptor de FSH como el de TGF- $\beta$  se encuentran en las células de Sertoli; esto permite especular que el mayor impacto de la EPT se ejercería sobre las células de Sertoli, lo cual se complementa con la presencia de un mayor número de estas células en el epitelio tubular. Sin embargo, los mecanismos y la ontogenia de estos efectos se desconocen, lo que lleva a preguntarse si estos fenómenos de reprogramación o epigenéticos se establecen desde la etapa fetal, o se desarrollan en la vida postnatal.

---

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral se aborda el impacto que ocasiona la exposición prenatal a un exceso de testosterona en el eje gonadal de ovinos machos en su vida postnatal, como modelo experimental de reprogramación fetal.

La hipótesis de partida planteada fue que la exposición prenatal a un exceso de testosterona durante un período crítico del desarrollo fetal compromete la función del eje gonadal de los machos y compromete el funcionamiento testicular a través de mecanismos que controlan la proliferación y la función de las células de Sertoli y/o de Leydig.

Para ello, se exploraron los mecanismos y la ontogenia de los efectos derivados de un exceso de testosterona durante la etapa prenatal sobre el eje gonadal del macho ovino, lo que condujo a preguntarnos si los fenómenos de reprogramación o epigenéticos se establecen desde la etapa fetal o, por el contrario, se desarrollan en la vida postnatal. Se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar los efectos de la exposición fetal al exceso de andrógenos (testosterona o DHT) sobre el eje hipotálamo-pituitario mediante el estudio de la **pulsatilidad de LH** en diferentes fases del desarrollo sexual postnatal en machos (*en Artículo 1*).
2. Evaluar si la exposición fetal a un exceso de testosterona causa una disrupción temprana en la **población celular testicular** y en **mediadores locales de la función testicular** (*en Artículo 2*).
3. Evaluar la **respuesta del eje pituitario-gonadal y el compromiso de la función testicular tras la administración de análogos a la GnRH** en machos expuestos prenatalmente a testosterona (*en Artículo 3*).





---

### 3. PUBLICACIONES QUE CONFORMAN ESTA TESIS DOCTORAL

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se muestran en forma de artículos, todos ellos aceptados, y de otros estudios presentados en Congresos Internacionales. A continuación se citan dichos artículos:

#### **ARTÍCULO 1. PRENATAL EXPOSURE TO ANDROGEN EXCESS INCREASE LH PULSE AMPLITUDE DURING POSTNATAL LIFE IN MALE SHEEP.**

Recabarren SE, Recabarren M, Rojas-García PP, Cordero M, Reyes C, Sir-Petermann T. 2012. Hormone and Metabolic Research 44:688-693.

Indice de impacto: 2.145
Lugar que ocupa/nº de revistas: 77/122
Area temática: Endocrinology and Metabolism
Cuartil: Q3

Se evalúa el efecto que puede tener la exposición fetal a un exceso de andrógenos sobre el eje hipotálamo-pituitario, para lo cuál se estudió la pulsatilidad de LH en diferentes fases del desarrollo sexual postnatal en corderos nacidos de ovejas tratadas con testosterona o dihidrotestosterona durante la gestación.

Resultados demuestran que los corderos machos estudiados responden a la androgenización prenatal y sugieren que los tratamientos alteran de forma transitoria la amplitud de los pulsos de LH, probablemente como resultado de alteraciones en el patrón de respuesta hipofisaria o en el patrón de liberación de GnRH.

---

**ARTÍCULO 2. ALTERED TESTICULAR DEVELOPMENT AS A CONSEQUENCE OF INCREASE NUMBER OF SERTOLI CELL IN MALE LAMBS EXPOSED PRENATALLY TO EXCESS TESTOSTERONE.** Rojas-Garcia, PP, Recabarren MP, Sir-Petermann T, Rey R, Palma S, Carrasco A, Perez-Marin C.C., Padmanabhan V., Recabarren SE. 2013. Endocrine 43:705-713. DOI 10.1007/s12020-012-9818-5

Indice de impacto: 3.527
Lugar que ocupa/nº de revistas: 49/124
Area temática: Endocrinology and Metabolism
Cuartil: Q2

El presente trabajo estudia la hipótesis de que la exposición fetal a un exceso de testosterona pueda causar una alteración temprana en la población celular testicular y en mediadores de la función testicular expresados localmente.

En este trabajo, se estudiaron 12 corderos nacidos a madres que habían sido expuestas a diferentes cantidades (excesivas) de testosterona durante la gestación.

Se analizó el efecto de las mencionadas dosis de testosterona sobre los parámetros testiculares, incluyendo número de células de Sertoli y expresión de genes críticos (FSRH, AR, TGFB1, TGFB3, TGFBR1, AMH) que modulan la función testicular.

Este trabajo refleja que la exposición a elevadas dosis de testosterona durante la época prenatal provoca un importante impacto en etapas tempranas de la vida postnatal, concretamente incrementando el número de células de Sertoli, lo que podría explicar la disfunción testicular detectada en esos individuos cuando son adultos.

---

**ARTÍCULO 3. PITUITARY AND TESTIS RESPONSIVENESS OF YOUNG MALE SHEEP EXPOSED TO TESTOSTERONE EXCESS DURING FETAL DEVELOPMENT.**

Recabarren MP, P P Rojas-Garcia, R Einspanier, V Padmanabhan, T Sir-Petermann, S E Recabarren. 2013. *Reproduction* 145:567-576.

Indice de impacto: 3.262
Lugar que ocupa/nº de revistas: 7/30
Area temática: Reproductive Biology
Cuartil: Q1

Este trabajo analiza la respuesta hipofisaria (concretamente en la liberación de LH) de machos nacidos después de su exposición a niveles elevados de testosterona durante la gestación, empleando un test de respuesta a un análogo de la GnRH.

Para ello, se analizaron los patrones de expresión del receptor LH y de enzimas esteroideogénicas como la P450c17,20 lyase, 17 $\beta$ -hidroxysteroid dehydrogenase, P450 aromatase, P450scc y 3 $\beta$ -HSD en tejido testicular y la expresión de P450c17, P450scc, 17 $\beta$ HSD type 3 y 3 $\beta$ HSD en células de Leydig cultivadas antes y después de estimularlas con HCG.

Los resultados demuestran que el tratamiento prenatal con testosterona incrementa la respuesta hipofisaria a GnRH, mientras que disminuye la sensibilidad del testículo. El fallo testicular para responder a una liberación elevada de LH parece estar relacionada con la downregulation de los receptores de LH y la falta de cambios a nivel de las enzimas esteroideogénicas.



---

## **TRABAJO DE INVESTIGACIÓN 1**

### **PRENATAL EXPOSURE TO ANDROGEN EXCESS INCREASE LH PULSE AMPLITUDE DURING POSTNATAL LIFE IN MALE SHEEP.**

S. E. Recabarren, M. Recabarren, P. P. Rojas-Garcia, M. Cordero, C. Reyes, T. Sir-Petermann

Horm Metab Res 2012; 44: 688–693



# Prenatal Exposure to Androgen Excess Increases LH Pulse Amplitude During Postnatal Life in Male Sheep

## Authors

S. E. Recabarren<sup>1</sup>, M. Recabarren<sup>1</sup>, P. P. Rojas-García<sup>1</sup>, M. Cordero<sup>1</sup>, C. Reyes<sup>1</sup>, T. Sir-Petermann<sup>2</sup>

## Affiliations

<sup>1</sup>Laboratory of Animal Physiology and Endocrinology, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Concepción, Chillán, Chile

<sup>2</sup>Laboratory of Endocrinology and Metabolism, Western Division, School of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, Chile

## Key words

- androgen
- gonadotropin
- polycystic ovary syndrome
- testes
- anterior pituitary
- fetal programming

## Abstract

Prenatal exposure to excess testosterone has a profound impact on reproductive and metabolic functions in young and adult female sheep. Nevertheless, few studies have addressed the impact of prenatal exposure to an excess of androgens on reproductive and metabolic functions in males. The aim of the present study was to assess the impact of prenatal exposure to an excess of testosterone or dihydrotestosterone on the luteinizing hormone (LH) pulse characteristics during sexual development in male sheep. Control male sheep (C-males) and males born to mothers exposed to twice weekly injections of 30 mg testosterone or dihydrotestosterone from day 30–90 and 40 mg from day 90–120 of gestation (T-males, DHT-males) were studied at 5, 10,

and 20 weeks of age, ages that represent infancy, early prepubertal, and late prepubertal stages of sexual development in this species, respectively. Patterns of LH pulsatility showed that T- and DHT-males exhibited a higher secretion of LH during the 6-h study and a higher amplitude of the LH pulses compared with C-males. Moreover, nadir of the pulses was higher in T- and DHT-males compared with C-males. Frequency of LH pulses, however, was not different within ages or between groups. These results show that males can be responsive to prenatal androgenization and suggest that treatment transiently alters the amplitude of LH pulses probably as the result of defects in the pituitary responsiveness pattern or in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release pattern.

received 12.12.2011  
accepted 25.05.2012

## Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1316291>  
Published online:  
July 4, 2012  
Horm Metab Res 2012;  
44: 688–693  
© Georg Thieme Verlag KG  
Stuttgart · New York  
ISSN 0018-5043

## Correspondence

**S. E. Recabarren**  
Laboratory of Animal  
Physiology and Endocrinology  
Faculty of Veterinary Sciences  
University of Concepcion  
Casilla 537  
Chillan  
Chile  
Tel.: +56/42/208 834  
Fax: +56/42/270 212  
srecabar@udec.cl

## Introduction

In adult rams and ewes, the harmonic balance between hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency, pituitary luteinizing hormone (LH) pulse frequency, and gonadal hormone-mediated negative feedback regulation of hypothalamic-pituitary function contributes to homeostatic levels of circulating gonadal hormones, and the latter's maintenance of sexual characteristics. GnRH plays a key role in the development and control of the reproductive axis in rams, which is illustrated by the demonstration that immunization against GnRH causes delayed testicular growth, a reduction in sexual mounting interest, and lower LH and testosterone (T) concentrations during the peripubertal stage of life [1,2]. In ewes, this same treatment diminishes the frequency of estrous cycles, results in small ovaries, and reduces circulating levels of LH and follicle-stimulating (FSH) [3], indicating that GnRH is also key for pituitary and ovarian function.

The programming effect of androgens during fetal life can overtly impact this balance in reproductive physiology during postnatal life. When females of different species, including sheep, are exposed to T during fetal life, they develop incomplete or complete genital virilization [4–7], as occurs in girls and women with classical adrenal hyperplasia syndrome [8–10]. In fact, early exposure to androgen excess during fetal life has profound consequences on fetal programming in young and adult female sheep [11,12]. So far, much work has been undertaken to unravel the effect of androgen fetal programming in female sheep, but few studies have addressed the consequences of excess fetal T in rams born to dams subjected to high levels of T during pregnancy, and the effects upon specific systems as the GnRH-LH axis.

It may be enticing to argue that excess testosterone during fetal development may be devoid of postnatal consequences in reproductive function in males, since testosterone is a fundamental element for multiple, species-specific male traits,





including reproductive tract and genital development [13,14]. Previous studies from our laboratory, however, have shown that males born to dams exposed to excess fetal T exhibit a dramatic reduction in sperm count and sperm motility [15], suggesting that excess fetal T alters male reproductive function. One frequent question concerning prenatal androgenization (PA) is whether the developing fetus is actually under an excess T treatment. This question has been properly answered by Veiga-Lopez et al. [16] who showed that male and female sheep fetuses under PA have elevated T plasma levels compared with non-PA counterparts. One target of fetal T excess may be the testis, as has been shown in earlier studies [15,17]. The mechanisms involved in these alterations, however, are not well known. Considering that testicular function depends on pituitary gonadotropin stimulation, another target of potentially deleterious effects of excess fetal testosterone may be the hypothalamus-pituitary gland axis (GnRH-LH axis), in which normal function is programmed by fetal testosterone to have a masculine pattern of GnRH-LH release [18,19]. As with the testis, this axis may be a potential target of excess fetal testosterone. To evaluate the effect of fetal exposure to an excess of androgens on the hypothalamus-pituitary axis, a LH pulsatility study was conducted at different stages of postnatal sexual development in rams born to T or dihydrotestosterone (DHT) treated dams during pregnancy. To further separate effects due to aromatization of T to estradiol, we used DHT as a source of androgen excess in the pregnant dams.

## Materials and Methods

### General management, breeding and prenatal T or DHT exposure

The study was initiated in late March and early April, 2009 during the natural breeding season at the Chillán Campus of the University of Concepción, Chile (36° 36' south latitude, 71° 30' west longitude, 144 m above sea level). The estrous cycles of a group of Suffolk Down females were synchronized by administering intravaginal progestagen pessaries for 7 days (Eazy Breed, Pharmacia and Upjohn, Auckland, New Zealand), immediately followed by intramuscular injection of 0.125 mg/ewe prostaglandin F<sub>2α</sub> (Genestren, Drug Pharma, Chile). The day of mating was recorded and used to determine timing of treatments. Once pregnancy was confirmed by ultrasound, dams were allocated randomly to one of the 3 treatments. One group of dams received twice weekly intramuscular injections of 30 mg of T propionate and another group received 30 mg dihydrotestosterone propionate (T; DHT; Steraloids, USA) dissolved in 1 ml cottonseed oil, between days 30 and 90 of pregnancy. This daily dose was increased to 40 mg T or DHT from day 90–120 of pregnancy. Another group served as control and received oil vehicle twice weekly from day 30–120 of pregnancy. The regimen of T administration has been used in previous studies [15]. This regimen of T or DHT administration to dams was chosen to reflect the pattern of plasma androgens concentrations observed in pregnant polycystic ovary syndrome (PCOS) women in whom increasing levels of androgens were determined during the last part of pregnancy [20].

Dams were fed with pasture and hay, and were supplemented with pelleted concentrated food according to feeding protocols for pregnant sheep. Lambs were all born by normal delivery, after full length gestation (mean of 147 days) during mid September (beginning of spring in the southern hemisphere),

and were studied at 5, 10, and 20 weeks of age, during October, November and January. Lambs were weaned at 8 weeks of age. They were maintained under natural photoperiod and given free access to water and pasture, and supplemented twice a day with hay and commercial pelleted food for ruminants as detailed elsewhere [11]. Only males born from singleton pregnancies were chosen for this study. All management procedures and methodologies were approved by the Ethical Committee in Animal Research of the Faculty of Veterinary Sciences of the University of Concepción.

### Blood collection and processing

To assess LH pulsatile characteristics, control males (C-males, n=6), males born to T treated dams (T-males, n=6), and males born to DHT treated dams (DHT-males, n=6) were subjected to serial blood sampling. In brief, sheep were fitted with jugular vein catheters (18 gauge, Arrow International, Reading PA, USA) in both veins under local anesthesia 1–2 days before the study, as described elsewhere [21]. Males were afterward placed in individual crates and subjected to intermittent blood sampling to acclimatize them to handling and blood sampling. On the days of the study, blood samples were collected beginning at 08:00 h and then every 10 min for 6 h. Blood (1 ml) was received in tubes containing 10 µl of heparin (10 U/µl), centrifuged at 1000g for 4 min at 4 °C and plasma was withdrawn. Plasma samples were stored at –20 °C until measurement of LH concentrations by RIA. Time 0 blood sample was used to measure plasma T concentrations. During the course of the study 2 DHT-males died of respiratory problems, leaving only 4 males for the study at 20 weeks of age. Due to the study protocol, no replacements for these DHT-males were used.

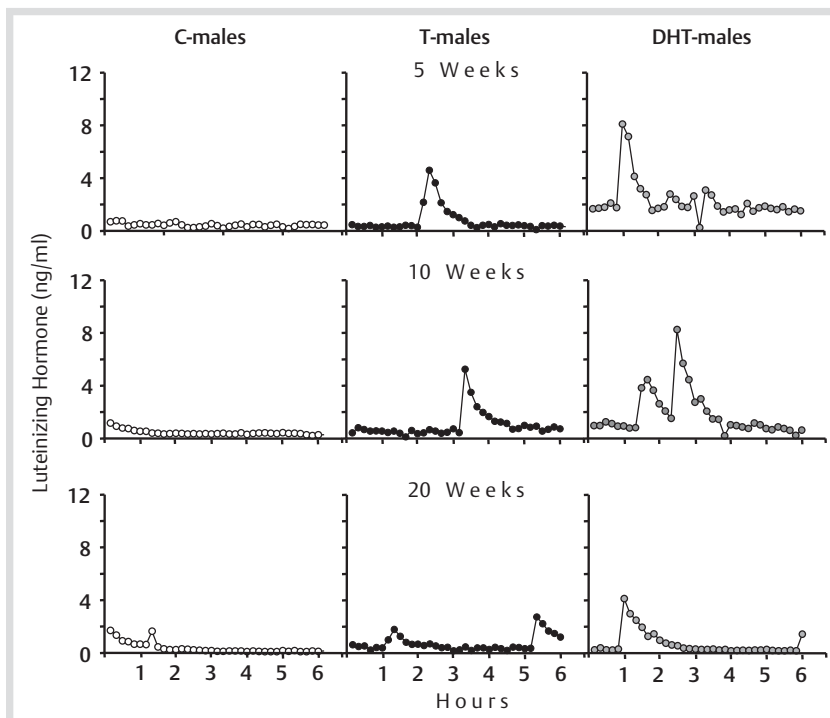
### Hormone measurements

Plasma LH concentrations were determined by RIA using ovine radio-iodinated LH (LER 1374-A, provided by Dr. Leo E. Reichert Jr.), ovine antiserum CSU-204 (provided by Dr. Gordon Niswender), and ovine LH standard oLH-S25 (provided by NIADDK, USA) in 200 µl duplicates, following procedures described elsewhere [21]. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 5 and 12%, respectively. The minimal detectable LH dose, defined as 90% of buffer control, was 0.1 ng/ml. Testosterone was measured by double-antibody RIA [15] using a commercial kit (DSL, Webster, TX, USA). The minimal detectable limit of the T assay was 0.07 ng/ml. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 5% and 9%, respectively.

### LH pulse analysis and statistical evaluation

For LH pulse analysis, the computerized version of the cluster pulse algorithm was used [22]. A cluster configuration of 1×2 (1 sample for the test peak and 2 for the test nadir), and a t-value of 2.14/2.14 to reduce the possibilities of false positive pulse determinations to less than 5%, were selected. The following mean properties of LH pulsatile concentrations were analyzed: mean LH (ng/ml/6h, the mean of 37 samples collected during the 6-h period), pulse frequency (number of significant peaks/6h), pulse amplitude (ng/ml), and nadir (ng/ml). The values of these LH pulsatile properties in the 3 groups were compared at 5, 10, and 20 weeks by two-way ANOVA with Bonferroni as post hoc test. Testosterone basal levels were compared by one-way ANOVA. For statistics, GraphPad Prisma program version 4.0 was used. Significance was defined as p≤0.05. Results are presented as mean±SEM.





**Fig. 1** Representative plasma LH (ng/ml) pattern of secretion during 6h of periodic sampling every 10 min at 5, 10, and 20 weeks of age in C-males (open circles, no prenatal androgen treatment), T-males (black filled circles, testosterone administration to mother between days 30 and 120 of pregnancy), and DHT-males (gray filled circles, dihydrotestosterone administration to mother between days 30 and 120 of pregnancy).

**Table 1** Mean  $\pm$  SEM testosterone basal levels (ng/ml) in male lambs treated prenatally with T (T-males), DHT (DHT-males), or vehicle (C-males) at different postnatal ages.

	C-Males	T-Males	DHT-Males
5 Weeks of age	0.14 $\pm$ 0.005 (n=2)	0.25 $\pm$ 0.104 (n=4)	1.19 $\pm$ 0.6 (n=3)
10 Weeks of age	nd	0.86 $\pm$ 0.67 (n=2)	1.87 $\pm$ 0.64 (n=2)
20 Weeks of age	nd	0.8 $\pm$ 0.6 (n=4)	1.45 $\pm$ 0.54 (n=3)

Total number of animals in each group: C-males, n=6; T-males, n=6; DHT-males, n=6; except at 20 weeks at which, n=4. Number of animals in parentheses indicates those with detectable T levels. nd: not determined

## Results

Fig. 1 shows representative LH patterns in a male from each treatment group. At all ages studied, LH plasma levels remained under 1 ng/ml in C-males, while T-males and DHT-males showed sporadic bursts of LH levels along the 6h study. Table 1 indicates mean basal T levels in each group at different ages. At 5, 10, and 20 weeks of age, mean T levels were not different between treatments. Most of the animals showed T levels under the detection limit of the assay (0.07 ng/ml).

LH pulse characteristics in the 3 groups of male sheep at 5, 10, and 20 weeks of age are shown in Fig. 2. Prenatal treatment either with T or DHT caused an increase in mean LH during the 6h period (treatment,  $F_{2,42}=10.39$ ,  $p<0.001$ ). Moreover, mean LH was significantly higher in DHT-males compared with C-males at 10 weeks of age (Bonferroni post hoc test  $p<0.05$ ). The LH pulse amplitude was strongly influenced by fetal steroid treatment (treatment,  $F_{2,42}=8.155$ ,  $p<0.001$ ), in which DHT-males and T-males showed higher pulse amplitudes than C-males. DHT-males showed higher pulse amplitudes than C-males at 5 and 10 weeks of age (Bonferroni post hoc test,  $p<0.05$ ). The LH pulse nadir also happened to be influenced by

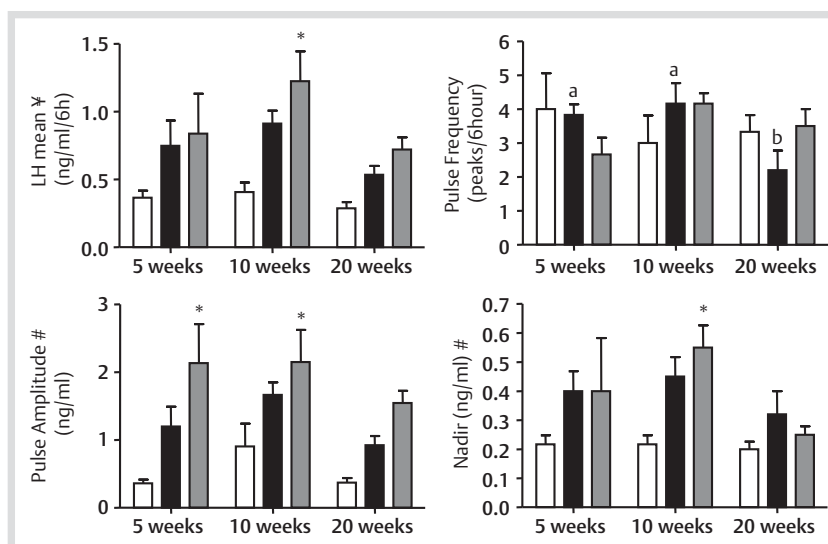
the prenatal treatment. This parameter was higher in T-males and DHT-males compared with C-males (treatment,  $F_{2,42}=4.929$ ,  $p<0.05$ ). DHT-males showed the highest mean levels of LH nadir at 10 weeks of age, and these levels were significantly higher than those showed by C-males at the same age (Bonferroni post hoc test,  $p<0.05$ ). The LH pulse frequency was neither affected by the treatment nor by the weeks of age. Despite that no statistical significance was detected in this parameter, post hoc test revealed that T-males decreased their pulse frequency at 20 weeks of age ( $p<0.05$ ).

## Discussion

The present study shows that rams prenatally exposed to T or DHT showed increased mean LH, increased LH pulse amplitude, and increased nadir of the LH pulse in comparison to nonexposed rams, under similar basal testosterone levels. The hypersecretion of LH is a common feature seen in female sheep prenatally exposed to androgens [23]. The probable explanations for these altered LH pulse characteristics and their consequences are discussed.

Several studies in sheep and other species have shown a close relationship between GnRH pulses in the portal vasculature and LH concentrations in the peripheral circulation [24–26], therefore, LH pulse characteristics may reflect the GnRH secretory pattern and the influences exerted upon LH secretion. In the present study, prenatal androgenization caused an increased LH secretory pattern, observed as increased mean, amplitude and nadir of the pulses, but not frequency of LH pulses. The first possibility that emerges to explain such differences is that testosterone basal levels were different between the groups of rams studied, so that the negative feedback exerted by T would be less in the T- and DHT-males. However this may not be the case, because animals belonging to either group showed low and in most of the cases undetectable T levels at the ages studied.





**Fig. 2** Mean  $\pm$  SEM of LH **a**, pulse frequency **b**, pulse amplitude **c** and nadir of the pulse **d** in control (open bars,  $n=6$ ), T-males (black bars,  $n=6$ ), and DHT-males (grey bars,  $n=6$ , and  $n=4$  at 20 weeks of age).  $\bar{y}$  A significant effect of weeks of age and prenatal androgen treatment (two-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). # Significant effect of prenatal androgen treatment (two-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). \* Different from C-males at the same age (Bonferroni post hoc test,  $p \leq 0.05$ ). **a**, **b** Values are significantly different between weeks of age. Parameters, after LH pulse analysis, with the computerized version of the cluster pulse algorithm.

One possibility to explore is that prenatal androgenization may have altered the secretory pattern of the GnRH neurons. In normal sheep gestation, exposure of male fetuses to T from gonadal origin conditions or programs the secretory pattern of GnRH, depriving the male of a steroid-induced LH surge, as observed in females [27]. This defeminization of the LH pulse is an estrogenic effect, while the masculinization of the tonic mode of GnRH secretion is an androgenic effect [28]. The lack of LH surge may be a consequence of alterations in the development of key steroid-receptive neuronal inputs to the GnRH neurons, for a reduced number of estrogen-responsive neurons in the ventromedial and arcuate nucleus of the hypothalamus has been observed in males and testosterone-exposed ewes [29]. The synaptic input to GnRH neurons is also under the organizational effect of androgens, since androgenized female lambs show afferents similar to males [30–32], as observed with glutamatergic neurons that input GnRH neurons [33]. Other evidences of the reorganizing effect of androgens on the brain are clear to show that sexually dimorphic areas are the consequence of androgenic actions. Roselli et al. [34] have shown that the ovine sexual dimorphic nucleus (oSDN) in the hypothalamus of sheep is greater in males than in females and is organized by prenatal testosterone. Experimental excess of prenatal T makes the oSDN in females of similar size to that in males, and this effect is not due to the aromatization of T [35]. The ARC/VMH region is important in that it contains GnRH neurons and also a subset of neurons expressing kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin mediators of the gonadal steroid effects upon GnRH [36]. This cell population is reduced in females prenatally exposed to T, resembling the pattern exhibited by males which normally have a smaller population of these cells [36]. Interestingly, the kisspeptin population of neurons in the ARC/VMH is not affected by prenatal androgenization, remaining high both in control and prenatally androgenized female sheep. Kisspeptin has been reportedly a key element in the secretion of GnRH, since it stimulates GnRH secretion [37] and LH secretion [38]. It is necessary to add new studies concerning the effects of prenatal androgenization on the kisspeptin neuronal population in male sheep, since most of the former studies have been done in prenatally exposed female sheep. In essence, current information is more concerned with females that were prenatally androgenized and that show characteristics similar to males. But information deal-

ing with how males prenatally exposed to excess of androgens respond in their reproductive parameters is still scarce. We suggest that the one probable mechanism that explains the altered LH secretion in these animals may involve increased stimulatory inputs to the GnRH neurons, with a higher amount of GnRH released per pulse, but the phenotype of these neuronal inputs is unknown for us so far.

Another possibility to explain LH secretory characteristics in these animals is based upon the pituitary. The possibility that prenatal androgens may reprogram the pituitary axis has been addressed by Sarma et al. [39] in ewes. These researchers demonstrated in females that the fetal treatment with T during a fixed time of the gestational period reduces postnatal LH responsiveness to  $E_2$  negative feedback, thus contributing at least in part to the development of postnatal hypergonadotropism. The main aftermath of this excess in LH secretion is an abnormal reproductive cycle that leads to infertility, therefore, the main effects of hypersecretion are being observed in adult subjects. In the present study, male sheep prenatally exposed to T or DHT exhibit transient postnatal increases in secretion of LH compared with control males, suggesting some commonality in programming mechanisms between ewes and rams. What has been proposed to partially explain the hypersecretion of LH observed after this type of protocol of prenatal androgenization is an increased pituitary responsiveness to GnRH in females, by means of developmental changes in expression of key receptors in the pituitary during prenatal development [23], which may lead to a bigger pool of releasable LH in response to GnRH pulsatility [25]. Studies involving the LH profile in male sheep under this testosterone treatment are still scarce, but we cannot rule out this hypothesis for males as well, since the amplitude of the LH secretion transiently but significantly increased postnatally with fetal androgenization. However, it is necessary to be careful since it has already been discussed that a sexual differentiation in the response to androgens in utero exists between male and female sheep. So the mechanism that explains male LH hypersecretion may be different from those proposed for androgenized females.

The effects observed in the present study may be of androgenic origin, and not of estrogenic origin, based on the similar characteristics of LH secretion observed for T- and DHT-males. In the present study, 2 androgens were studied: one that normally



would be aromatized to estrogens in the brain, under the action of the aromatase enzyme, and another that traditionally has been catalogued as a nonaromatizable androgen [40]. However, evidence exists that DHT can actually be converted to  $3\beta$ diol, which may in turn act through the estradiol receptor  $\beta$  or ER2 [40]. So it is plausible that some effects catalogued as of androgenic origin, may have an estrogenic origin. Moreover, the presence of ER $\beta$  (ER2) in fetal male sheep has been described [41], which could have a role in masculinization/defeminization of the brain [42]. However, in this precise type of study, evidence exists that the estradiol receptor mostly involved in gonadotropin secretion is ER $\alpha$  (ER1) and that under prenatal androgenization, most differences in the expression of this receptor are being observed postnatally [42]. In essence, caution must be taken in the interpretation of the mechanisms involved, since evidence exists for a differential effect upon testicular parameters when males were exposed to T or DHT during gestation [43].

Although we do not have available fetal levels of T achieved with our regimen of T or DHT given to the dams, used in the present study, we believe that these rams exposed to androgens were actually under elevated levels of androgens during gestation for various reasons: 1) It has recently been demonstrated that in dams receiving 100 mg T from day 30–90 of gestation, their male fetuses show about 10 times higher T plasma levels in the umbilical cord than control males at day 90 of gestation [16]. 2) Maternal plasma levels of T in dams receiving T during pregnancy are significantly higher than in control dams [16]. Taking into account that dose of T administered to our dams was one third of that given by Veiga-Lopez et al., we would expect that T levels in the current study to be approximately one-third of that obtained with the 100 mg dose, levels which still are above T levels in control fetus. 3) We have shown that rams that were born to dams receiving T manifest several disturbances in their sperm count and motility [15] and an increased number of Sertoli cell in the testis, but a decreased number of germinal cells [17]. Although T is essential for the normal programming of several reproductive characteristics in rams, for example the normal rise in neuroendocrine puberty, as evidenced by treatments with anti androgens as flutamide [14], an excess of T or DHT during specific gestational windows may be of deleterious effect in male sheep.

The context of the present results must be suited to the probable consequences on testicular function, an area that has been poorly studied since the focus has been mainly located on the consequences of prenatal androgenization in females. In essence, we found that rams prenatally exposed to androgens show impairments in the production of sperm and an altered number of Sertoli cells [15,17] which may start with disturbances such as altered LH pulsatile secretion. Interestingly, the findings in adult rams occurred when similar basal LH levels and similar GnRH-stimulated T levels were observed. In the present study, increased pulsatile LH due to increased amplitude of the LH pulse may have deleterious effects upon testicular function or the testis may still be refractory to the effects of increased LH. Further studies are needed to address these hypotheses.

In summary, prenatal exposure to an excess of testosterone in males altered the pattern of LH release, which suggests changes in the response to GnRH release from the hypothalamus, or in the pattern of GnRH release from the hypothalamus. Further experiments are needed to determine which of either mechanism applies.

## Acknowledgements



The authors thank Dr. David Abbott for his valuable comments; Dr. Leo E. Reichert Jr. for providing purified ovine LH for radioiodination, Dr. Gordon Niswender for providing ovine antiserum CSU-204, and NIADDK, USA for providing ovine LH standard oLH-S25. This work was supported by Fondecyt Grants 1090031 and 1050915.

## References

- Brown BW, Mattner PE, Carroll PA, Holland EJ, Paull DR, Hoskinson RM, Rigby RD. Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on reproductive function and hormones in rams. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 15–21
- Kiyama Z, Adams TE, Hess BW, Riley ML, Murdoch WJ, Moss GE. Gonadal function, sexual behavior, feedlot performance, and carcass traits of ram lambs actively immunized against GnRH. *J Anim Sci* 2000; 78: 2237–2243
- Brown BW, Mattner PE, Carroll PA, Hoskinson RM, Rigby RD. Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on reproductive function and hormones in ewes. *J Reprod Fertil* 1995; 103: 131–135
- Goy RW, Resko JA. Gonadal hormones and behavior of normal and pseudohermaphroditic nonhuman female primates. *Recent Prog Horm Res* 1972; 28: 707–733
- Jackson LM, Timmer KM, Foster DL. Sexual Differentiation of the External Genitalia and the Timing of Puberty in the Presence of an Antianrogen in Sheep. *Endocrinology* 2008; 149: 4200–4208
- Recabarren SE, Rojas-García PP, Recabarren MP, Norambuena K, Sir-Petermann T. Impacto de la exposición prenatal a testosterona sobre parámetros biométricos y endocrinos en ovinos recién nacidos. *Arch med vet* 2009; 41: 43–51
- Roselli CE, Estill CT, Stadelman HL, Meaker M, Stormshak F. Separate critical periods exist for testosterone-induced differentiation of the brain and genitals in sheep. *Endocrinology* 2011; 152: 2409–2415
- Chan-Cua S, Freidenberg G, Jones KL. Occurrence of male phenotype in genotypic females with congenital virilizing adrenal hyperplasia. *Am J Med Genet* 1989; 34: 406–412
- New MI. An update on congenital adrenal hyperplasia. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1038: 14–43
- Witchell SF, Azziz R. Congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2011; 24: 116–126
- Recabarren SE, Padmanabhan V, Codner E, Lobos A, Durán C, Vidal M, Foster DL, Sir-Petermann T. Postnatal consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated prenatally with testosterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: 801–806
- Padmanabhan V, Manikkam M, Recabarren S, Foster D. Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic dysfunction in the female. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 246: 165–174
- Hiort O, Holterhus PM. The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 101–110
- Jackson LM, Timmer KM, Foster DL. Sexual differentiation of the external genitalia and the timing of puberty in the presence of an antianrogen in sheep. *Endocrinology* 2008; 149: 4200–4208
- Recabarren SE, Rojas-García PP, Recabarren MP, Alfaro VH, Smith R, Padmanabhan V, Sir-Petermann T. Prenatal testosterone excess reduces sperm count and motility. *Endocrinology* 2008; 149: 6444–6448
- Veiga-Lopez A, Steckler TL, Abbott DH, Welch KB, MohanKumar PS, Phillips DJ, Refsal K, Padmanabhan V. Developmental programming: impact of excess prenatal testosterone on intrauterine fetal endocrine milieu and growth in sheep. *Biol Reprod* 2011; 84: 87–96
- Rojas-García PP, Recabarren MP, Sarabia L, Schön J, Gabler Ch, Einspanier R, Maliqueo M, Sir-Petermann T, Rey R, Recabarren SE. Prenatal testosterone excess alters Sertoli and germ cell number and testicular FSH receptor expression in rams. *Am J Physiology-Endocrinol Metab* 2010; 299: E998–E1005
- Wood RI, Foster DL. Sexual differentiation of reproductive neuroendocrine function in sheep. *Rev Reprod* 1998; 3: 130–140
- Foster DL, Jackson LM, Padmanabhan V. Programming of GnRH feedback controls timing puberty and adult reproductive activity. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254–255: 109–119
- Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Perez-Bravo F, Recabarren SE. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum Reprod* 2002; 17: 2573–2579



- 21 Recabarren SE, Jofré A, Lobos A, Orellana P, Parilo J. Effect of arginine and ornithine infusions on luteinizing hormone secretion in prepubertal ewes. *J Anim Sci* 1996; 74: 162–166
- 22 Veldhuis JD, Johnson ML. Cluster analysis: a simple, versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am J Physiol* 1986; 250: E486–E493
- 23 Manikkam M, Thompson RC, Herkimer C, Welch KB, Flak J, Karsch FJ, Padmanabhan V. Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess on pre- and postnatal gonadotropin regulation in sheep. *Biol Reprod* 2008; 78: 648–660
- 24 Levine JE, Pau KY, Ramirez VD, Jackson GL. Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in unanesthetized, ovariectomized sheep. *Endocrinology* 1982; 111: 1449–1455
- 25 Clarke IJ, Cummins JT. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 1982; 111: 1737–1739
- 26 Barrell GK, Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ. Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biol Reprod* 1992; 46: 1130–1135
- 27 Robinson JE, Birch RA, Grindrod JA, Taylor JA, Unsworth WP. Sexually differentiated regulation of GnRH release by gonadal steroid hormones in sheep. *Reprod Suppl* 2003; 61: 299–310
- 28 Wood RI, Foster DL. Sexual differentiation of reproductive neuroendocrine function in sheep. *Rev Reprod* 1998; 3: 130–140
- 29 Robinson JE, Grindrod J, Jeurissen S, Taylor JA, Unsworth WP. Prenatal exposure of the ovine fetus to androgens reduces the proportion of neurons in the ventromedial and arcuate nucleus that are activated by short-term exposure to estrogen. *Biol Reprod* 2010; 82: 163–170
- 30 Robinson JE, Birch RA, Taylor JA, Foster DL, Padmanabhan V. In utero programming of sexually differentiated gonadotrophin releasing hormone (GnRH) secretion. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23: 43–52
- 31 Kim SJ, Foster DL, Wood RI. Prenatal testosterone masculinizes synaptic input to Gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Biol Reprod* 1999; 61: 599–605
- 32 Robinson J. Prenatal programming of the female reproductive neuroendocrine system by androgens. *Reproduction* 2006; 132: 539–547
- 33 Jansen HT, Hershey J, Mytinger A, Foster DL, Padmanabhan V. Developmental programming: reproductive endocrinopathies in the adult female sheep after prenatal testosterone treatment are reflected in altered ontogeny of GnRH afferents. *Endocrinology* 2011; 152: 4288–4297
- 34 Roselli CE, Stadelman H, Reeve R, Bishop CV, Stormshak F. The ovine sexually dimorphic nucleus of the medial preoptic area is organized prenatally by testosterone. *Endocrinology* 2007; 148: 4450–4457
- 35 Roselli CE, Stormshak F. The ovine sexually dimorphic nucleus, aromatase, and sexual partner preferences in sheep. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 118: 252–256
- 36 Cheng G, Coolen LM, Padmanabhan V, Goodman RL, Lehman MN. The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. *Endocrinology* 2010; 151: 301–311
- 37 Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 1761–1766
- 38 Caraty A, Franceschini I, Hoffman GE. Kisspeptin and the preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe: basic aspects and potential applications in the control of ovulation. *J Neuroendocrinol* 2010; 22: 710–715
- 39 Sarma HN, Manikkam M, Herkimer C, Dell'Orco J, Welch KB, Foster DL, Padmanabhan V. Fetal Programming: Excess Prenatal Testosterone Reduces Postnatal Luteinizing Hormone, But Not Follicle-Stimulating Hormone Responsiveness to Estradiol Negative Feedback in the Female. *Endocrinology* 2005; 146: 4281–4291
- 40 Handa RJ, Pak TR, Kudwa AE, Lund TD, Hinds L. An alternate pathway for androgen regulation of brain function: Activation of estrogen receptor beta by the metabolite of dihydrotestosterone, 5 $\alpha$ -androstane 3 $\beta$ ,17 $\beta$  diol. *Horm Behav* 2008; 53: 741–752
- 41 Alexander BM, Singh P, Austin KJ, Rebecca R, Cockrum RR, Cammack KM, Hess BW, Moss GE, Nathanielsz PW, Ford SP. Effect of maternal fatness on fetal steroids and Semi-quantitative Real-Time PCR expression of receptor genes in sheep. *Anim Reprod Sci* 2009; 116: 58–64
- 42 Gorton LM, Mahoney MM, Magorien JE, Lee TM, Wood RI. Estrogen Receptor Immunoreactivity in Late-Gestation Fetal Lambs. *Biol Reprod* 2009; 80: 1152–1159
- 43 Bormann CL, Smith GD, Padmanabhan V, Lee TM. Prenatal testosterone and dihydrotestosterone exposure disrupts ovine testicular development. *Reproduction* 2011; 142: 167–173



---

## **TRABAJO DE INVESTIGACIÓN 2**

### **ALTERED TESTICULAR DEVELOPMENT AS A CONSEQUENCE OF INCREASE NUMBER OF SERTOLI CELL IN MALE LAMBS EXPOSED PRENATALLY TO EXCESS TESTOSTERONE**

Pedro P. Rojas-García, Mónica P. Recabarren, Teresa Sir-Petermann, Rodolfo Rey, Sergio Palma, Albert Carrasco, Carlos C. Pérez-Marín, Vasantha Padmanabhan, Sergio E. Recabarren

Endocrine (2013) 43:705–713



## Altered testicular development as a consequence of increase number of sertoli cell in male lambs exposed prenatally to excess testosterone

Pedro P. Rojas-García · Mónica P. Recabarren · Teresa Sir-Petermann · Rodolfo Rey · Sergio Palma · Albert Carrasco · Carlos C. Perez-Marin · Vasantha Padmanabhan · Sergio E. Recabarren

Received: 30 March 2012 / Accepted: 9 October 2012 / Published online: 18 October 2012  
© Springer Science+Business Media New York 2012

**Abstract** The reprogramming effects of prenatal testosterone (T) treatment on postnatal reproductive parameters have been studied extensively in females of several species but similar studies in males are limited. We recently found that prenatal T treatment increases Sertoli cell number and reduced spermatogenesis in adult rams. If such disruptions are manifested early in life and involve changes in testicular paracrine environment remain to be explored. This study addresses the impact of prenatal T excess on testicular parameters in infant males, including Sertoli cell number and expression of critical genes [FSH receptor

(FSHR), androgen receptor (AR), transforming growth factor beta 1 (TGFB1), 3 (TGFB3), transforming growth factor beta type 1 receptor, (TGFB1), and anti-Müllerian hormone (AMH)] modulating testicular function. At 4 week of age, male lambs born to dams treated with 30 mg of T propionate twice weekly from day 30 to 90, followed by 40 mg of T propionate from day 90 to 120 of pregnancy (T-males), had a higher number of Sertoli cells/testis ( $P = 0.035$ ) than control males (C-males) born to dams treated with the vehicle. While no differences were observed in the expression of FSHR and TGFB3, testicular TGFB1 expression was found to be lower in T-males ( $P = 0.03$ ) compared to C-males. Expression level of AMH, TGFB1, and AR also tended to be lower in T-males. These findings provide evidence that impact of fetal exposure to T excess is evident early in postnatal life, mainly characterized by an increase in Sertoli cell number. This could explain the testicular dysfunction observed in adult rams.

P. P. Rojas-García (✉) · M. P. Recabarren · S. Palma · A. Carrasco · S. E. Recabarren  
Laboratory of Animal Physiology and Endocrinology, Faculty of Veterinary Sciences, University of Concepción, Av. Vicente Mendez 595, Chillán, Chile  
e-mail: pedro.rojas@udec.cl

T. Sir-Petermann  
Laboratory of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Western Faculty of Medicine, University of Chile, Las Palmeras 299, Interior Quinta Normal, Casilla, 33052 Correo 33, Santiago, Chile

R. Rey  
Center for Research in Endocrinology Children's Hospital "R. Gutiérrez" C1425EFD Buenos Aires, Argentina, and Department of Histology, Cell Biology, Embryology, University of Buenos Aires, C1121ABG Buenos Aires, Argentina

C. C. Perez-Marin  
Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain

V. Padmanabhan  
Departments of Pediatrics and the Reproductive Sciences Program, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

**Keywords** Developmental programming · Ovine · Male reproduction · Testes

### Introduction

In contrast to the clear establishment of reproductive compromise in female sheep by prenatal exposure to excess testosterone (T), little attention has been given to consequences in the male. We have found that rams exposed during their fetal life to excess testosterone are characterized by higher number of Sertoli cells in the seminiferous tubules but reduced number of germ cells, resulting in low sperm count and motility [1, 2]. These males also showed higher testicular expression of the follicle-stimulating hormone



receptor (FSHR) and increased responsiveness of FSH to a GnRH analog [2]. However, it not known when, in the development trajectory of the testis, this alteration is initially observed. One possibility could be that number of Sertoli cells are elevated since the early postnatal life. In humans, concentrations of serum anti-Müllerian hormone (AMH), are elevated in infant boys born to mothers with the polycystic ovary syndrome (PCOS) a condition endocrinologically characterized by increased levels of androgens during pregnancy [3], and remained elevated until puberty. Because Sertoli cells are the source of AMH in the testis [4, 5], these findings suggest that the increased AMH levels in these boys may be the result of an increased number of Sertoli cells [6]. However, it is unclear if these testicular and endocrine disruptions observed in sons born to mothers with PCOS, are evidenced also early in life in infant rams. The ovine mother administered with testosterone during pregnancy has been used and validated as an animal model of PCOS [7–10].

In addition to FSHR and the androgen receptor (AR), the transforming growth factor beta (TGFB) superfamily members namely transforming growth factor beta 1, 3 (TGFB1 and 3) and AMH, which are expressed in the testes, play a role in modulating testicular function and spermatogenesis [11–14]. AMH is a recognized marker of the Sertoli cell function [4, 5, 15], while TGFB1 and TGFB3 have been implicated in the regulation of tight junction in Sertoli cells, and consequently, in spermatogenesis. They appear to modify the blood testicular barrier (BTB) by diminishing the expression of tight-junction proteins [16–18]. Nevertheless, TGFBs although ubiquitously expressed in several tissues, may be accomplishing important tasks in the developing testis since they are highly expressed in immature testis, and its expression decreases during puberty when spermatogenesis begins. Similar pattern of expression applies to the TGFB receptor type 1 (TGFB1) [19]. Previously, we found expression of TGFB1 to be increased in adult rams born to mothers exposed to excess testosterone (T). Because these studies were conducted with adult male sheep, the developmental onset and progression of this disruption are not known. Therefore, the present study tested the hypothesis that fetal exposure to excess testosterone causes an early disruption in testicular cell population and in locally expressed mediators of testicular function.

## Materials and methods

### Prenatal testosterone (T) treatment

Twelve Suffolk-Down lambs of 4 weeks of age were included in this study. Six lambs were born to mothers that received twice weekly intramuscular injections of 30 mg of

testosterone propionate (TP; Sigma, St Louis, USA) in cottonseed oil from days 30 and 90 of pregnancy, and 40 mg from days 90 to 120 of pregnancy, using a previously validated experimental protocol [1, 2]. These animals will be referred to from now on as T-males. Six lambs were born to mothers that received only the vehicle twice weekly from day 30 to 120 of gestation (C-males). Mothers were maintained on pasture and supplemented with hay and concentrated pelleted food to meet the increased needs of the pregnant sheep. Pelleted food consisted of oat, corn, wheat, gluten feed, gluten meal, soybean, meal, fish meal, sunflower meal, and mineral salts and contained (based on dry matter) 18 % protein, 11 % crude fiber, 2 % fat, and 2450 kcal/kg (Glovigor; Compañía Molinera El Globo, Santiago, Chile) [20]. Newborn lambs were weighed at birth. Eight hours after delivery the umbilical cord was cleaned and disinfected with 10 v/v of povidone-iodine [20]. Lambs were maintained with their mothers under natural photoperiod and with free access to water. Only males born from singleton pregnancies were used in this study. All lambs were born by normal delivery and after full length gestation, during mid-September (beginning of Spring in the Southern hemisphere). All procedures for management and experimental methodologies were approved by the Ethical Committee in Animal Research of the Faculty of Veterinary Sciences of the University of Concepción, and were performed according to the APS Guiding Principles of Care and Use of Animals (2002).

### Basal plasma FSH, LH, and T determinations

Blood samples (3-ml) were obtained from the jugular vein of each male to determine plasma concentrations of FSH, LH, and T, just prior to surgery. Blood samples were centrifuged at 1,000 g for 15 min, and plasma separated and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until hormone measurements. Plasma levels of FSH were determined by RIA using ovine radioiodinated FSH (oFSH I-1 AFP 5679 C), ovine antiserum AFP C 5228113, and ovine FSH standard oFSHRP [provided by National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive, and Kidney Diseases (NIADDK)], in 200- $\mu\text{l}$  duplicates. The minimal detectable FSH dose, defined as 90 % of buffer control, was 0.1 ng/ml. Intra- and interassay coefficients of variation were 5 and 8 %, respectively. LH was measured by RIA using radioiodinated ovine LH (LER 1374-A provided by Dr. Leo Reichert Jr.), ovine antiserum CSU-204 (provided by Dr Gordon Niswender), and ovine LH standard oLH-S25 (NIADDK, USA) in 200- $\mu\text{l}$  duplicates. The minimal detectable limit of LH assay was 0.1 ng/ml and the intra- and inter-assay coefficients of variation were 6 and 11 %, respectively. Circulating levels of T was measured by RIA using a commercial kit (DIA-source ImmunoAssays, Belgium). The minimal detectable

limit of the T assay was 0.07 ng/ml and the intra- and inter-assay coefficients of variation 5 and 9 %, respectively.

#### Tissue collection

At 4 weeks of age, testes were removed from each lamb for histology and isolation of total RNA. In brief, lambs were anesthetized with halothane and the testes were surgically removed, cleaned of surrounding tissues, and weighed. One testis was cut into  $\sim 0.5 \text{ cm}^3$  pieces with a sterile surgical blade and processed for histological analysis, and the other testis was immersed in liquid nitrogen and then stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  for subsequent RNA isolation.

#### Testicular histology and evaluation

For histology, tissue samples were immersed in Bouin's fixative solution for 24 h at room temperature and then rinsed, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections ( $3 \text{ }\mu\text{m}$ ) were stained with hematoxylin-eosin and analyzed under a light microscope using a  $10\times$  ocular lens and a  $40\times$  objective, with a digital camera (model DSC-P71; Sony). Images were processed and analyzed with the NIS-Elements BR 3.00 software. For the morphometric analysis, 10 sections,  $20 \text{ }\mu\text{m}$  apart, were analyzed per animal using a  $40\times$  objective. From each section, 3 randomly selected microscopic fields were selected resulting in a total of 30 visual fields per testis for analyses. In all samples, the fields analyzed include sections from the tunica albuginea to the mediastino. Histological analysis focused on the following parameters, as previously described [21].

#### Diameter of the seminiferous tubule

A minimum of 45 seminiferous tubules were evaluated per animal. Cross sections, where perpendicular diameters of seminiferous tubule did not differ by more than 10 % between major and minor diameters, were used for diameter assessment. Both diameters were then averaged, for statistical analysis.

#### Volume of testicular compartments

Tissue area occupied by tubular and interstitial tissue in each of the selected field was determined using a  $100\times$  objective. Area of each compartment was expressed as percentage of total tissue area (sum of the areas of both compartments was set as 100 %). This information was used to express the relative volume of each compartment in the whole testicle.

#### Length of seminiferous tubules

This parameter was calculated by dividing the total volume occupied by the tubular tissue in the testis by the average area of seminiferous tubules.

#### Number of Sertoli and germ cells

Sertoli cell nucleoli and germ cell nuclei were counted in each visual field with a  $100\times$  objective. The number obtained for Sertoli cells and for germ cells was introduced in the Floderus' formula [22]. This allowed determination of the number of cells per testicular volume. Finally, this value was multiplied by the total volume of the seminiferous tubules to obtain the number of Sertoli and germ cells present in the testis [21, 23]. The total seminiferous tubule volume was calculated by dividing the percentage of the tubular compartment (obtained as described above) by 100 and then multiplying this by the testicular volume (testicular weight dividing by 1.038, [24]).

#### Total RNA isolation and reversed transcription

Testicular tissue was homogenized using the Precellys 24 instrument (bertin Technology, France). For total RNA isolation, the Invisorb Spin Tissue RNA Mini Kit (Invitek, Berlin, Germany) was used as per manufacturer's instructions. Total RNA yield was quantified photometrically at 260 nm using the BioPhotometer (Eppendorf, Germany). The quality of the RNA was verified after electrophoresis on formaldehyde containing 1 % (w/v) agarose gel with ethidium bromide staining. To remove any DNA contamination, DNase digestion was performed before reverse transcription (RT). DNase treatment was carried out in a total volume of  $12 \text{ }\mu\text{l}$  containing  $3 \text{ }\mu\text{g}$  of total RNA, and 3 U of DNase (Invitrogen, Brazil). The reaction mixture was first incubated at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for 30 min, followed by addition of  $3 \text{ }\mu\text{l}$  of 25 mM of EDTA. The sample mixture was heated for an additional 5 min at  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  and placed immediately on ice for 5 min. Fifteen microliters premix containing 200 U reverse transcriptase enzyme (SuperScript, Invitrogen, Brazil),  $2.5 \text{ }\mu\text{M}$  of random hexameres (Invitrogen, Brazil),  $0.666 \text{ mM}$  of each dNTP (Promega, USA) and  $1\times$  of the supplied RT buffer were added to each RNA sample. Samples without reverse transcriptase enzyme were processed in parallel to monitor the absence of any genomic DNA. The reverse transcription was performed at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  for 10 min,  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 h, and then at  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  for 2 min. The cDNA obtained was aliquoted in  $15 \text{ }\mu\text{l}$  volumes and stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  until analysis by real time PCR.

## Real time PCR

In preliminary experiments, the expression of all relevant genes was examined by standard gradient PCR using a gradient thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) to confirm the expected amplicon sizes, as well as to determine the optimal annealing temperature for each pair of primers. The primer sequences, annealing temperature, length of PCR product used in the present study are indicated in Table 1.

Real time PCRs were performed in a Rotor-Gene RG-6000 thermocycler (Corbett Research, Mortlake, Australia). One microliter of cDNA (100 ng) was used as template for real time PCR reaction, which contained 0.2 µl of 50XSYBR Green, 5 µl of 2XSensiMix solution (Quantace Ltd, London, UK), and 0.4 µM of the primer in a final volume of 10 µl. The following real time PCR protocol was applied: a denaturation step at 95 °C for 10 min, a three-step amplification, including denaturation at 95 °C for 15 s, the corresponding annealing temperature specific for each factor (see below) for 20 s, and extension at 72 °C for 30 s, a melting curve program (50–99 °C) with continuous fluorescence measurement, and a final cooling step to 40 °C. Data acquisition was carried out at the end of each annealing and extension step. The number of cycles for all genes was 45. For mRNA quantification, a dilution series with known quantities of the specific PCR product was amplified along with the samples as a standard. Samples were measured in triplicate and standard curve in duplicate in each run. The PCR products applied as standards were generated by conventional block RT-PCR and purified using the E.Z.N.A Gel Purification Kit (Omega Bio-Tek, Inc., USA) as described by the manufacturer. Concentration of the purified PCR product was estimated in duplicate using the BioPhotometer. As

negative controls, reactions containing no template (sterile RNase-DNase free water) or reverse transcriptase were included to exclude any PCR products derived from contaminations or from genomic DNA. The content of each specific mRNA was normalized to a housekeeping gene. As part of validation, the suitability of 18S ribosomal subunit and B-actin for use as internal control for normalization was tested. Because expression of 18-S ribosomal subunit did not differ between C- and T-male, 18S ribosomal subunit was chosen for use as the internal control. The results of real time PCR are presented as a ratio between the specific mRNA gene and the 18-S ribosomal subunit.

## Statistical analysis

All data are expressed as mean ± SE or median, as indicated in the text or figures. Changes in morphometric parameters were compared between C and T-males by Students *t* test or the non-parametric Mann–Whitney test, as appropriate. The mRNA expression data were analyzed using Mann–Whitney non-parametric test. Based on previous findings [2], a one-tailed option for P value was used to analyze the number of Sertoli and germ cells, and the expression of FSHR. All analyses were performed using the GraphPad Prism 4.0 software. A *P* value of ≤0.05 was considered to be significant.

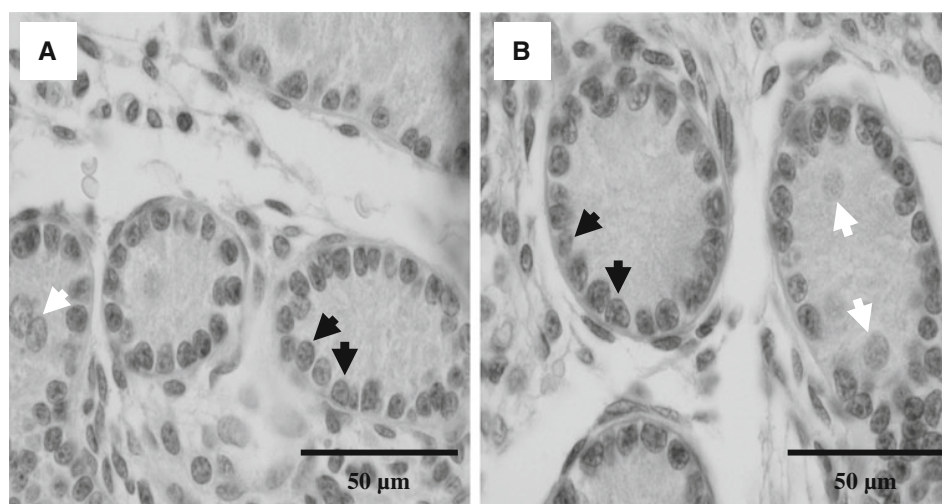
## Results

### Body and testicular weight

Body weight was similar between T-males and C-males at the time of birth ( $5.1 \pm 0.41$  vs.  $4.6 \pm 0.25$  kg, for T- and

**Table 1** Detailed sequence for primer used in real time PCR

Gene	Primers	Annealing (°C)	PCR product length (bp)	Reference
18S rRNA	F: 5'-TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG-3' R: 5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3'	60	493	Ambion, Wiesbaden
FSHR	F: 5'-GAG AGC AAG GTG ACA GAG ATT CC-3' R: 5'-CCT TTT GGA GAG ACT GAA TCT T-3'	54	340	[2]
AR	F: 5'-GAG GAG CCA GCC CAG AAG-3' R: 5'-AAG GAG TCA GGT TGG TTG TTG-3'	60	134	Genbank accession No. AF105713
AMH	F: 5'-CTA TGA GCA GGC CTT CCT GG-3' R: 5'-CCT CCA GGT GCA GGA CCA CC-3'	63	176	[25]
TGFB1	F: 5'-CAT GAA CCC AAG GGG TAC C-3' R: 5'-GCA CGA TCA TGT TGG ACA AC-3'	59	220	Genbank accession No. M36271
TGFB3	F: 5'-AGA ACT GCT GTG TGC GTC C-3' R: 5'-GCA GGA CTT CAC CAC CAT G-3'	63	290	[2]
TGFBR1	F: 5'-ATA ACC GCA CTG TCA TTC ACC-3' R: 5'-TGA CAC CAA CCA GAG CTG AG-3'	63	395	[2]



**Fig. 1** Histology of testes from C-male **a** and T-male **b** lambs at 4 weeks of age. Arrows indicate Sertoli cells (dark) and gonocyte (white) in the seminiferous tubules. The bar corresponds to 50  $\mu$ m

C-males, respectively). At 4 weeks of age, body weight was  $11.85 \pm 0.86$  kg in T-males and  $9.5 \pm 0.69$  kg in C-males. Testicular weight was also similar between T-males ( $2.03 \pm 0.26$  g) and C-males ( $1.55 \pm 0.11$  g) at 4 weeks of age.

#### Circulating concentrations of FSH, LH, and T

Plasma FSH levels were similar between C- and T-males. Mean plasma levels were  $1.73 \pm 1.01$  ng/ml in C-males and  $1.42 \pm 0.82$  ng/ml in T-males. Plasma LH levels were similar between the two groups. Mean plasma LH levels were  $0.46 \pm 0.05$  ng/ml in T-males and  $1.04 \pm 0.35$  ng/ml in C-males. Plasma T concentrations were below the detection limit of the assay in 2 of 6 C-males and in 4 of 6 T-males. The mean T concentrations in those with detectable T levels were in the low prepubertal range for both groups ( $0.115 \pm 0.015$  ng/mL in C-males and  $0.25 \pm 0.10$  ng/ml in T-males).

#### Histological findings

Seminiferous tubules without lumen were observed in C-males and T-males (Fig. 1). Sertoli cells were located close to the basal membrane with oval or rounded shapes and had one or two nucleoli. Germ cells were large, with a clear cytoplasm and a large nucleus with one nucleolus, and were mainly located toward the center of the seminiferous tubules. The Sertoli cell number/testis was higher in T-males compared with C-males (Fig. 2,  $P = 0.035$ ). No significant differences were observed between T-males and C-males in seminiferous tubule volume, diameter, and length, number of germ cells, germ cell/Sertoli cell ratio, and interstitial tissue volume (Fig. 2).

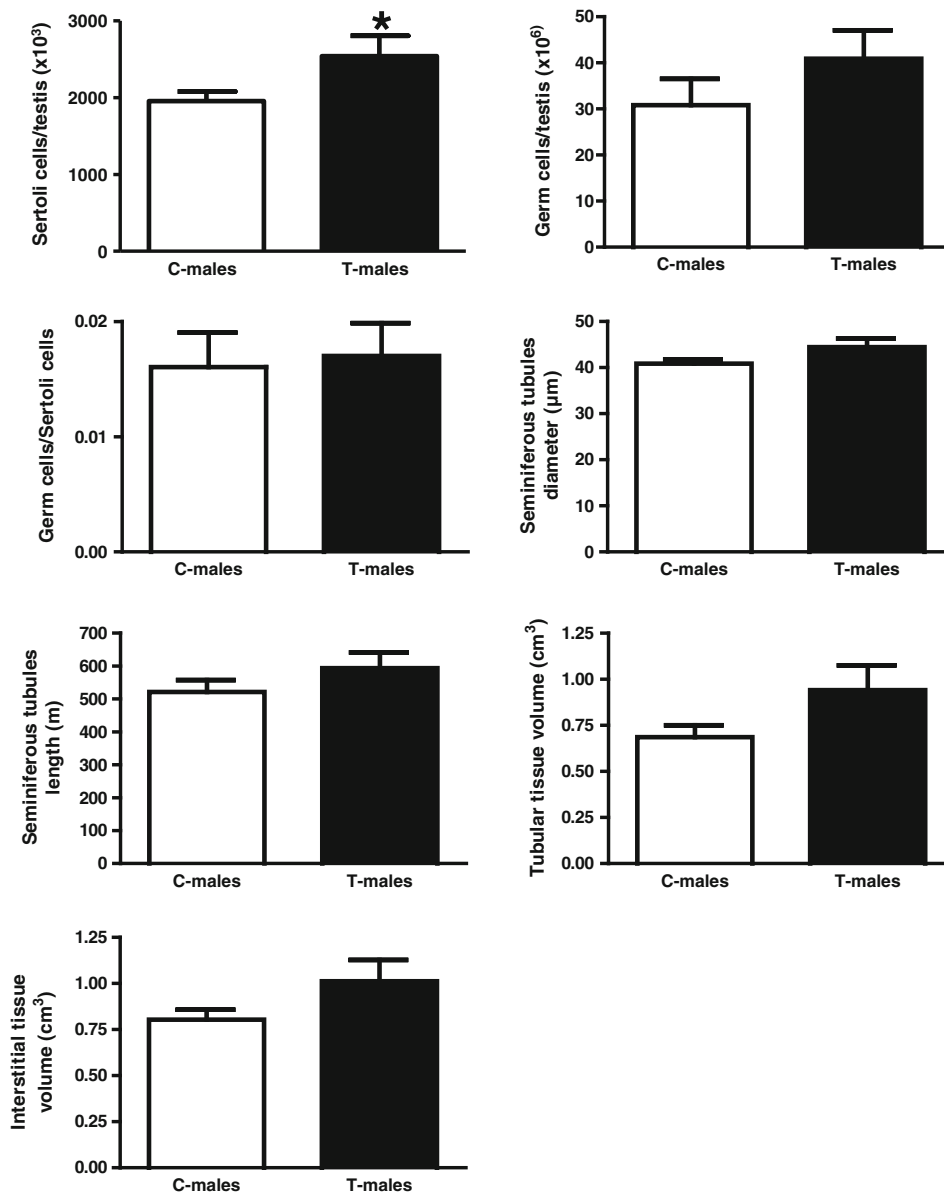
mRNA expression of AR, FSHR, and TGF $\beta$ s family members

The expression of TGFBR1 in testicular tissue was significantly lower in T-males compared to C-males ( $P = 0.03$ , Fig. 3). Conversely, no significant differences between groups were observed in the mRNA expression levels of FSHR, and TGF $\beta$ 3. The mRNA expression of AR, AMH, and TGF $\beta$ 1 was similar between both groups (Fig. 3).

#### Discussion

The findings from the present study demonstrate that exposure to excess T during fetal life increases the number of Sertoli cells in the infant lamb testis. In concert with our previous findings in adult T-male rams, which manifested increased Sertoli cell number and impaired spermatogenesis [2], these data support the hypothesis that reprogramming during fetal development by prenatal T excess results in an early alteration in the cell population of the seminiferous tubules. Such early perturbations, together with the lower expression of the TGFBR1 observed in T-males may contribute toward the reduction in the number of germ cells [2], decreased scrotal circumference and a reduced sperm count and motility [1] found in adult T-males.

Our finding that testes of newborn T-males have a tendency to be heavier compared to C-males is in agreement with results reported by Bormann et al. [26], using a different window of T treatment (days 30–90 of gestation). Considering that Sertoli cells of the seminiferous tubules are the most conspicuous component of the testis in fetal and prepubertal periods of life, the increased number of



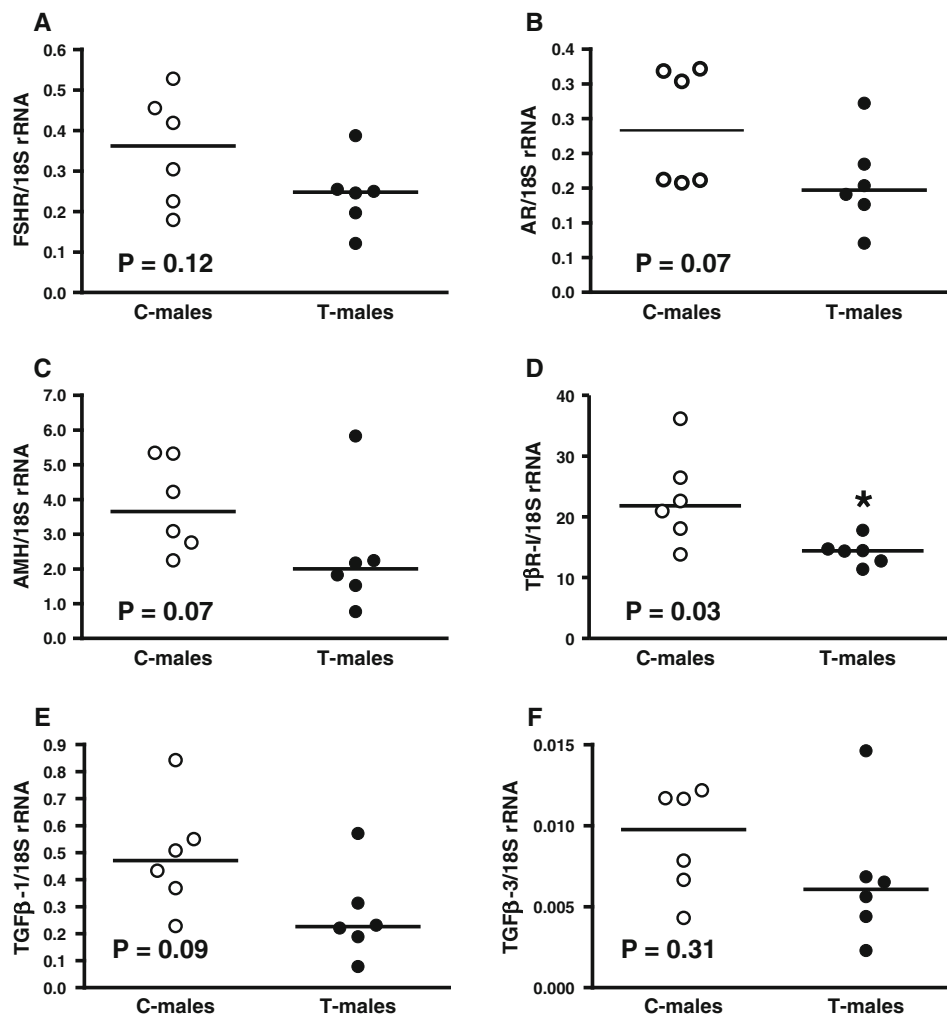
**Fig. 2** Mean ( $\pm$ SE) dimensional characteristics and cellular quantification of different testicular elements in Suffolk-Down C-males and T-males at 4 weeks of age. T-males were born to mothers that received twice weekly intramuscular injections of 30 mg of

testosterone propionate between days 30 and 90 of pregnancy and 40 mg TP between days 90 and 120 of pregnancy. C-males are corresponding controls. *Asterisk* indicates statistically significant difference ( $P \leq 0.05$ , unpaired Student's *t* test)

Sertoli cells supports increased testis weight. In mammals, increased or decreased testis volume before pubertal onset is directly associated with increased or decreased Sertoli cell numbers, respectively [21, 27–29]. Although our experimental design did not address the mechanisms contributing to increase Sertoli cell number, there is compelling evidence that androgens induce Sertoli cell proliferation in early stages of life [30–32]. As such, the increase in Sertoli cell number appears to be the direct reflection of the prenatal testosterone treatment. The

proliferative effect of androgen on fetal Sertoli cells is likely mediated through the peritubular myoid cells which express AR during fetal development [33], since Sertoli cells do not express the AR until postnatal life [34–38].

The findings from this study, which document early increase in Sertoli cell number with no change in germ cell number during early postnatal life as opposed to reduced germ cell number during adulthood [2] suggests that Sertoli cell impairment is the initial target of prenatal T excess and that the loss of germ cell observed in adult T-males may



**Fig. 3** mRNA expression of FSHR **a**, AR **b**, AMH **c**, TGFBR1 **d**, TGFBR1 **e**, and TGFBR3 **f** in testicular tissue of C-males ( $n = 6$ ) and T-males ( $n = 6$ ) at 4 week of age. 18S rRNA was used as internal

control. *P* values shown are from non-parametric Mann–Whitney test. The horizontal line refers to the median. Asterisk indicates significant difference between groups

arise near puberty, when spermatogenesis begins. Evidence to date indicates that spermatid number in adults is proportional to the numbers of Sertoli cells produced during perinatal development [39]. The finding of increased Sertoli number in the face of decreased sperm count [1] in adult prenatal T-treated sheep disagrees with this premise and strongly supports disrupted Sertoli cell function as a contributing factor. To what extent the early perturbation in Sertoli cell number and function contribute to later disruption in spermatogenesis remains to be determined.

Lack of change in expression of the FSHR in the infant testes as opposed to increased FSHR expression in post-pubertal males [2] suggests later development of this disruption. Evidence exists to indicate that FSHR expression in the Sertoli cell membrane in fetal, newborn, and adult

testis differs depending on the time point studied [30, 38]. For example, the most prominent FSH-dependent testicular growth in rams occurs between postnatal days 60 and 90, when an increase in the number of FSH binding sites is evident in the testis [40], in essence one or two months later from our study.

Altered TGF $\beta$  signaling in Sertoli cells may be a contributing factor in subsequent impairment in testicular function evidenced as decrease in sperm number [2]. TGF $\beta$  regulates several testicular functions like spermatogenesis, steroidogenesis, extracellular matrix synthesis [12, 16, 41, 42]. Recent studies have emphasized the effects of TGF $\beta$ s in maintaining the integrity of the blood-testis barrier [16, 43–46]. The reduced TGFBR1 expression found in T-males at 4 weeks of age suggests a potential

impact of prenatal T treatment on the postnatal development of the blood–testis barrier.

The low plasma LH levels in T-males and lack of difference between treatment groups are consistent with findings from an early study, which involved 60 mg of TP treatment from days 30 to 90 of pregnancy [47]. The similarity in plasma levels of FSH, LH, and T in C- and T-males at the time of the study support the hypothesis that the higher number of Sertoli cells was the result of direct effect of the prenatally T excess on the testis and a change in endogenous circulating levels of T may not be a contributing factor. Since LH and T are released in a pulsatile manner, the absence of changes in these hormones should be viewed with caution, as they come from a single time point measurement.

In summary, our findings support the hypothesis that prenatal exposure to excess testosterone impairs the developmental ontogeny of the testis by having an impact on the number of Sertoli cells and the expression of key mediators of testicular differentiation. The findings of Sertoli cell disruption, evident as early as 4 weeks of age, are supportive of a role for impaired Sertoli cell function in reprogramming of testicular differentiation.

**Acknowledgments** We are grateful to Dr. José F. Cox for the facilities of the Reproductive Biotechnology Laboratory of the Universidad de Concepción; to Dr Gordon E Niswender, Leo Reichert Jr and A. F. Parlow for providing reagents for LH and FSH RIAs, to DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) for the donation of the Biophotometer. Participation of Dr Vasantha Padmanabhan and Dr Rodolfo Rey in this project was supported by International Collaboration Agreement with FONDECYT. This work was supported by Fondecyt Grant 1090031. This work was supported by the National Fund for Science and Technology Development (FONDECYT, Grant number 1090031).

**Conflict of interest** The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

## References

- S.E. Recabarren, P.P. Rojas-García, M.P. Recabarren, V.H. Alfaro, R. Smith, V. Padmanabhan, T. Sir-Petermann, Prenatal testosterone excess reduces sperm count and motility. *Endocrinology* **149**, 6444–6448 (2008)
- P.P. Rojas-García, M.P. Recabarren, L. Sarabia, J. Schön, C. Gabler, R. Einspanier, M. Maliqueo, T. Sir-Petermann, R. Rey, S.E. Recabarren, Prenatal testosterone excess alters Sertoli and germ cell number and testicular FSH receptor expression in rams. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E998–E1005 (2010)
- T. Sir-Petermann, M. Maliqueo, B. Angel, H.E. Lara, F. Pérez-Bravo, S.E. Recabarren, Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum. Reprod.* **17**, 2573–2579 (2002)
- D. Tran, N. Meusy-Dessolle, N. Josso, Anti-Müllerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells. *Nature* **269**, 411–412 (1977)
- R. Rey, Endocrine, paracrine and cellular regulation of postnatal anti-Müllerian hormone secretion by Sertoli cells. *Trends Endocrinol. Metab.* **9**, 271–276 (1998)
- S.E. Recabarren, T. Sir-Petermann, R. Rios, M. Maliqueo, B. Echiburú, R. Smith, P. Rojas-García, M. Recabarren, R.A. Rey, Pituitary and testicular function in sons of women with polycystic ovary syndrome from infancy to adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 3318–3324 (2008)
- C. West, D.L. Foster, N.P. Evans, J. Robinson, V. Padmanabhan, Intra-follicular activin availability is altered in prenatally-androgenized lambs. *Mol. Cell. Endocrinol.* **185**, 51–59 (2001)
- S.E. Recabarren, V. Padmanabhan, E. Codner, A. Lobos, C. Durán, M. Vidal, D.L. Foster, T. Sir-Petermann, Postnatal developmental consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated prenatally with testosterone. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **289**, E801–E806 (2005)
- T.L. Steckler, C. Herkimer, D.A. Dumesic, V. Padmanabhan, Developmental programming: excess weight gain amplifies the effects of prenatal testosterone excess on reproductive cyclicity—implication for polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* **150**, 1456–1465 (2009)
- S. Franks, Animal models and the developmental origins of polycystic ovary syndrome: increasing evidence for the role of androgens in programming reproductive and metabolic dysfunction. *Endocrinology* **153**, 2536–2547 (2012)
- B.P. Mullaney, M.K. Skinner, Transforming growth factor-beta (beta 1, beta 2, and beta 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. *Mol. Endocrinol.* **7**, 67–76 (1993)
- K.J. Teerds, J.H. Dorrington, Localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 during testicular development in the rat. *Biol. Reprod.* **48**, 40–45 (1993)
- C. Belville, S.P. Jamin, J.Y. Picard, N. Josso, N. di Clemente, Role of type I receptors for anti-Müllerian hormone in the SMAT-1 Sertoli cell line. *Oncogene* **24**, 4984–4992 (2005)
- S. Hirobe, W.W. He, M.M. Lee, P.K. Donahoe, Müllerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology* **131**, 854–862 (1992)
- J. Teixeira, S. Maheswaran, P.K. Donahoe, Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr. Rev.* **22**, 657–674 (2001)
- W.Y. Lui, W.M. Lee, C.Y. Cheng, TGF-betas: their role in testicular function and Sertoli cell tight junction dynamics. *Int. J. Androl.* **26**, 147–160 (2003)
- W.Y. Lui, W.M. Lee, C.Y. Cheng, Transforming growth factor-beta3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. *Endocrinology* **142**, 1865–1877 (2001)
- W.Y. Lui, W.M. Lee, C.Y. Cheng, Transforming growth factor beta3 regulates the dynamics of Sertoli cell tight junctions via the p38 mitogenactivated protein kinase pathway. *Biol. Reprod.* **68**, 1597–1612 (2003)
- L. Konrad, G.H. Lüers, E. Völck-Badouin, M.M. Keilani, L. Laible, G. Aumüller, R. Hofmann, Analysis of the mRNA expression of the TGF-Beta family in testicular cells and localization of the splice variant TGF-beta2B in testis. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 1211–1220 (2006)
- S.E. Recabarren, P.P. Rojas-García, M.P. Recabarren, K. Norambuena, T. Sir-Petermann, Impact of prenatal exposure to testosterone in biometrics and endocrine parameters of newborn lambs. *Arch. Med. Vet.* **41**, 43–51 (2009)
- R. Rey, S. Campo, P. Bedecarrás, C. Nagle, H. Chemes, Is infancy a quiescent period of testicular development? Histological, morphometric, and functional study of the seminiferous tubules of the *Cebus* monkey from birth to the end of puberty. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **76**, 1325–1331 (1993)

22. H. Mori, A.K. Christensen, Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J. Cell Biol.* **84**, 340–354 (1980)
23. R. Rey, C. Nagle, H. Chemes, Morphometric study of the testicular interstitial tissue of the monkey *Cebus apella* during postnatal development. *Tissue Cell* **28**, 31–42 (1996)
24. D.J. Handelsman, S. Staraj, Testicular size: the effects of aging, malnutrition, and illness. *J. Androl.* **6**, 144–151 (1985)
25. W. Muruvi, H.M. Picton, R.G. Rodway, I.M. Joyce, In vitro growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries. *Theriogenology* **64**, 1357–1370 (2005)
26. C.L. Bormann, G.D. Smith, V. Padmanabhan, T.M. Lee, Prenatal testosterone and dihydrotestosterone exposure disrupts ovine testicular development. *Reproduction* **142**, 167–173 (2011)
27. M. Nistal, M.A. Abaurrea, R. Paniagua, Morphological and histometric study on the human Sertoli cell from birth to the onset of puberty. *J. Anat.* **134**, 351–363 (1982)
28. J. Müller, N.E. Skakkebaek, Quantification of germ cells and seminiferous tubules by stereological examination of testicles from 50 boys who suffered from sudden death. *Int. J. Androl.* **6**, 143–156 (1983)
29. C. Lukas-Croisier, C. Lasala, J. Nicaud, P. Bedecarrás, T.R. Kumar, M. Dutertre, M.M. Matzuk, J.Y. Picard, N. Josso, R. Rey, Follicle-stimulating hormone increases testicular anti-Müllerian hormone (AMH) production through Sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH gene. *Mol. Endocrinol.* **17**, 550–561 (2003)
30. H. Johnston, P.J. Baker, M. Abel, H.M. Charlton, G. Jackson, L. Fleming, T.R. Kumar, P.J. O'Shaughnessy, Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology* **145**, 318–329 (2004)
31. K.A. Tan, K. De Gendt, N. Atanassova, M. Walker, R.M. Sharpe, P.T. Saunders, E. Denolet, G. Verhoeven, The role of androgens in Sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology* **146**, 2674–2683 (2005)
32. H.M. Scott, G.R. Hutchison, M.S. Jobling, C. McKinnell, A.J. Drake, R.M. Sharpe, Relationship between androgen action in the “male programming window,” fetal Sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinology* **149**, 5280–5287 (2008)
33. L. You, M. Sar, Androgen receptor expression in the testes and epididymides of prenatal and postnatal Sprague-Dawley rats. *Endocrine* **9**, 253–261 (1998)
34. G. Majdic, M.R. Millar, P.T. Saunders, Immunolocalisation of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cells of associated ducts. *J. Endocrinol.* **147**, 285–293 (1995)
35. L. Al-Attar, K. Noël, M. Dutertre, C. Belville, M.G. Forest, P.S. Burgoyne, N. Josso, R. Rey, Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *J. Clin. Invest.* **100**, 1335–1343 (1997)
36. E.B. Berensztejn, M.S. Baquedano, C.R. Gonzalez, N.I. Saraco, J. Rodriguez, R. Ponzio, M.A. Rivarola, A. Belgorosky, Expression of aromatase, estrogen receptor alpha and beta, androgen receptor, and cytochrome P-450sc in the human early prepubertal testis. *Pediatr. Res.* **60**, 740–744 (2006)
37. H.E. Chemes, R.A. Rey, M. Nistal, J. Regadera, M. Musse, P. González-Peramato, A. Serrano, Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in Sertoli cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 4408–4412 (2008)
38. K. Boukari, G. Meduri, S. Brailly-Tabard, J. Guibourdenche, M.L. Ciampi, N. Massin, L. Martinerie, J.Y. Picard, R. Rey, M. Lombès, Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Müllerian hormone repression during early human testis development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 1818–1825 (2009)
39. J.M. Orth, G.L. Gunsalus, A.A. Lamperti, Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* **122**, 787–794 (1988)
40. T.A. Yarney, L.M. Sanford, Pubertal changes in the secretion of gonadotropic hormones, testicular gonadotropic receptors and testicular function in the ram. *Domest. Anim. Endocrinol.* **6**, 219–229 (1989)
41. A. Wagener, J. Fickel, J. Schön, A. Fritzenkötter, F. Göritz, S. Blottner, Seasonal variation in expression and localization of testicular transforming growth factors TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3 corresponds with spermatogenic activity in roe deer. *J. Endocrinol.* **187**, 205–215 (2005)
42. Y.Q. Zhang, X.Z. He, J.S. Zhang, R.A. Wang, J. Zhou, R.J. Xu, Stage-specific localization of transforming growth factor beta1 and beta3 and their receptors during spermatogenesis in men. *Asian J. Androl.* **6**, 105–109 (2004)
43. L. Su, D.D. Mruk, W.M. Lee, C.Y. Cheng, Differential effects of testosterone and TGF- $\beta$ 3 on endocytic vesicle-mediated protein trafficking events at the blood–testis barrier. *Exp. Cell Res.* **316**, 2945–2960 (2010)
44. H.H. Yan, D.D. Mruk, W.M. Lee, C.Y. Cheng, Blood–testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB J.* **22**, 1945–1959 (2008)
45. V. Caussanel, E. Tabone, J.C. Hendrick, F. Dacheux, M. Benahmed, Cellular distribution of transforming growth factor betas 1, 2, and 3 and their types I and II receptors during postnatal development and spermatogenesis in the boar testis. *Biol. Reprod.* **56**, 357–367 (1997)
46. C. Gautier, C. Levacher, O. Avallet, M. Vigier, V. Rouiller-Fabre, L. Lecerf, J. Saez, R. Habert, Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 in the fetal and neonatal rat testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **99**, 55–61 (1994)
47. S.E. Recabarren, A. Lobos, Y. Figueroa, V. Padmanabhan, D.L. Foster, T. Sir-Petermann, Prenatal testosterone treatment alters LH and testosterone responsiveness to GnRH agonist in male sheep. *Biol. Res.* **40**, 329–338 (2007)



---

---

## **TRABAJO DE INVESTIGACIÓN 3**

### **PITUITARY AND TESTIS RESPONSIVENESS OF YOUNG MALE SHEEP EXPOSED TO TESTOSTERONE EXCESS DURING FETAL DEVELOPMENT**

Mónica P Recabarren, Pedro P Rojas-Garcia, Ralf Einspanier, Vasantha Padmanabhan,  
Teresa Sir-Petermann and Sergio E Recabarren

Reproduction (2013) 145 567–576



## Pituitary and testis responsiveness of young male sheep exposed to testosterone excess during fetal development

Mónica P Recabarren, Pedro P Rojas-García, Ralf Einspanier<sup>1</sup>, Vasantha Padmanabhan<sup>2</sup>, Teresa Sir-Petermann<sup>3</sup> and Sergio E Recabarren

Laboratory of Animal Physiology and Endocrinology, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Concepción, Chillán CP 3812120, Chile, <sup>1</sup>Institute of Veterinary Biochemistry, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, <sup>2</sup>Departments of Pediatrics and Reproductive Sciences Program, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109, USA and <sup>3</sup>Laboratory of Endocrinology and Metabolism, Western Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Correspondence should be addressed to S E Recabarren; Email: srecabar@udec.cl

### Abstract

Prenatal exposure to excess testosterone induces reproductive disturbances in both female and male sheep. In females, it alters the hypothalamus–pituitary–ovarian axis. In males, prenatal testosterone excess reduces sperm count and motility. Focusing on males, this study tested whether pituitary LH responsiveness to GNRH is increased in prenatal testosterone-exposed males and whether testicular function is compromised in the testosterone-exposed males. Control males ( $n=6$ ) and males born to ewes exposed to twice weekly injections of 30 mg testosterone propionate from days 30 to 90 and of 40 mg testosterone propionate from days 90 to 120 of gestation ( $n=6$ ) were studied at 20 and 30 weeks of age. Pituitary and testicular responsiveness was tested by administering a GNRH analog (leuprolide acetate). To complement the analyses, the mRNA expression of LH receptor (LHR) and that of steroidogenic enzymes were determined in testicular tissue. Basal LH and testosterone concentrations were higher in the testosterone-exposed-males. While LH response to the GNRH analog was higher in the testosterone-exposed males than in the control males, testosterone responses did not differ between the treatment groups. The testosterone:LH ratio was higher in the control males than in the testosterone-exposed males of 30 weeks of age, suggestive of reduced Leydig cell sensitivity to LH in the testosterone-exposed males. The expression of LHR mRNA was lower in the testosterone-exposed males, but the mRNA expression of steroidogenic enzymes did not differ between the groups. These findings indicate that prenatal testosterone excess has opposing effects at the pituitary and testicular levels, namely increased pituitary sensitivity to GNRH at the level of pituitary and decreased sensitivity of the testes to LH.

Reproduction (2013) 145 567–576

### Introduction

Evidence is accumulating from both clinical and experimental studies that prenatal exposure to excess testosterone leads to a number of adverse consequences during adult life. In congenital adrenal hyperplasia (CAH), a classic model of prenatal androgen excess in humans, excess androgen production by the fetal adrenal gland leads to androgenization of female fetuses, leading to a series of consequences during postnatal life (Nimkarn *et al.* 2009). Males with CAH have also been found to manifest perturbations in gametogenesis and metabolic disorders (Cabrera *et al.* 2001, New 2001, Reisch *et al.* 2009, Falhammar *et al.* 2012).

Polycystic ovary syndrome (PCOS), an endocrine–metabolic disorder of high prevalence (10%) in women, is characterized by excessive production of androgens. The demonstration some years ago that pregnant PCOS

women have higher circulating levels of androgen (Sir-Petermann *et al.* 2002) raises the possibility that the offspring of these women are likely to be exposed to excess androgen during fetal life. Prospective longitudinal studies to evaluate the effect of prenatal testosterone excess are difficult to perform in humans. Animal models of PCOS (Abbott *et al.* 1998) are a great resource in this regard. In female sheep exposed prenatally to excess testosterone, multiple neuroendocrine, ovarian, and behavioral disorders are evident from birth to adulthood (Padmanabhan *et al.* 2006).

Despite the significant advances in understanding the consequences of exposure to excess testosterone during development in females, few studies have addressed the corollary in males. Male offspring of PCOS mothers manifest metabolic disarrangements beginning at birth and culminating in altered lipid profile, insulin resistance and excess weight gain in

adulthood (Recabarren *et al.* 2008b). Adult male sheep exposed to excess testosterone manifest a significant reduction in the sperm count, scrotal circumference and sperm motility (Recabarren *et al.* 2008a), an increased number of Sertoli cells and an altered expression of FSH receptors and TGFB1 and TGFB3 (Rojas-García *et al.* 2010). To expand our understanding of the developmental consequences of testosterone excess in male sheep, we examined the response of the pituitary–gonadal axis following the administration of a GnRH analog, the expression patterns of LH receptor (LHR) and key steroidogenic enzymes P450c17,20 lyase, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD type 3 (17BHSD type 3)), P450 aromatase, P450scc, and 3 $\beta$ -HSD (3BHSD) in whole testicular tissue and the expression of P450c17, P450scc, 17BHSD type 3, and 3BHSD in Leydig cells cultured before and after an human chorionic gonadotrophin (hCG) challenge.

**Results**

**Pituitary LH responsiveness**

*20 weeks (prepubertal)*

Basal LH levels, mean of six samples immediately before GnRH analog administration, were higher in the testosterone-exposed males (1.35  $\pm$  0.53 ng/ml) than in the control males (0.22  $\pm$  0.03 ng/ml). GnRH analog administration induced an LH increase in both groups (Fig. 1) with a peak LH response occurring within the first 3 h. The acute and chronic areas under the curves (AUCs) of LH response in the testosterone-exposed males were twice as high as those in the control males (Fig. 2). *Post hoc* analyses revealed differences between the treatment groups at 1.5, 2.0, and 2.5 h after GnRH analog administration (Fig. 1). In the control males, LH levels returned to basal levels ( $\leq$ 1 ng/ml) 18 h after GnRH analog administration, while the

testosterone-exposed males reached basal levels after 42 h (see inset, Fig. 1).

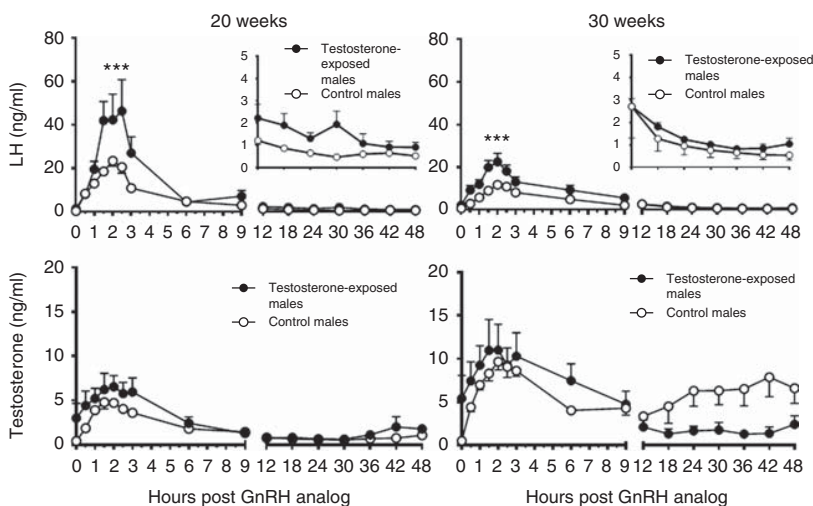
*30 weeks (postpubertal)*

As in prepubertal age, the testosterone-exposed males showed higher basal plasma LH levels than the control males (0.76  $\pm$  0.33 ng/ml in the control males and 2.28  $\pm$  0.48 ng/ml in the testosterone-exposed males). Both groups responded to the GnRH analog, although peak LH levels achieved were only half those achieved at 20 weeks of age. Despite this, the testosterone-exposed males had a higher LH response than the control males, specifically at 1.5, 2.0, and 2.5 h after GnRH analog administration (Fig. 1). This was reflected as a significant decrease in the AUC of LH response at this age relative to prepubertal AUC (Fig. 2). The mean acute and chronic AUCs between control males and testosterone-exposed males did not differ at this age. LH levels were below 1 ng/ml in the control males by 24 h and in the testosterone-exposed males after 30 h (see inset, Fig. 1).

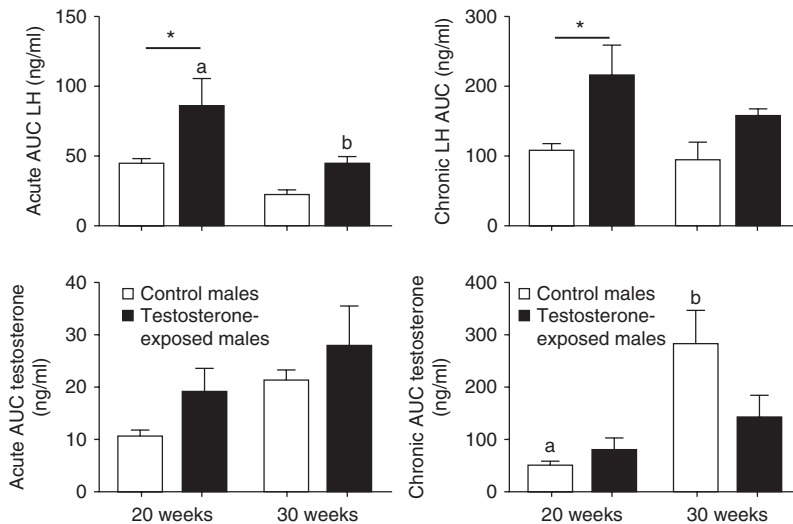
**Testicular responsiveness**

*20 weeks (prepubertal)*

As with LH, basal plasma testosterone concentrations were higher in the testosterone-exposed males (3.02  $\pm$  1.7 ng/ml) than in the control males (0.45  $\pm$  0.27 ng/ml). The time-course of testosterone secretion after GnRH analog administration followed a parallel trajectory to that of LH secretion, with peak concentrations being observed within the first 3 h of the GnRH analog challenge, that is, during the acute phase. Neither the time-course of testosterone secretion nor testosterone concentrations achieved differed between the treatment groups (Fig. 1). The acute and chronic AUCs of testosterone were consistent with this pattern, with no difference being observed between the groups (Fig. 2).



**Figure 1** Plasma LH and testosterone responses to the GnRH analog challenge in the control males (open circles, *n* = 6) and testosterone-exposed males (filled circles, *n* = 6) at 20 and 30 weeks of age. Insets in the graphs of LH show the last 36 h after GnRH analog administration in ng/ml. Testosterone-exposed males were born to ewes receiving testosterone propionate from days 30 to 120 of gestation. Asterisks indicate a significant difference between control males and testosterone-exposed males.



**Figure 2** AUC of LH and testosterone responses following the GNRH analog test during the first 3 h (acute AUC, top left and bottom left) and during the entire 48-h period (chronic AUC, top right and bottom right) in the control males (white bars) and testosterone-exposed males (black bars). Asterisks indicate significant differences between control males and testosterone-exposed males. A significant age effect within each treatment group is indicated by different letters (a versus b).

### 30 weeks (postpubertal)

Basal testosterone levels at this postpubertal age were also higher in the testosterone-exposed males ( $6.48 \pm 2.98$  ng/ml) than in the control males ( $0.53 \pm 0.10$  ng/ml). As was the case at 20 week, plasma testosterone concentration was elevated during the first 3 h after the GNRH analog challenge (Fig. 1). While there were no differences in the acute release of testosterone between the treatment groups (first 3 h), testosterone levels increased during later hours in the control males but not in the testosterone-exposed males (Fig. 2).

### Testosterone sensitivity to LH

The testosterone:LH ratio serves as an indicator of Leydig cell sensitivity to LH. The testosterone:LH ratio was similar in the control males and testosterone-exposed males during the first 3 h of testing at both prepubertal and postpubertal ages. The cumulative testosterone:LH ratio (48 h) was significantly lower in the testosterone-exposed males than in the controls at 30 weeks of age. The age-related increase in acute and cumulative testosterone:LH ratios observed in the controls was not evident in the testosterone-exposed males (Fig. 3).

### Testicular gene expression

Testicular LHR expression was lower in the testosterone-exposed males than in the control males (Fig. 4,  $P=0.011$ ). In contrast, the expression levels of P450c17, which is located upstream in the biosynthetic pathway of steroid synthesis converting progesterone to 17-OH progesterone; 17BHS type 3, whose role is to convert androstenedione to testosterone; and P450

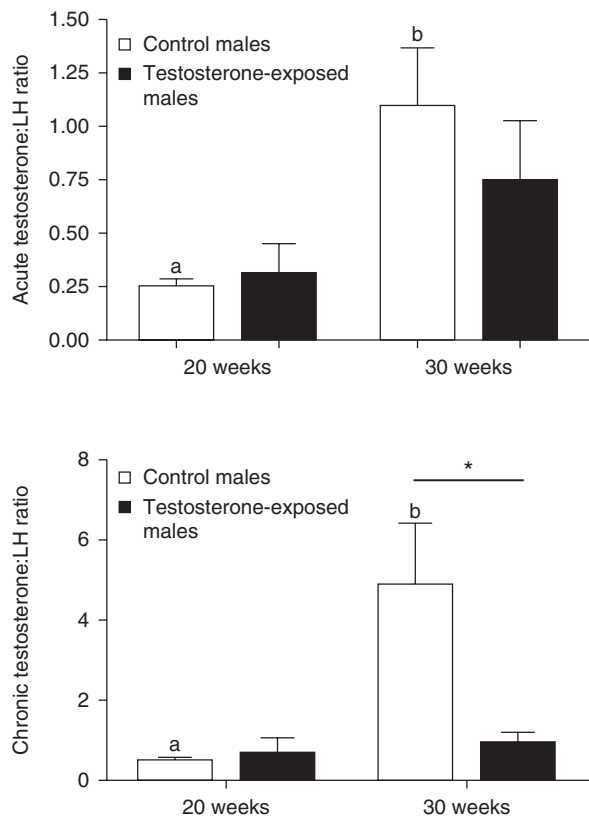
aromatase, which is the last enzyme in this metabolic steroid cascade converting testosterone to estradiol, did not differ between the treatment groups (Fig. 4). There was no correlation between testicular LHR expression and AUC of testosterone in males at 30 weeks of age (Pearson's  $r=0.263$ ,  $P=0.615$ ). The mRNA expression of *CYP11A1* (*P450SCC*) and that of *CYP17A1* (*P450C17*) in isolated Leydig cells from the control males and testosterone-exposed males before GNRH analog administration were similar between the treatment groups at each time point studied (Fig. 5). The mRNA expression of *3BHS* and *17BHS* type 3 in Leydig cells was higher after hCG stimulation in both control males and testosterone-exposed males relative to pre hCG levels (Fig. 5). However, there was no significant prenatal testosterone treatment effect.

### Discussion

Findings from the present study show that prenatal testosterone treatment increases pituitary responsiveness to GNRH while decreasing testicular sensitivity. The failure of the testicle to respond to increased LH release appears to be related to the downregulation of LHR and not changes in steroidogenic enzymes. The mechanisms underlying these functional differences and relevance to male fertility are discussed below.

### Impact of prenatal testosterone excess on pituitary LH responsiveness to the GNRH analog challenge

It is well established that GNRH regulates the synthesis and release of LH (Stanislaus *et al.* 1998). Recently, we have found that the LH pulse amplitude of prenatal testosterone- and dihydrotestosterone (DHT)-treated males is increased (Recabarren *et al.* 2012). In these



**Figure 3** Ratio of testosterone:LH, as an index of gonadal sensitivity. Acute testosterone:LH ratio during the first 3 h (left) and chronic testosterone:LH ratio during the entire 48-h period (right) in the control males and testosterone-exposed males. A significant (white and black bars respectively) following GNRH analog administration. Asterisk indicates a significant difference between control males and testosterone-exposed males. A significant age effect within each treatment group is indicated by different letters (a versus b).

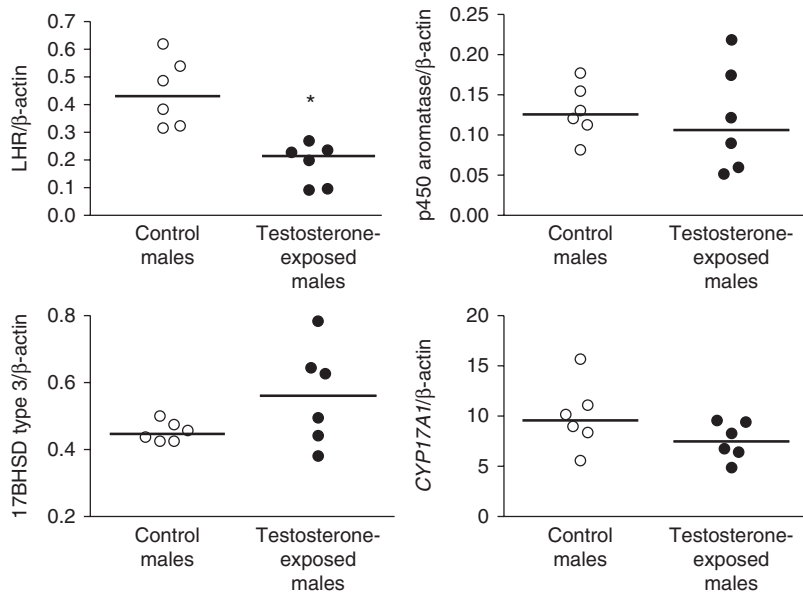
studies, it was unclear whether the increased LH pulse amplitude of LH was the result of increased GNRH input or increased pituitary sensitivity to GNRH. Other studies have found that pituitary responsiveness is increased in female offspring born to gestational testosterone-treated animals (Manikkam *et al.* 2008). Findings of increased LH release following GNRH analog administration in this study indicate that pituitary responsiveness to GNRH is also increased in the males (this study) as was the case with the females (Manikkam *et al.* 2008). Together, these findings support a role for increased pituitary responsiveness to GNRH as a contributing factor in the observed increase in the LH pulse amplitude of endogenous LH pulses of the testosterone-males (Recabarren *et al.* 2012). Whether the mechanism mediating this increase relates to an increase in LH synthesis or an increased GNRH receptor expression remains to be investigated. Evidence to date has supported the hypothesis that GNRH has the ability to upregulate its own receptor (Katt *et al.* 1985, Turzillo *et al.* 1995a, 1995b, Sakurai *et al.* 1997) and that the

amount of LH released is a function of the GNRH receptor number (Evans *et al.* 1997) and LH content (Clarke *et al.* 1987). It should be recognized that these findings do not exclude any additional contribution stemming from increased GNRH input. Interestingly, a recent study has provided evidence in support of the effect of testosterone at the level of the pituitary. The authors found that pituitary glands of adult prenatal testosterone-treated sheep (both sexes) were 40% heavier than those of the controls. While no differences in the density of LH- or ER $\alpha$ -immunoreactive cells were found in the pituitary of the control and prenatal testosterone-treated sheep, the percentage of cells co-localizing LH $\beta$  and ER $\alpha$  was lower in the prenatal testosterone-treated females. This is suggestive of reduced estradiol feedback and consequent hypersecretion of LH (Robinson *et al.* 2011), a possibility that remains to be explored in the testosterone-exposed males.

The magnitude of response to the GNRH analog at 30 weeks was half of that observed at 20 weeks in both control males and testosterone-exposed males. This probably reflects the negative feedback exerted by testosterone secreted by the maturing testis. With increasing testosterone being produced by the male as it gets older, the pituitary gland gets exposed to higher testosterone negative feedback (Olster & Foster 1986). Earlier studies of Tilbrook *et al.* (1991) in rams have shown that the feedback of testosterone is exerted predominantly at the level of the hypothalamus. This could have led to reduced GNRH priming at the pituitary level, consequent reduction in LH production and release by the pituitary gland.

#### **Effect of prenatal testosterone excess on gonadal testosterone responsiveness to the GNRH analog challenge**

The findings from this study substantiate the role of LH in stimulating gonadal testosterone response. The LH response resulting from the GNRH analog challenge was translated into testosterone increase at the gonadal level in both groups of animals. The increase in acute testosterone response at 30 weeks (postpubertal) compared with the response at 20 weeks (prepubertal) in both treatment groups probably reflects the increasing sensitivity of the maturing testis to LH. In male lambs, the response to endogenous LH increases as they mature (Foster *et al.* 1978). Paradoxically, the increased LH release that occurred in the testosterone-exposed males following the GNRH analog test was not reflected as an increase in acute testosterone release at both developmental time points. Furthermore, cumulative testosterone secretion over the 48-h test period was reduced in the testosterone-exposed males at 30 weeks than in the control males. Overall, these findings support reduced testicular sensitivity of the exposed males to LH stimulation. This is substantiated by the fact that the



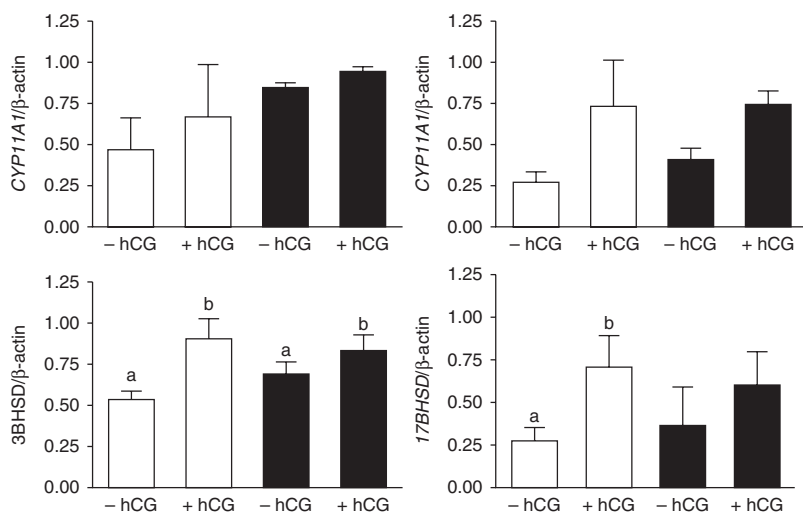
**Figure 4** mRNA expression of LHR and steroidogenic enzymes in the testis of the control males (open circles) and testosterone-exposed males (filled circles) at 40 weeks of age. The asterisk indicates significant differences between the groups.

AUC-testosterone-testosterone:AUC-LH ratio was lower in 30-week-old testosterone-exposed males than in the control males.

While testicular responsiveness to the GNRH analog was reduced in prenatal testosterone-treated males, basal testosterone release was high compared with that in the control males. This suggests that prenatal testosterone-treated males may have increased GNRH pulse frequency similar to prenatal testosterone-treated females and thus subject to repetitive pituitary and gonadal stimulation. If so, further stimulation with endogenous LH released in response to the GNRH stimulus may not lead to increased testosterone production.

There are several explanations for the reduced testosterone response to GNRH analog stimulation. One possibility is that the LH released in response to GNRH analog testing may be of qualitatively different

nature compared with that released in the controls and not recognized by the RIA. Proper posttranscriptional processing of the LH molecule (Ciccione & Kaiser 2009) and the resulting polysaccharide moiety is important in conferring biological activity to the LH molecule (Bergendahl & Veldhuis 2001). Several studies have shown that changes in the mix of LH isoforms may contribute to differences in the response of the female gonad, but less is known about the response in the Leydig cells of the male gonad (Castro-Fernández *et al.* 2000, Perera-Marín *et al.* 2007, Olivares *et al.* 2009). In a rat model of diet-induced obesity, LH bioactivity was reduced, rendering the male hypogonadal (Olivares *et al.* 2010). More acidic forms are predominant in eugonadal men (Bergendahl & Veldhuis 2001). The altered pattern of endogenous GNRH release (assessed from LH pulsatility) during post-development trajectory



**Figure 5** mRNA expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells from the control males (white bars) and testosterone-exposed males (black bars) without hCG stimulation (-hCG) and 24 h after stimulation with hCG (+hCG). Significant difference within groups before and after hCG stimulation is shown by different letters (a versus b).



in the testosterone-exposed males (Recabarren *et al.* 2012) may have contributed to the production of less acidic fast-clearing LH that does not provide sustained support in the testosterone-exposed males as in the control males. This premise is consistent with our earlier finding that hCG stimulation of the control males and testosterone-exposed males elicits similar testosterone responses at 40 weeks of age (Recabarren *et al.* 2008a).

Reduced expression of LHR mRNA of the testosterone-exposed males compared with the expression in the control males may be responsible for the reduced testicular response. However, diminished LHR mRNA expression did not correlate with the AUC of testosterone response to GnRH analog testing. Whether LHR protein changes correlate with testosterone response remains to be determined. The lack of difference in the mRNA levels of key steroidogenic enzymes indicates that the decreased cumulative testosterone response of the testosterone-exposed males may not be the function of steroidogenic enzymes being limiting. Furthermore, although *3BHS*D and *17BHS*D type 3 mRNA expression in Leydig cells in a suspension culture increased in response to hCG stimulation, there was no prenatal treatment effect, confirming observations in testicular mRNA expression. These findings at the level of mRNA need to be interpreted with caution since changes may have occurred at the protein level.

These findings provide evidence that exposure to excess testosterone during fetal development not only disrupts testicular differentiation, leading to a reduced number of sperm cells and compromised Sertoli cell function (Recabarren *et al.* 2008a, 2008b, Rojas-García *et al.* 2010, 2013), but also disrupts the interface of the pituitary–gonadal axis. How these findings are enmeshed remains to be investigated.

While we did not analyze spermatogenesis in this study, we have investigated this extensively in previous studies. These studies showed no differences between control males and testosterone-exposed males (Rojas-García *et al.* 2013) at 4 weeks of age. In contrast, spermatogenesis was found to be impaired with a lower number of spermatogonia, spermatocytes I, and spermatids per tubule in adult prenatal testosterone-treated males (Rojas-García *et al.* 2010).

Considering that adult reproductive function is the culmination of proper developmental ontogeny of the hypothalamo-pituitary–gonad axis, any perturbation in this developmental sequence would lead to perturbation in fertility. In the present study, a derangement was observed in the relationship between the pituitary gland and the testicle in peripubertal males because of the prenatal exposure to testosterone. This could jeopardize the future fertility of the testosterone-exposed. Since excess of testosterone may be seen as an endocrine disruptor as well as an environmental disruptor (Skakkebaek *et al.* 2001), these findings in our animal model

could, although with caution, be extended to human reproductive health, in particular, to sons of pregnant PCOS women. In support of this premise, placentas from PCOS mothers were found to have lower aromatase and higher 3 $\beta$ -HSD1 activities, which could lead to increased androgen levels during pregnancy (Maliqueo *et al.* 2013). The studies of Veiga-Lopez *et al.* (2011) in sheep have found male and female sheep fetuses whose mothers were administered testosterone to have elevated plasma testosterone levels compared with their control counterparts.

## Materials and Methods

### General management, breeding, and prenatal testosterone exposure

This study began in late March/early April during the natural breeding season at the Chillán Campus of the University of Concepción, Chile (36° 36' south latitude, 71° 30' west longitude, 144 m above the sea level). Adult Suffolk Down females were mated as described previously (Recabarren *et al.* 2008a). After synchronization of estrous and controlled mating, pregnant sheep were allocated randomly to one of two treatments. One group of pregnant sheep received twice weekly i.m. injections of 30 mg testosterone propionate (T; Steraloids, Newport, RI, USA) dissolved in cottonseed oil as a vehicle, between 30 and 90 days of pregnancy, followed by injections of 40 mg testosterone from days 90 to 120 of pregnancy. Another group served as a control and received an oil vehicle twice weekly from days 30 to 120 of gestation. This regimen of testosterone administration was chosen to reflect the higher levels of testosterone observed in women with PCOS during their pregnancies and has been used in previous studies (Sir-Petermann *et al.* 2002, Recabarren *et al.* 2008a).

Ewes were maintained on pasture and supplemented with pellet food to meet the energy requirements of pregnant sheep. Lambs were born in mid-September by normal delivery, after full-length gestation (mean of 147 days), and were weaned at 8 weeks of age. They were maintained under natural photoperiod and given free access to water and pasture and supplemented twice a day with hay and commercial pelleted food for ruminants as detailed elsewhere (Recabarren *et al.* 2008a). Only males born from singleton pregnancies were used in this study. All management and experimental methodologies were approved by the Ethical Committee in Animal Research of the Faculty of Veterinary Sciences of the University of Concepción.

### Pituitary/gonadal responsiveness

GnRH analog testing for assessing pituitary and gonadal responsiveness was undertaken with the control males ( $n=6$ , born to ewes receiving the vehicle) and testosterone-exposed males ( $n=6$ , born to ewes receiving testosterone during pregnancy) at 20 and 30 weeks of age. These ages were chosen because they encompass the peripubertal window with, 20 weeks representing the prepubertal period and 30 weeks the postpubertal period of sexual development. Puberty is defined as the age at which the presence of sperm

cells in the ejaculate is first observed. In an earlier study, we found first sperm cells appearing in the ejaculate at 26 weeks of age with a steady presence of sperm cells being evident at 30 weeks of age (Recabarren *et al.* 2008a). A similar definition for puberty in male sheep has been employed by other investigators (Olster & Foster 1986, Wheaton *et al.* 2003), except that in Olster & Foster (1986)'s study, the presence of sperm cells was observed at 16–18 weeks of age, while in our flock, this was observed at 26 weeks of age. This difference may be related to the body conditions of lambs.

One or two days before GNRH analog testing, indwelling catheters were placed in both jugular veins under local anesthesia as described previously (Recabarren *et al.* 1995). Blood sampling was performed to acclimatize the males to the procedures and to review the patency of the catheters. On the day of the experiment, males were placed in experimental crates. Pasture and water were available at all time points. All studies began at 1400 h local time.

GNRH analog testing involved the administration of leuprolide acetate (Lupron Abbott, 10 µg/kg body weight) via one of the indwelling catheters and collection of blood samples through the second catheter at 0, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, and 3 h for determining the acute LH and testosterone responses and at 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, and 48 h for assessing the long-lasting effect of the GNRH analog on the LH and testosterone release. Blood (2 ml) was collected in tubes containing 10 µl of heparin (10 U/µl) and centrifuged at 1000 g for 4 min at 4 °C degrees and plasma was harvested. Plasma samples were stored at –20 °C degrees until later RIA for LH and testosterone.

### Testicular gene expression studies

To avoid transient changes stemming from GNRH analog testing in testicular gene expression, these studies were undertaken at 40 weeks of age. The left testicle was removed from each male for RNA isolation. In brief, rams were anesthetized with halothane, and their testicles were surgically removed and cut into small pieces of 0.5 cm<sup>3</sup> in size. Some of these pieces were left immersed in RNAlater (Ambion, Carlsbad, CA, USA) and stored at –20 °C for total RNA

isolation. Other pieces were also used for the *in vitro* culture of Leydig cells.

For RNA isolation, testicular tissue was homogenized using Lysing Matrix D (MP) and the FastPrep instrument (FP120, Bio 101; Thermo Electron, Osterode, Germany) and total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) as per the manufacturer's instructions. The yield of total RNA was quantified photometrically at 260 nm using the Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Schweter, Germany). The quality of the RNA samples was assessed after electrophoresis on formaldehyde containing 1% (wt/vol) agarose gel with ethidium bromide staining. The quality of the RNA samples with a low RNA concentration was further verified using the Agilent 2100 Bioanalyzer and the RNA Nano Chips (Agilent, Waldbronn, Germany). To eliminate DNA contamination, the samples were subjected to DNase treatment prior to RT. A 1 µl sample of total RNA was incubated with 1 U DNase (Promega) in a total volume of 20 µl of 1× buffer used in the RT at 37 °C for 30 min, heated at 75 °C for 5 min to inactivate the DNase, and then placed immediately on ice for 5 min. A 40 µl volume of a premix containing 200 U Moloney-murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT; Promega), 2.5 µM of random hexamers (Amersham Biosciences), 0.666 mM of each dNTP (Amersham Biosciences), and 1X of the supplied RT buffer were added to each RNA sample. Samples without the M-MLV enzyme were run at the same time to monitor the absence of any genomic DNA. RT was performed at 25 °C for 10 min and at 42 °C for 1 h and then at 90 °C for 2 min. The cDNA was aliquoted in 20 µl volumes (16 ng/µl cDNA) and stored at –20 °C until analysis by real-time PCR.

### Real-time PCR

In preliminary experiments, the expression of all genes was examined by standard gradient PCR using a gradient thermocycler (Mastercycler gradient; Eppendorf, Hamburg, Germany) to confirm the expected amplicon sizes as well as to estimate the optimal annealing temperature for each pair of primers. Real-time PCRs were performed in a Rotor-Gene RG-3000 thermocycler (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia).

**Table 1** Sequence for primers used in the real-time PCR.

Genes	Primers	Annealing (°C)	PCR product length (bp)	References
β-Actin	F: 5'-CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT-3' R: 5'-GGG CAG TGA TCT CTT TCT GC-3'	55	178	Rojas-García <i>et al.</i> (2010)
LHR	F: 5'-GAT AGA AGC TAA TGC CCT TGA CAA C-3' R: 5'-CCA GAA TGA AAT TAA ATT CAG AGG AG-3'	60	197	GenBank accession no. L36329
P450c17,20	F: 5'-TGG CGG TCA CCA ACA TAA TC-3' R: 5'-CAT TCA CCT TGG CTT GCA TC-3'	60	300	GenBank accession no. AF251388
P450 aromatase	F: 5'-TCG TGG TTA AAA TCC AGG GG-3' R: 5'-TCA TTG CCT CTT CAA CCT GG-3'	60	341	GenBank accession no. AJ012153
CYP11A1	F: 5'-AGAGAATCCACTTTCGCCACATC-3' R: 5'-GGTCTTCTCCAGGTTCTGAC-3'	55	237	Vanselow <i>et al.</i> (2004)
3BHSD	F: 5'-TGTTGGTGGAGGAGAAGGATCTG-3' R: 5'-TGGGTACCTTTCACATTGACGTTCC-3'	57	253	Vanselow <i>et al.</i> (2004)
17BHSD type 3	F: 5'-TGG GAG AAT GGG CAG TGA TC-3' R: 5'-TGT TAA GGA AAT GGC TTG GG-3'	60	297	GenBank accession no. NM_001076439

F, forward; R, reverse.

The primer sequences, annealing temperature, and length of the PCR products used in the present study are given in Table 1.

A 1 µl volume of cDNA (16 ng) was used as a template for real-time PCR containing 0.2 µl of 50× SYBR Green and 5 µl of 2× SensiMix solution (Quanta, London, UK) and 0.4 µM of each primer in a final volume of 10 µl. The following real-time PCR protocol was applied: a denaturation step at 95 °C for 10 min; a three-step amplification including denaturation at 95 °C for 15 s, the corresponding annealing temperature specific for each gene (see below) for 20 s, and extension at 72 °C for 30 s; a melting curve program (50–99 °C) with continuous fluorescence measurement; and a final cooling step to 40 °C. Data acquisition was carried out at the end of each annealing and extension step. The number of cycles for all factors was 45. For mRNA quantification, a dilution series with known quantities of the specific PCR product was amplified simultaneously with the samples as a standard. Samples were measured in triplicates and the standard curves in duplicates in the same run. The PCR products applied as standards were generated by conventional block RT-PCR and purified using the Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Invitek, Berlin, Germany) as described by the manufacturer. The concentration of the purified PCR products was estimated in duplicates using the Nanodrop 1000 spectrophotometer.

The melting points of the amplified products served as confirmation of specific amplification. As negative controls, reactions containing no template (sterile RNase–DNase-free water) or no reverse transcriptase were included to exclude any PCR products derived from contaminations or from genomic DNA. The content of each specific mRNA was normalized to a housekeeping gene. In previous steps during this study, the gene expression of the 18S ribosomal subunit and β-actin was tested to choose the suitable and reliable housekeeping gene as an internal control for the normalization of the genes under study. The expression of β-actin resulted in a similar level between control males and testosterone-exposed males. Therefore, we chose to use β-actin as the internal control. The data from real-time PCR are presented as a ratio of the specific mRNA gene to β-actin expression.

#### *Leydig cell gene responsiveness to hCG*

Leydig cells were isolated from six testosterone-exposed males and three control males and subjected to an hCG (Chorulon, Intervet, Chile) challenge. Approximately 50 g of testis tissue were subjected to enzymatic dispersion with 0.25 mg/ml of collagenase (type I, Gibco) at 37 °C for 15 min in a shaking bath to isolate interstitial cells. Interstitial cells were then filtered through gauze to remove fragments of seminiferous tubules. Leydig cells were purified from the crude interstitial fraction on a discontinuous gradient of Percoll prepared in HEPES buffer, pH 7.4, as described by *Anakwe et al. (1985)*. Briefly, 20 ml of a 90% Percoll (Sigma) solution were layered under 20 ml of a 40% Percoll solution in a 50 ml conical tube. Interstitial cells were layered on top of the gradient in M199 and centrifuged for 15 min at 800 g. The Leydig cell fraction at the interface of the two Percoll solutions was aspirated off, diluted with M199, and collected by centrifugation at 600 g for 10 min. The cell pellet was resuspended; the process was

repeated until no cell aggregates were visible. The isolated Leydig cells were collected by centrifugation, washed two times with M199, and then suspended in 5 ml M199. Leydig cell number was established using a hemocytometer and cell viability was assessed by Trypan Blue exclusion. Leydig cell purity was confirmed by a histochemical reaction for 3BHSD and immunocytochemistry for P450c17 enzyme using a polyclonal rabbit anti-bovine antibody (*Peterson et al. 2001*) donated by Dr Alan J Conley (University of California School of Veterinary Medicine, Davis, USA).

Purified Leydig cells ( $1 \times 10^6$ ) were maintained in a suspension culture at 34 °C under 5% CO<sub>2</sub>–95% air for 12 h. Cell suspensions were washed and then incubated with or without 1 IU/ml of hCG for 24 h (*Cheng et al. 2003*). Leydig cells were then washed twice with PBS. For total RNA isolation, cells were lysed using the RNA extraction kit (Invitek) according to the manufacturer's instructions. All procedures were performed in duplicates. For the determination of RNA yield and its quality, DNase treatment (carried out in a 5 µl volume), RT, and real-time PCR were carried out using the procedures described above. RT was performed with 250 ng of total RNA in a final volume of 20 µl.

#### **Hormone measurements**

Plasma LH concentrations were determined by RIA using ovine radio-iodinated LH (LER 1374-A, provided by Dr Leo E Reichert, Jr), ovine antiserum CSU-204 (provided by Dr Gordon Niswender), and ovine LH standard oLH-S25 (provided by NIADDK, Bethesda, MA, USA) in 200 µl duplicates, following the previously described procedures (*Recabarren et al. 1996*). The minimal detectable LH dose, defined as 90% of the buffer control, was 0.1 ng/ml and the intra- and interassay coefficients of variation (CVs) were 5 and 12% respectively. Plasma testosterone concentrations were determined by RIA using commercial kits validated for ovine plasma (DSL, Webster, TX, USA). The minimal detectable limit of testosterone assay corresponding to 90% of the buffer control was 0.05 ng/ml and the intra- and interassay CVs were 3 and 7% respectively.

#### **Statistical analysis**

Results from the GNRH analog test at each age were analyzed by ANOVA for repeated measures and comparisons of the means with the Newman–Keuls test using the GB Stat v.5 program. LH and testosterone responses during the first 3 h of the test and during the entire experiment (48 h) were converted to AUC using the trapezoidal formula. These data were analyzed by ANOVA for repeated measures with treatment (control *versus* testosterone) as the main factor and age (20 and 30 weeks of age) as the repeated-measures factor, using the GB Stat version 6.5 statistical program. Pairwise *post hoc* comparisons were made with the Dunnett test using the GB Stat v.5 program.

Pearson's correlation was made between total AUC of testosterone in males of 30 weeks of age and LHR mRNA expression to characterize the association between both variables.

The expression level of mRNA is given in relation to the expression level of the housekeeping gene  $\beta$ -actin. The data were analyzed using unpaired Student's *t*-test or the Mann–Whitney *U* nonparametric test and a two-way ANOVA, whenever necessary, using the GraphPad Prism 4.0 Software (GraphPad, San Diego, CA, USA). For all tests,  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Data are given as mean or median  $\pm$  S.E.M. or S.D. as indicated in the figures.

## Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

## Funding

This work was supported by Fondecyt grants 1050915 and 1090031. The participation of Dr Vasantha Padmanabhan in this work was in the frame of the Fondecyt International Cooperation Project 1090031. The participation of Dr Ralf Einspanier and Dr Pedro P Rojas-García was supported by DGF 444CHL 113/7/0-1.

## Acknowledgements

We are grateful to Drs G D Niswender, L E Reichert Jr, and A F Parlow for providing reagents for the ovine LH RIA; Dr José Cox for the use of his laboratory facilities to surgically collect the testis; Drs Jenny Schön and Christopher Gabler (Department of Veterinary Biochemistry, Freie Universität Berlin, Germany) for their advice in the RT-PCR; Dr Ana Maria Ronco for her advice in Leydig cell culture; and the Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD) for the donation of the Biophotometer. Part of this work was presented at Endo 2010, June 19–22, San Diego, USA.

## References

- Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, Colman RJ & Kemnitz JW 1998 Insights into the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies of prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **9** 62–67. (doi:10.1016/S1043-2760(98)00019-8)
- Anakwe OO, Murphy PR & Moger WH 1985 Characterization of  $\beta$ -adrenergic binding sites on rodent Leydig cells. *Biology of Reproduction* **33** 815–826. (doi:10.1095/biolreprod33.4.815)
- Bergendahl M & Veldhuis JD 2001 Is there a physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? III. Luteinizing hormone heterogeneity: a medical physiologist's perspective *Human Reproduction* **16** 1058–1064. (doi:10.1093/humrep/16.6.1058)
- Cabrera MS, Vogiatzi MG & New MI 2001 Long term outcome in adult males with classic congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** 3070–3078. (doi:10.1210/jc.86.7.3070)
- Castro-Fernández C, Olivares A, Söderlund D, López-Alvarenga JC, Zambrano E, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A & Méndez JP 2000 A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85** 4603–4610. (doi:10.1210/jc.85.12.4603)
- Cheng J, Fu J-L & Zhou Z-C 2003 The inhibitory effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Toxicology* **187** 139–148. (doi:10.1016/S0300-483X(03)00063-5)
- Ciccione NA & Kaiser UB 2009 The biology of gonadotroph regulation. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* **16** 321–327. (doi:10.1097/MED.0b013e32832d88fb)
- Clarke IJ, Cummins JT, Crowder ME & Nett TM 1987 Pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone in relation to changes in pituitary and plasma luteinizing hormone in ovariectomized-hypothalamus disconnected ewes. I. Effect of changing frequency of gonadotropin-releasing hormone pulses. *Biology of Reproduction* **37** 749–754. (doi:10.1095/biolreprod37.4.749)
- Evans NP, Bramley TA, McNeilly JR & Webb R 1997 Extra- and intracellular effects of divergent selection for pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone in prepubertal ram lambs. *Biology of Reproduction* **57** 128–133. (doi:10.1095/biolreprod57.1.128)
- Falhammer H, Nyström HF, Ekström U, Granberg S, Wedell A & Thorén M 2012 Fertility, sexuality and testicular adrenal rest tumors in adult males with congenital adrenal hyperplasia. *European Journal of Endocrinology* **166** 441–449. (doi:10.1530/EJE-11-0828)
- Foster DL, Mickelson IH, Ryan KD, Coon RGA, Drongowski RA & Holt JD 1978 Ontogeny of pulsatile luteinizing hormone and testosterone in male lambs. *Endocrinology* **102** 1137–1146. (doi:10.1210/endo-102-4-1137)
- Katt JA, Duncan JA, Herbon L, Barkan A & Marshall JC 1985 The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* **116** 2113–2115. (doi:10.1210/endo-116-5-2113)
- Maliqueo M, Lara HE, Sánchez F, Echiburú B, Crisosto N & Sir-Petermann T 2013 Placental steroidogenesis in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* **166** 151–155. (doi:10.1016/j.ejogrb.2012.10.015)
- Manikkam M, Thompson RC, Herkimer C, Welch KB, Flak J, Karsch FJ & Padmanabhan V 2008 Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess on pre- and postnatal gonadotropin regulation in sheep. *Biology of Reproduction* **78** 648–660. (doi:10.1095/biolreprod.107.063347)
- New MI 2001 Factors determining final height in congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* **14** (Suppl 2) 933–937.
- Nimkarn S, Lin-Su K & New MI 2009 Steroid 21 hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **38** 699–718. (doi:10.1016/j.ecl.2009.08.001)
- Olivares A, Méndez JP, Cárdenas M, Oviedo N, Palomino MA, Santos I, Perera-Marín G, Gutiérrez-Sagal R & Ulloa-Aguirre A 2009 Pituitary–testicular axis function, biological to immunological ratio and charge isoform distribution of pituitary LH in male rats with experimental diabetes. *General and Comparative Endocrinology* **161** 304–312. (doi:10.1016/j.ygcen.2008.12.021)
- Olivares A, Méndez JP, Zambrano E, Cárdenas M, Tovar A, Perera-Marín G & Ulloa-Aguirre A 2010 Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat model of diet-induced obesity. *General and Comparative Endocrinology* **166** 356–364. (doi:10.1016/j.ygcen.2009.12.007)
- Olster DH & Foster DL 1986 Control of gonadotropin secretion in the male during puberty: a decrease in response to steroid inhibitory feedback in absence of an increase steroid independent drive in the sheep. *Endocrinology* **118** 2225–2234. (doi:10.1210/endo-118-6-2225)
- Padmanabhan V, Manikkam M, Recabarren S & Foster D 2006 Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic dysfunction in the female. *Molecular and Cellular Endocrinology* **246** 165–174. (doi:10.1016/j.mce.2005.11.016)
- Perera-Marín G, Murcia C & González-Padilla C 2007 Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: characterization and physiological relevance. *Animal Reproduction Science* **101** 187–207. (doi:10.1016/j.anireprosci.2007.03.011)
- Peterson JK, Moran F, Conley AJ & Bird IM 2001 Zonal expression of endothelial nitric oxide synthase in sheep and rhesus adrenal cortex. *Endocrinology* **142** 5351–5363. (doi:10.1210/en.142.12.5351)
- Recabarren SE, Urrucelqui A, Robbiano M, Lobos A, Orellana P & Parilo J 1995 Effect of arginine and ornithine infusions on secretion of the growth hormone in prepubertal ewes. *Archivos de Medicina Veterinaria* **27** 99–104.

- Recabarren SE, Escobar A, Lobos A, Recabarren MP & Parilo J** 1996 Luteinizing hormone pulse frequency is increased by arginine infusion in prepubertal sheep. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* **104** 74–79. (doi:10.1055/s-0029-1211425)
- Recabarren SE, Rojas-García PP, Recabarren MP, Alfaro VH, Smith R, Padmanabhan V & Sir-Petermann T** 2008a Prenatal testosterone excess reduces sperm count and motility. *Endocrinology* **149** 6444–6448. (doi:10.1210/en.2008-0785)
- Recabarren SE, Smith R, Ríos R, Maliqueo M, Echiburú B, Codner E, Cassorla F, Rojas P & Sir-Petermann T** 2008b Metabolic profile in sons of women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93** 1820–1826. (doi:10.1210/jc.2007-2256)
- Recabarren SE, Recabarren M, Rojas-García PP, Cordero M, Reyes C & Sir-Petermann T** 2012 Prenatal exposure to androgen excess increases LH pulse amplitude during postnatal life in male sheep. *Hormone and Metabolic Research* **44** 688–693. (doi:10.1055/s-0032-1316291)
- Reisch N, Flade L, Scherr M, Rottenkolber M, Pedrosa Gil F, Bidlingmaier M, Wolff H, Schwarz HP, Quinkler M, Beuschlein F et al.** 2009 High prevalence of reduced fecundity in men with Congenital Adrenal Hyperplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **94** 1665–1670. (doi:10.1210/jc.2008-1414)
- Robinson J, Hastie P, Shah A, Smith A & Evans N** 2011 Developmental programming: prenatal androgen exposure alters the gonadotroph population of the ovine pituitary gland. *Journal of Neuroendocrinology* **24** 434–442. (doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02264.x)
- Rojas-García PP, Recabarren MP, Sarabia L, Schön J, Gabler Ch, Einspanier R, Maliqueo M, Sir-Petermann T, Rey R & Recabarren SE** 2010 Prenatal testosterone excess alters Sertoli and germ cell number and testicular FSH receptor expression in rams. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **299** E998–E1005. (doi:10.1152/ajpendo.00032.2010)
- Rojas-García PP, Recabarren MP, Sir-Petermann T, Rey R, Palma S, Carrasco A, Perez-Marin CC, Padmanabhan V & Recabarren SE** 2013 Altered testicular development as a consequence of increase number of sertoli cell in male lambs exposed prenatally to excess testosterone. *Endocrine* **43** 705–713. (doi:10.1007/s12020-012-9818-5)
- Sakurai H, Adams BM & Adams TE** 1997 Concentration of gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in pituitary tissue of orchidectomized sheep: effect of passive immunization against gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Animal Science* **75** 189–194.
- Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Perez-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. (doi:10.1093/humrep/17.10.2573)
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E & Main K** 2001 Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction* **16** 972–978. (doi:10.1093/humrep/16.5.972)
- Stanislaus D, Pinter JH, Janovick JA & Conn PM** 1998 Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotropin-releasing hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology* **144** 1–10. (doi:10.1016/S0303-7207(98)00126-9)
- Tilbrook AJ, de Kretser DM, Cummins JT & Clarke IJ** 1991 The negative feedback effects of testicular steroids are predominantly at the hypothalamus in the ram. *Endocrinology* **129** 3080–3092. (doi:10.1210/endo-129-6-3080)
- Turzillo AM, Di Gregorio DB & Nett TM** 1995a Messenger ribonucleic acid for gonadotropin-releasing hormone receptor and numbers of gonadotropin-releasing hormone receptors in ovariectomized ewes after hypothalamic-pituitary disconnection and treatment with estradiol. *Journal of Animal Science* **73** 1784–1788.
- Turzillo AM, Juengel JL & Nett TM** 1995b Pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) increases concentrations of GnRH receptor messenger ribonucleic acid and numbers of GnRH receptors during luteolysis in the ewe. *Biology of Reproduction* **53** 418–423. (doi:10.1095/biolreprod53.2.418)
- Vanselow J, Fürbass R, Rehbock F, Klautschek G & Schwerin M** 2004 Cattle and sheep use different promoters to direct the expression of the aromatase cytochrome P450 encoding gene, Cyp19, during pregnancy. *Domestic Animal Endocrinology* **27** 99–114.
- Veiga-Lopez A, Steckler TL, Abbott DH, Welch KB, MohanKumar PS, Phillips DJ, Refsal K & Padmanabhan V** 2011 Developmental programming: impact of excess prenatal testosterone on intrauterine fetal endocrine milieu and growth in sheep. *Biology of Reproduction* **84** 87–96. (doi:10.1095/biolreprod.110.086686)
- Wheaton JE, Godfrey RW & Plasma LH** 2003 FSH, testosterone, and age at puberty in ram lambs actively immunized against an inhibin  $\alpha$ -subunit peptide. *Theriogenology* **60** 933–941. (doi:10.1016/S0093-691X(03)00104-3)

---

Received 10 January 2013

First decision 30 January 2013

Revised manuscript received 21 March 2013

Accepted 10 April 2013

---

#### **4. OTRAS APORTACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DIRECTAMENTE DE LA TESIS DOCTORAL**

##### **1. Evaluar cómo la exposición prenatal a testosterona puede afectar a una serie de variables relacionadas con el parto de hembras ovinas Suffolk-Down y sus crías bajo condiciones de estabulación y medioambientales controladas.**

Las hembras con exposición prenatal fueron tratadas con testosterona propionato durante una etapa crítica del desarrollo del feto, lo que equivale a un cambio en el ambiente intrauterino que deja importantes efectos en el recién nacido. El mayor impacto en los parámetros analizados se observó en las hembras nacidas de madres EPT-P1 (60 mg de testosterona, dos veces por semana, del día 30 al 90 de gestación), las cuales, además de la masculinización de los genitales externos, exhibieron menor peso al nacimiento y menor concentración de tiroxina a las ocho horas postparto que las hembras control y machos. Las hembras nacidas de madres EPT-P2 también presentaron masculinización de los genitales externos, pero sin exhibir menor peso al nacimiento ni menor concentración de tiroxina que las hembras control. Los machos nacidos de madres control y madres EPT no se diferenciaron entre sí en ninguno de los parámetros estudiados. Indudablemente, la aparición de aspectos fenotípicos masculinos en una hembra denota un fuerte efecto del tratamiento con testosterona sobre el desarrollo genital. Los resultados en relación al parto muestran que los nacimientos en las hembras control se concentraron en dos intervalos horarios que abarcaron entre la medianoche y las seis de la mañana y entre las seis de la mañana y el mediodía. Cerca del 70% de los partos ocurrieron entre esos horarios. El horario de inicio del parto podría estar en relación al ritmo circadiano de cortisol. El cortisol plasmático empieza a aumentar en las primeras horas de la madrugada en varias especies para alcanzar un máximo alrededor de las 07:00-08:00 h (Cagnacci y col. 1998, Hernandez y col. 2000). El ritmo circadiano de cortisol en los fetos previo al parto es desconocido, pero se ha evidenciado que los fetos de ovejas exhiben un ritmo de cortisol (Parraguez y col. 1989). Lo observado en cuanto al horario de los partos es similar a lo encontrado en humanos. Estudios realizados en mujeres a punto de parir indican que existe una mayor incidencia de partos en la madrugada y al anochecer (Cagnacci y col. 1998, Anderka y col. 2000). Sin embargo, la distribución horaria de los partos en las madres EPT-P2 fue más tardía en comparación con las hembras control. La razón de ese retraso y

---

desplazamiento desde las primeras horas de la mañana hasta el horario de la tarde es desconocida, pero podría estar relacionada con el ritmo circadiano de cortisol del feto. Cabe hacer notar que no se encontró una relación entre el sexo de la cría y la hora del parto. En las hembras control, el 59,4% de los partos fue parto único, mientras las hembras EPT fue mayormente de mellizos. La frecuencia de la obtención de mellizos es un carácter racial y, por tanto, de base genotípica, si bien se ha establecido que influyen en diversos grados factores ambientales, sobre todo la alimentación. No obstante, en los ovinos la heredabilidad ( $h^2$ ) de nacimientos gemelares es, en general, baja (10-15%). Las madres de nuestro estudio eran todas múltiparas. Si se toman en cuenta todas las madres, el porcentaje de madres melliceras sobrepasa levemente el 50%. El tratamiento con testosterona a las madres no debería influir en el número de crías gestadas ya que la exposición a un exceso de testosterona se inicia a los 30 días postencaste, aunque Wolf y col.(2002) observaron que en ratas la EPT puede llevar a efectos tóxicos con reducción en el tamaño de la camada y la viabilidad de los embriones. Además, el sexo de las crías nacidas de las hembras control es 57% hembras y 43% machos. Si se toma en consideración el total de crías, independiente del tipo de madre, el porcentaje de machos fue mayor que el de hembras (55% versus 45%), producto de que las madres con los protocolos de exposición a testosterona parieron más machos que hembras. En este caso, se debe considerar que el tratamiento tampoco influiría en el sexo de la cría ya que éste se establece en el momento de la fecundación, a menos que la exposición prenatal a testosterona determinara una mayor mortalidad embrionaria de hembras a partir de los 30 días post-gestación. Sin embargo, el seguimiento ecográfico no mostró signos de muerte embrionaria, por lo que los resultados en relación al sexo serían determinados por el azar.

Las hembras nacidas de madres EPT-P1 y -P2 presentaron masculinización de los genitales externos con la presencia de pene y un escroto vacío de menor tamaño que el de los machos y con una distancia ano-meato urinario semejante a los machos. Estos resultados, con dos protocolos diferentes de exposición prenatal a testosterona, confirman lo observado por otros autores. Se ha descrito que hembras nacidas de ovejas tratadas con 200 mg de testosterona entre los 30 y 90 días de gestación nacen con genitales completamente virilizados, con un pseudopene y una bolsa escrotal vacía en lugar de una apertura vaginal (Herbosa y col. 1995, Robinson y col. 1999). Las hembras masculinizadas presentan ovarios y un útero con terminación ciega pero sin vagina (Unsworth y col. 2005). Se ha

---

establecido además, que el efecto virilizante observado en los genitales externos se acompaña de conductas masculinas en la hembra adulta (Orgeur 1995), de múltiples alteraciones neuroendocrinas y ováricas como el hipergonadotropismo (aumento en la secreción de hormona luteinizante, LH), la sensibilidad reducida al retrocontrol positivo y negativo de estradiol (Sharma y col. 2002, Savabieasfahani y col. 2005, Vergara 2007), el desarrollo de ovarios multifoliculares (Padmanabhan y col. 2006, Rojas-García y col. 2006), así como alteraciones en el perfil de LH y estradiol en la fase folicular del ciclo estral (Vergara 2007). En contraste, otros estudios han mostrado que las hembras nacidas de madres tratadas con testosterona entre los 60-90 días de gestación (segunda mitad del período crítico) nacen con genitales externos normales, pero tienen la postura urinaria masculinizada (Clarke y col. 1976, Herbosa y col. 1995), lo que permite concluir que el período crítico para la masculinización de los genitales externos ocurre entre los 30 y 60 días de gestación al igual que la masculinización del sistema nervioso central (SNC). Los efectos de la EPT en los genitales externos femeninos se han descrito en otras especies. En ratas, Wolf y col.(2002) encontraron que la administración prenatal de propionato de testosterona condujo a la formación de genitales externos masculinos, con la distancia ano-genital aumentada. En humanos, las niñas expuestas prenatalmente a altos niveles de andrógenos, como en el caso de la hiperplasia suprarrenal congénita, presentan virilización de los genitales externos al nacimiento, incluyendo clitoromegalia y fusión de los labios (Nimkarn y New 2007, New 2004). El efecto de los andrógenos prenatales sobre el tracto reproductivo en la hembra se debería a que la testosterona y dihidrotestosterona mantienen el sistema de conductos de Wolff y promueven el crecimiento y desarrollo de glándulas accesorias y genitales externos de sexo masculino, mientras que la regresión del tracto reproductor femenino es principalmente dependiente de la hormona antimülleriana (AMH) que se secreta desde la célula de Sertoli fetal (Josso y col. 2006, Wolf y col. 2002). La exposición prenatal a testosterona influyó en el peso de nacimiento de las crías hembras de las madres EPT-P1.

Las hembras recién nacidas EPT-P1 pesaron menos que las hembras control, que las hembras EPT-P2 y que los machos. Este fenómeno estaría asociado a la dosis y duración de la exposición a testosterona, dado que sólo se observa con el tratamiento EPT-P1. Estos resultados concuerdan con el estudio de Manikkam y col.(2004) quienes observaron que el tratamiento con dosis de 100 mg de testosterona propionato dos veces por semana entre los



---

30 y 90 días de gestación redujo el peso corporal y talla de los recién nacidos de ambos sexos y la circunferencia torácica de las hembras. En humanos, se ha propuesto que el peso al nacimiento es un indicador de la aparición de diferentes patologías en la edad adulta por los efectos “programadores” de esta condición (Eriksson y col., 2001, Barker 2005, Barker y col., 2006, Carlsen y col., 2006). Resultados en recién nacidos humanos sugieren que la exposición prenatal a testosterona como aquella que se observa en madres con el síndrome de ovario poliquístico tiene como resultado recién nacidos con menor peso, lo que se conoce como niños pequeños para la edad gestacional (PEG) (Sir-Petermann y col. 2002). Se ha atribuido también que el menor peso sería consecuencia de una alteración en la concentración de IGF-1 en el feto como resultado de la exposición a la testosterona (Padmanabhan y col. 2006). Por otro lado, en el estudio de Dwyer y col.(2006) se observó que el peso al nacimiento de los corderos estaba relacionado con el tamaño de la camada. Las gestaciones triples eran más cortas que las gestaciones únicas o gemelares. El peso al nacimiento de los corderos disminuía con cada aumento en el número de corderos en la camada. Sin embargo, en el presente estudio sólo las hembras EPT-P1 tuvieron un peso corporal menor al de los machos y hembras de otros grupos, pero este fenómeno no estaría relacionado con el tamaño de la camada. Los efectos de un bajo peso al nacimiento en ovinos se pueden evidenciar en sus desempeños productivos en la vida adulta, como, por ejemplo, reducción en el número de fibras musculares, lo que podría afectar el contenido y calidad de la carne (Fahey y col. 2005). Sin embargo, otros estudios le atribuyen un efecto reductor en el contenido de grasa subcutánea o perirrenal o pélvica al tratamiento con testosterona prenatal, lo que podría contribuir a una mejor calidad de la carcasa en el animal al momento de su faena (DeHaan y col. 1987). En relación al cortisol plasmático, los resultados muestran que no hubo diferencia en los niveles plasmáticos al nacimiento entre los tres grupos. Estos resultados concuerdan con los de Manikkam y col.(2004) quienes no encontraron diferencias significativas en los niveles del cortisol circulantes entre las borregas controles y las tratadas prenatalmente con testosterona. En el presente estudio no se observó una correlación entre peso al nacimiento y las concentraciones de cortisol, tomando en cuenta el total de recién nacidos o separados según el tratamiento de la madre. No obstante lo anterior, si se usa el valor de cortisol promedio de cada grupo como un límite de corte, se encontró una relación inversa entre peso al nacimiento y peso corporal en los recién nacidos EPT-P1. Esto ocurre sólo si se separa por cortisol y esta correlación no

---

se repite en los recién nacidos de hembras control o nacidos de madres EPT-P2. En recién nacidos humanos se ha determinado que aquellos niños pequeños para la edad gestacional tienen mayor concentración de cortisol en la sangre del cordón umbilical que los niños adecuados para la edad gestacional (Economides y col. 1988), lo cual sugiere que habría una relación entre el peso al nacimiento y las concentraciones de cortisol. Si se considera que el menor peso al nacimiento es el resultado final del crecimiento fetal en el útero, el cual depende principalmente de la disponibilidad de nutrientes, es posible suponer que hembras nacidas de madres EPT-P1 tuvieron menor disponibilidad de nutrientes que las hembras nacidas de hembras EPT-P2. Las razones de este fenómeno se desconocen, pero se ha demostrado en la oveja preñada que un aumento del cortisol induce una reducción en el número de células binucleadas de la placenta productoras del lactógeno placentario (Ward y col. 2002), lo cual puede comprometer la disponibilidad del lactógeno placentario necesario para el crecimiento fetal por sus efectos en la partición de nutrientes y en las concentraciones de IGF-1 fetal (Braun y col. 2007). El cortisol es un factor relevante para la maduración fetal (Fowden y col. 1998, Dwyer y col. 2006) y para el aumento de la producción de triyodotironina (T3) en el feto. Esto último prepara al feto para el aumento en la demanda metabólica y la termogénesis que ocurren al nacimiento (Dwyer y col. 2006). A su vez, las hormonas tiroideas promueven el desarrollo fetal y actúan como signos de disponibilidad de energía (Fowden y Forhead 2004). En la oveja, las hormonas tiroideas presentes en el plasma fetal derivan principalmente de fuentes fetales (Fowden y Forhead 2004). La triyodotironina se produce a partir de la tiroxina (T4) en el tejido adiposo pardo por la enzima 5'-monodeyodinasa, cuya actividad aumenta durante los últimos meses de preñez. Las concentraciones de T3 no se diferenciaron entre los grupos, mientras que la concentración plasmática de T4 fue menor en las hembras nacidas de madres EPT-P1. Mellor y Pearson (1977) describieron una menor concentración de T4 en recién nacidos durante las primeras 24 horas postparto con restricción del crecimiento fetal por disminución del tamaño de la placenta de las ovejas madres. En un estudio de Dwyer y col.(2006), la T3 plasmática se relacionó significativamente con el peso al nacimiento durante las primeras 24 horas de vida, pero no después de esto. Los corderos de mayor peso tenían concentraciones plasmáticas mayores de T3 y T4 (Dwyer y col. 2006). Esta asociación entre peso al nacimiento y T4 concuerda con nuestros datos. En primer lugar porque, a lo menos en las hembras, un alto valor de T4 coincidió con un peso mayor. Y en

---

segundo lugar porque las hembras recién nacidas EPT-P1 presentaron una concentración promedio de T4 más baja que el resto de los grupos, y esas hembras tuvieron el menor peso promedio al nacimiento, aun cuando no encontramos una correlación directa entre ambas variables como en las hembras control. Las concentraciones de T3 y T4 fueron iguales entre los otros grupos ya que no diferían en el peso al nacer, lo que significaría que metabólicamente no habría diferencia entre los grupos. Este estudio confirma la hipótesis planteada en relación a que las crías hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona durante su gestación exhiben diferencias en parámetros biométricos y endocrinos, tales como: distancia entre ano-meato urinario, peso al nacimiento y concentraciones de tiroxina (T4) en relación a las hembras nacidas de madres controles. En consecuencia, se puede inferir que el mayor impacto de la exposición prenatal a testosterona se produce en la hembra recién nacida. Las hembras presentan virilización de los genitales externos y dependiendo de la dosis y la duración de la EPT presentan menor peso al nacimiento y una menor concentración plasmática de T4. Sin embargo, en los otros parámetros biométricos y hormonales estudiados no se encontraron diferencias estadísticas entre crías de madres control y crías nacidas de madres expuestas a un exceso de testosterona, lo cual descarta efectos de la testosterona en la madre. Esto sugiere que el mayor impacto del exceso de testosterona en el feto y recién nacido se relaciona con la masculinización de las hembras. Aparentemente, la EPT no influiría en los parámetros estudiados en machos EPT, sin embargo, efectos de largo plazo no se pueden descartar.

## **2. Evaluar la proliferación y apoptosis mediante marcadores específicos en células de Sertoli y células germinales en machos ovinos de 4 (recién nacido) y 24 (prepuberal) semanas de edad tratados con EPT.**

La proliferación celular se evaluó mediante la expresión del antígeno Ki-67 en las células de Sertoli y germinales presentes en los cordones seminíferos de machos-C y machos-T de 4 semanas y 24 semanas. La cuantificación de células de Sertoli y células germinales negativas y positivas para Ki-67 se realizó en 10 áreas de 250 $\mu$ m cada una, con un aumento de 40X. Los resultados se expresaron como porcentaje promedio de células Ki-67 (+)/número total de células/área.

Para detectar apoptosis, se utilizó el ensayo de TUNEL. Se cuantificaron células de Sertoli y células germinales negativas y positivas para TUNEL en 10 áreas de 250 $\mu$ m con un aumento de 40X. Los datos se expresaron como porcentaje promedio de células TUNEL (+) por número total de células por área.

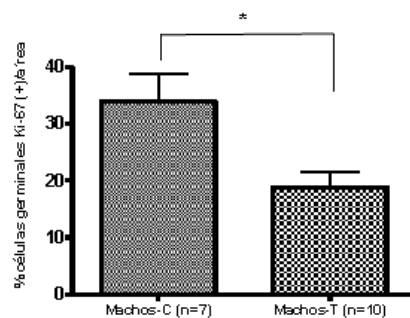
### Proliferación.

En machos de 4 semanas de edad se observó tinción positiva, representativa de células en proliferación, localizada en el núcleo de las células de Sertoli y células germinales (gonocitos) en machos-C y machos-T. En los gonocitos de machos-T, el porcentaje de células en proliferación fue significativamente superior que en los machos-C. No se observaron diferencias en la tasa de proliferación celular en células de Sertoli. En machos de 24 semanas, para el antígeno Ki-67, se observó tinción positiva en el núcleo de células de Sertoli y células germinales. En las células de Sertoli, como en células germinales, no se presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Tabla 1 y 2, Figura 2).

**Tabla 1.** Porcentaje de proliferación en células de Sertoli y células germinales en machos-C y machos-T de 4 semanas de edad.

	Machos- C (n=7)	Machos- T (n=10)	P value
% células de Sertoli Ki-67 (+)/área	5.3	5.5	0.88
% células germinales (Gonocitos) Ki-67 (+)/área	34	19	0.01 *
Machos-C= Controles Machos-T= Androgenizados * $p < 0.05$			

**Figura 2.** Porcentaje de proliferación en células germinales en machos-C y machos-T de 4 semanas de edad.



**Tabla 2.** Porcentaje de proliferación en células de Sertoli y células germinales en machos-C y machos-T de 24 semanas de edad.

	Machos- C (n=3)	Machos- T (n=5)	P value
% células de Sertoli Ki-67 (+)/área	0.9	2.2	0.45
% células germinales Ki-67 (+)/área	7.8	12.0	0.57
Machos-C= Controles Machos-T= Androgenizados			

En machos de 24 semanas se observaron células TUNEL positivas en el núcleo de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas redondas. No se detectó apoptosis en células de Sertoli ni en espermátidas elongadas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Porcentaje de apoptosis en células de Sertoli y células germinales en machos-C y machos-T de 4 semanas de edad.

	Machos- C (n=7)	Machos- T (n=9)	P value
% células de Sertoli TUNEL (+)/área	0	0	-
% células germinales TUNEL (+)/área	0.9	2.6	0.86

**Tabla 4.** Porcentaje de apoptosis en células de Sertoli y células espermatogénicas de machos-C y machos-T de 24 semanas de edad

	Machos- C (n=5)	Machos- T (n=8)	P value
% células de Sertoli TUNEL (+)/área	-	-	-
% células germinales TUNEL (+)/área	0.48	1.22	0.04*
% espermatocitos TUNEL (+)/área	0.49	1.90	0.62
% espermátidas redondas TUNEL (+)/área	0.22	0.16	0.45
% espermátidas elongadas TUNEL (+)/área	-	-	-
Machos-C= Controles Machos-T= Androgenizados *p < 0.05			

---

Al comparar el índice apoptótico en las células germinales, se observó una mayor fragmentación del DNA en machos-T comparado con los machos-C ( $p=0.04$ ) (Tabla 4).

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje apoptótico de los diferentes tipos de células espermatogénicas entre ambos grupos.

### 3. Evaluar la expresión de genes que regulan la proliferación de células de Sertoli en testículo fetal y postnatal de machos ovinos con EPT.

Los niveles de expresión del ARNm de SOX9 fue mayor en machos-T fetales (Figura 1). La expresión de FGF9 fue muy bajo. En machos de 4 semanas, la expresión del ARNm de SOX-9 fue similar en ambos grupos. No se cuantificó FGF9. En machos de 24 semanas, la expresión de SOX9 fue mayor en el testículo de machos-T en comparación a machos-C (Figura 3).

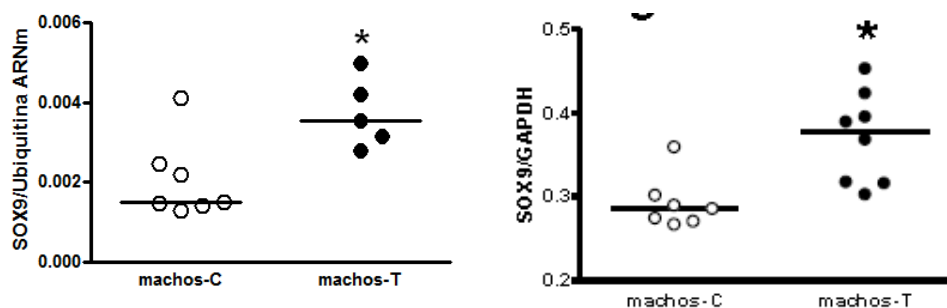


Figura 3. Expresión de SOX-9 en machos control y machos tratados

### 4. Evaluar en machos ovinos con exposición prenatal a testosterona la expresión de AMH y la expresión de los receptores de andrógenos, FSH y AMH tipo II en la vida prenatal y postnatal (fetal, 4 semanas y 24 semanas de edad).

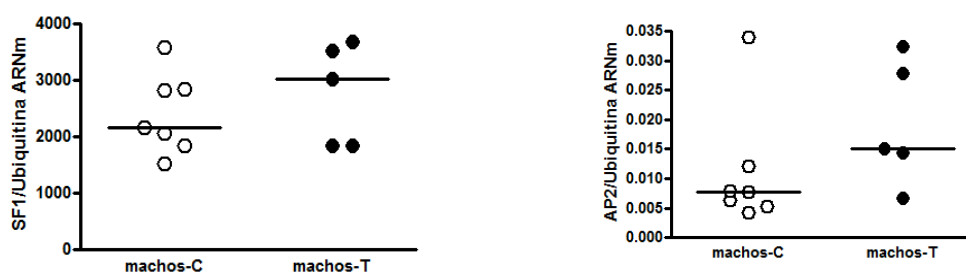
En fetos machos-T la expresión del ARNm de AMH fue mayor ( $P<0.05$ ), mientras que la expresión de la proteína del receptor tipo 2 de AMH (AMHR2) fue menor ( $P>0.05$ ). La expresión del ARNm del receptor de FSH (FSHR), andrógenos (AR), fue mayor en

machos-T. Además, en ambos grupos, se observó inmunoreactividad positiva para AR a nivel de las células de Sertoli y células de Leydig, pero negativo en los gonocitos presentes en los túbulos seminíferos. En ambos grupos, se observó inmunoreactividad (+) para AMHR2 a nivel de los gonocitos, siendo levemente mayor la reactividad en los machos-T.

En machos de 4 semanas, la expresión del ARNm de AMH, AR, y FSHR fue similar en ambos grupos. En machos de 24 semanas no hubo diferencias en la expresión del ARNm del FSHR y de AR entre ambos grupos de machos. La expresión de la proteína del FSHR, AR y AMHR2 fue menor en machos-T. En los testículos de machos-C, se observó inmunoreactividad (+) al AR en células de Sertoli, espermatoцитos y espermatogonias. Sin embargo, en machos-T sólo fueron positivas las células de Sertoli.

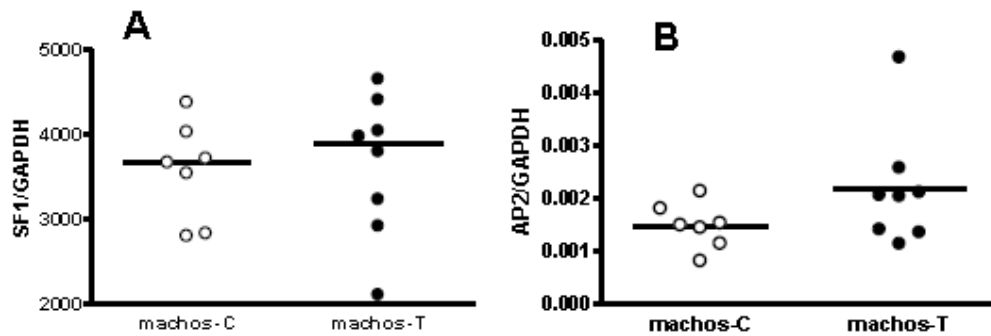
##### **5. Evaluar la expresión y/o fosforilación de factores de transcripción tempranos y dependientes de la vía de señalización de FSH que modulan la expresión de AMH en machos ovinos con EPT a las 4 y 24 semanas de edad.**

En fetos machos, la expresión de los factores de transcripción SF1 y AP2 fue similar en ambos grupos de testículos fetales (Figura 4).



**Figura 4.** Expresión de ARNm de SF1 y AP2 en machos control y machos tratados con 4 semanas de edad.

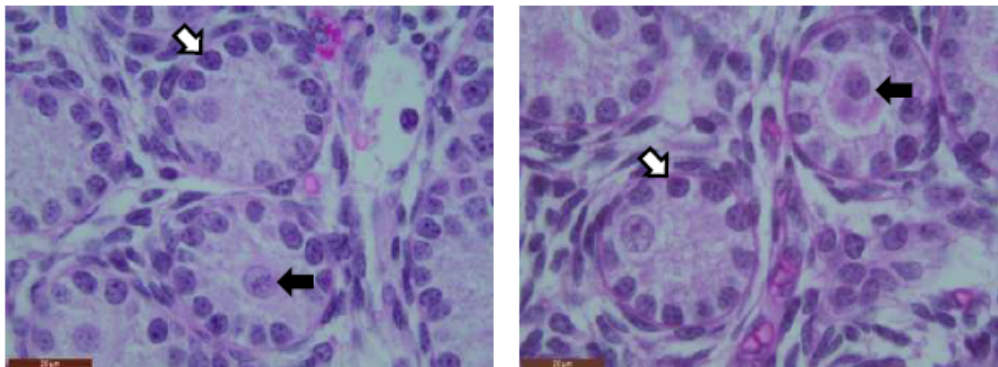
En machos de 4 semanas, la expresión del ARNm de los factores de transcripción SF1, AP2, fue similar en ambos grupos. En machos de 24 semanas, la expresión de SF1, y AP2 fue similar entre ambos grupos (Figura 5).



**Figura 5.** Expresión de ARNm de SF1 y AP2 en machos control y machos tratados con 24 semanas de edad.

### 6. Biometría testicular en machos expuestos a testosterona en su vida fetal.

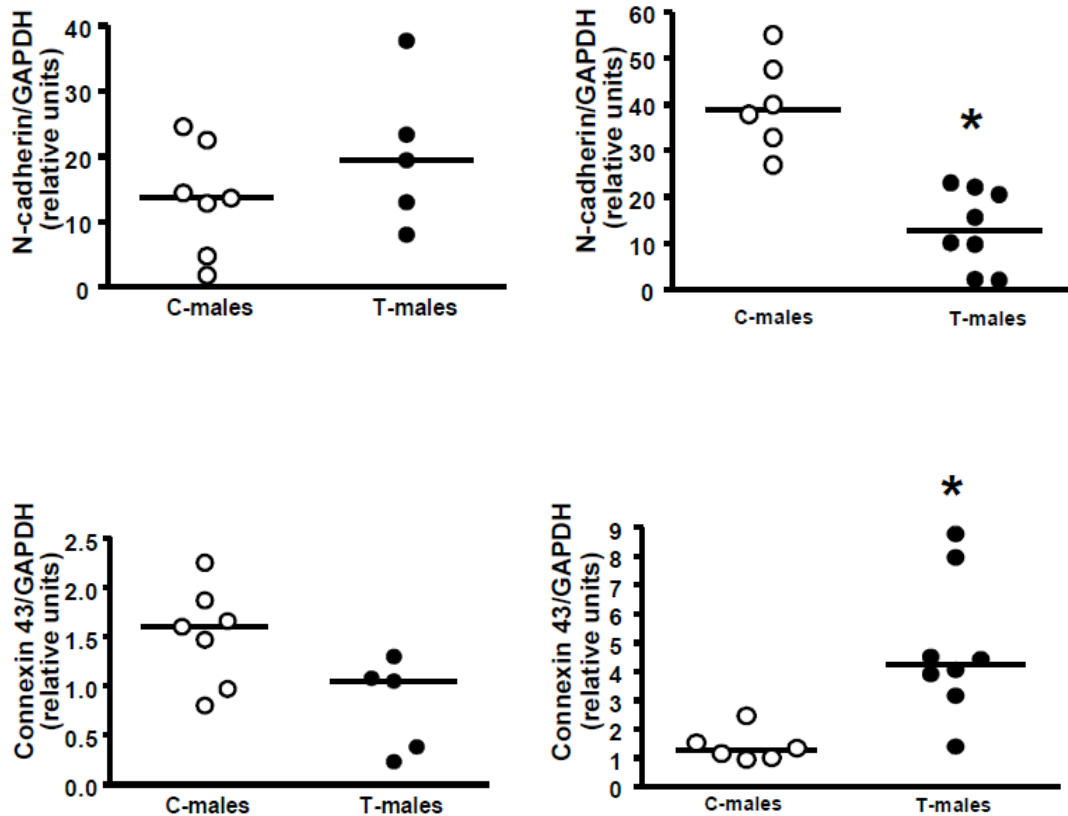
El peso de los testículos fetales de 120 días de gestación fue similar en ambos grupos de machos. El análisis morfométrico de los testículos fetales no mostró diferencias en el número de células de Sertoli, número de espermatocitos, diámetro de los túbulos, y área de los túbulos entre machos controle (machos-C) y machos expuestos a un exceso de testosterona (machos-T) (Figura 6).



**Figura 6.** Fotografía de corte de testículo fetal de macho-C y macho-T. Flecha blanca señala célula de Sertoli y flecha negra a gonocito.

En relación a las proteínas de la barrera hemato-testicular, la expresión de la proteína conexina-43 y N-cadherina fue similar en ambos grupos de testículos fetales. En machos de 24 semanas, en machos-T la expresión de N-cadherina fue menor mientras que la de connexin 43 fue mayor. La figura 7 muestra los resultados en ambos grupos de machos en ambas edades estudiadas.





**Figura 7.** Expresión de N-cadherina y conexina en machos control y tratados con 4 semanas (gráficos de la zona derecha) y 24 semanas (gráficos de la zona izquierda) de edad.

Tanto en machos-C como machos-T, se observó inmunorreactividad (+) para claudina a nivel de los gonocitos.

Postnatal: 4-5 semanas de edad.

El peso corporal y testicular fue similar en ambos grupos de machos. El número de células de Sertoli fue mayor en machos-T pero el número de células germinales no fue diferente entre machos-C y machos-T. Se evaluó además la expresión del receptor de TGFβ1, y la expresión del ARNm de TGFβ1 y 3. Se encontró que la expresión del receptor del TGFβ1 fue menor en machos-T sin diferencias en la expresión de los ligandos.

---

Postnatal: 24 semanas de edad

El peso corporal y testicular fue menor en machos-T ( $P < 0.05$ ), quienes presentaron además un número mayor de células de Sertoli y un menor número de células germinales ( $P < 0.05$ ). Además, los túbulos seminíferos de machos-T tenían un menor diámetro, una menor área y una menor altura del epitelio.

Estos hallazgos y otros citados anteriormente se expusieron en diferentes congresos internacionales o se publicaron (o están en revisión) en revistas científicas por pares:

-Resumen presentado en el European Congress of Endocrinology 2013: **PRENATAL TESTOSTERONE PROGRAMMING: ONTOGENY OF CHANGES IN TESTIS OF FETAL AND PREPUBERTAL MALE SHEEP. Pedro P. Rojas-García, Mónica P. Recabarren, Daniel Sandoval, Albert Carrasco, Romina Fornes, Rodolfo Rey, Teresa Sir-Petermann, and Sergio E. Recabarren.**

-Resumen presentado en la Endocrine Society, 2012: **PRENATAL TESTOSTERONE EXCESS DECREASES FSH LEVELS IN UMBILICAL CORD BLOOD AND MODIFIES THE EXPRESSION OF KEY REPRODUCTIVE FACTORS IN TESTIS OF FETAL MALE LAMBS. Pedro P. Rojas-García, Mónica P. Recabarren, Teresa Sir-Petermann, Rodolfo Rey, Albert Carrasco, Romina Fornes and Sergio E. Recabarren. Endocrine review 33:SUN-59.**

-Resumen presentado en European Congress of Endocrinology 2013: **PRENATAL TESTOSTERONE PROGRAMMING: ONTOGENY OF CHANGES IN TESTIS OF FETAL AND PREPUBERTAL MALE SHEEP. Pedro P. Rojas-García, Mónica P. Recabarren, Daniel Sandoval, Albert Carrasco, Romina Fornes, Rodolfo Rey, Teresa Sir-Petermann, and Sergio E. Recabarren.**

**-IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A TESTOSTERONA SOBRE PARÁMETROS BIOMÉTRICOS Y ENDOCRINOS EN OVEJAS RECIÉN**

---

**NACIDAS. Recabarren S.E., Rojas-García PP, Recabarren MP, Norambuena K, Sir-Petermann T. Archivos Medicina Veterinaria 2009, 41:43-51.**

**-PUBERTY ARISES WITH TESTICULAR ALTERATIONS AND DEFECTIVE AMH EXPRESSION IN RAMS PRENATALLY EXPOSED TO TESTOSTERONE.**

**Rojas-García PP, Perez-Marin C.C., Sir-Petermann T., Carrasco A, Rey R., Recabarren M., Recabarren S.E., Sandoval D., Richter H., Padmanabhan V. Domestic Animal Endocrinology. En revisión.**

---

## 5. DISCUSIÓN

Se planteó un **primer estudio** para analizar los efectos del tratamiento prenatal con andrógenos en diferentes momentos de la gestación sobre la secreción endógena de LH. El presente estudio muestra que los carneros prenatalmente expuestos a T o DHT mostraron una mayor concentración media de LH, un aumento de la amplitud de los pulsos de LH, y un aumento del nadir de LH en comparación con carneros no expuestos. La hipersecreción de la LH es una característica común que se observa en ovejas prenatalmente expuestas a los andrógenos (Manikkam y col., 2008). Las explicaciones probables para estas características del pulso de LH alteradas y sus consecuencias se discuten.

Varios estudios en ovejas y otras especies han demostrado una estrecha relación entre los pulsos de la GnRH en la vasculatura portal y las concentraciones de LH en la circulación periférica (Levine y col., 1982; Clarke and Cummins, 1982; Barrelly col., 1992), por lo tanto, las características de la pulsatilidad de LH pueden reflejar el patrón secretorio de GnRH y las influencias ejercidas sobre la secreción de LH. En el presente estudio, la androgenización prenatal provocó un aumento del patrón de secreción de LH, observado como una mayor concentración media, mayor amplitud y nadir de los pulsos, pero no la frecuencia de los pulsos de LH. La primera posibilidad que surge para explicar tales diferencias es que los niveles basales de testosterona fueron diferentes entre los grupos de carneros estudiados, de modo que la retroalimentación negativa ejercida por la testosterona podría ser menor en machos tratados con T y con DHT. Sin embargo, puede que éste no sea el caso, porque los animales que pertenecían a cualquiera de los grupos mostraron baja y, en la mayoría de los casos, indetectables los niveles de T en las edades estudiadas.

Una posibilidad para analizar es que la androgenización prenatal altere el patrón de secreción de las neuronas de GnRH. En gestaciones normales en ovejas, la exposición de los fetos macho a testosterona de origen gonadal condiciona o programa el patrón secretorio de GnRH, privando al macho de un pico de LH inducido por esteroides, como se observa en hembras (Robinson y col., 2003). Esta defeminización de los pulsos de LH es un efecto estrogénico, mientras que la masculinización del modo tónico de la secreción de GnRH es un efecto androgénico (Wood and Foster, 1998). La falta de pulsos de LH puede ser una consecuencia de alteraciones en el desarrollo de neuronas con receptores de estradiol y que son claves en la regulación de las neuronas GnRH, ya que se ha observado

---

un reducido número de neuronas que responden a estrógenos en el núcleo ventromedial y arcuato del hipotálamo en machos y ovejas expuestas a testosterona prenatalmente (Robinson y col., 2010).

El aporte sináptico a las neuronas GnRH también está bajo los efectos organizacional de los andrógenos, ya que las corderas androgenizadas muestran actividad aferente similar a la de los machos (Robinson y col., 2002), como se observa con neuronas glutamatérgicas que sinapsan con las neuronas GnRH (Jansen y col., 2011). Otras evidencias del efecto reorganizador de los andrógenos sobre el cerebro son claras para mostrar que las áreas del dimorfismo sexual son la consecuencia de acciones androgénicas. Roselli y col. (2007) han demostrado que el núcleo dimórfico sexual ovino (oSDN) en el hipotálamo de la oveja es mayor en machos que en hembras y es organizado por la testosterona prenatal. El exceso experimental de testosterona prenatal hace que el oSDN en hembras sea de tamaño similar a la de los machos, y esto no es debido a la aromatización de T (Roselli y Stormshak, 2010). La región ARC/VMH es importante ya que contiene las neuronas GnRH y también un subconjunto de neuronas que expresan kisspeptina, neuroquinina B y dinorfina, mediadores de los efectos de los esteroides gonadales sobre la GnRH (Cheng y col., 2010). Esta población de células se reduce en las hembras prenatalmente expuestas a T, parecido al patrón exhibido por los machos que normalmente tienen una población más pequeña de estas células (Cheng y col., 2010). Curiosamente, la población de kisspeptina en las neuronas del ARC/VMH no está afectado por la androgenización prenatal, permaneciendo elevada tanto en animales control y en ovejas androgenizadas prenatalmente. La kisspeptina se considera un elemento clave en la secreción de GnRH, ya que estimula la secreción de GnRH (Messenger y col., 2005) y de LH (Caraty y col., 2010). Es necesario realizar nuevos estudios relativos a los efectos de la androgenización prenatal sobre la población neuronal de kisspeptina en carneros, ya que la mayoría de los estudios anteriores se han realizado en hembras tratadas con testosterona en la fase prenatal. En esencia, la información actual se refiere más bien a hembras que fueron androgenizadas prenatalmente y que muestran características similares a los machos.

Pero existe poca información acerca de los parámetros reproductivos en machos prenatalmente expuestos a exceso de andrógenos. Sugerimos que el mecanismo probable que explica la alteración en la secreción de LH en estos animales pueden involucrar un

---

mayor efecto estimulante hacia las neuronas GnRH, con una mayor cantidad de GnRH liberada por pulso, pero el fenotipo de estos estímulos neuronales es desconocido para nosotros hasta ahora.

Otra posibilidad para explicar las características de la secreción de LH en estos animales se basa en la hipófisis. La posibilidad de que los andrógenos prenatales pueden reprogramar el eje pituitario ha sido abordado por Sarma y col. (Sarma y col., 2005) en las ovejas. Estos investigadores demostraron en hembras que el tratamiento fetal con T durante un periodo fijo durante la gestación reduce la capacidad de respuesta de LH posnatal a la retroalimentación negativa del E2, contribuyendo al menos en parte al desarrollo de hipergonadotropismo postnatal. Las secuelas más importantes tras este exceso en la secreción de LH es un ciclo reproductivo anormal que conduce a la infertilidad y, por lo tanto, los principales efectos de la hipersecreción se observan en animales adultos. En el presente estudio, carneros prenatalmente expuestos a T o DHT exhiben incrementos postnatales transitorios en la secreción de LH en comparación con los machos control, lo que sugiere una cierta normalización en los mecanismos de programación entre ovejas y carneros. Un aumento de la respuesta hipofisaria a la GnRH en hembras ha sido propuesto para explicar en parte la hipersecreción de LH observada después de este tipo de protocolo de androgenización prenatal. Y dicho aumento de la respuesta hipofisaria a la GnRH se produce por cambios durante el desarrollo de la expresión de receptores clave en la hipófisis durante el desarrollo prenatal (Manikkam y col., 2008), que pueden conducir a un pool más grande de la LH preparada para ser liberada en respuesta a la pulsatilidad de GnRH (Barrell y col., 1992). Estudios acerca de los perfiles de LH en carneros sometidos a este tratamiento con testosterona son aún escasos, pero no podemos descartar esta hipótesis para machos, ya que la amplitud de la secreción de LH fue transitoria y significativamente incrementada después del nacimiento con androgenización fetal. Sin embargo, es necesario tener cuidado puesto que ya se ha discutido que existe una diferenciación sexual en respuesta a andrógenos en el útero entre machos y hembras en ovinos. Por tanto, el mecanismo que explica la hipersecreción de LH en el macho puede ser diferente del propuesto en hembras androgenizadas.

Los efectos observados en el presente trabajo pueden ser de origen androgénico, y no de origen estrogénico, en base a las características similares de secreción de LH observadas en

---

machos tratados con T y con DHT. En el presente estudio se estudiaron 2 andrógenos: uno que normalmente se aromatiza a los estrógenos en el cerebro, bajo la acción de la enzima aromatasa, y otro que tradicionalmente ha sido catalogado como un andrógeno no-aromatizable (Handa y col., 2008). Sin embargo, existe evidencia de que la DHT en realidad se puede convertir en  $3\beta$ diol, que podría actuar a través del receptor  $\beta$  estradiol o ER2 (Handa y col., 2008). Por lo tanto, es admisible que algunos efectos catalogados como de origen androgénico puedan tener un origen estrogénico. Además, se ha descrito la presencia de ER $\beta$  (ER2) en los fetos macho ovinos (Alexander y col., 2009), lo que podría tener un papel en la masculinización / defeminización del cerebro (Gorton y col., 2009). Sin embargo, en este tipo de estudio, existe evidencia de que el receptor de estradiol más involucrado en la secreción de gonadotropina es el ER $\alpha$  (ER1) y que bajo androgenización prenatal, la mayoría de las diferencias en la expresión de este receptor se observan después del nacimiento (Gorton y col., 2009). En esencia, se debe tener cuidado en la interpretación de los mecanismos implicados, ya que existe evidencia de la existencia de un efecto diferencial sobre los parámetros testiculares cuando los machos fueron expuestos a T o DHT durante la gestación (Bormann y col., 2011). Aunque no tenemos disponibles los niveles fetales de T obtenidos con nuestro régimen de T o DHT aplicado a las madres participantes en el presente estudio, creemos que estos carneros expuestas a andrógenos estuvieron en realidad expuestos a niveles elevados de andrógenos durante la gestación por varias razones: 1) Recientemente se ha demostrado que en hembras que recibieron 100 mg de T a partir del día 30-90 de gestación, sus fetos macho muestran niveles plasmáticos de T en el cordón umbilical alrededor de 10 veces más altos que los machos control en el día 90 de gestación (Veiga-López y col., 2011). 2) los niveles plasmáticos de T en las madres que recibieron T durante el embarazo son significativamente mayores que en madres control (Veiga-López y col., 2011). Teniendo en cuenta que la dosis administrada de T a nuestras madres era un tercio de la que emplearon Veiga-López y col., es de esperar que los niveles de testosterona fueran aproximadamente un tercio de los obtenidos con la dosis de 100 mg, niveles que todavía están por encima de los niveles de T en fetos control. 3) Hemos demostrado que los carneros que nacieron de hembras que recibieron T manifestaron varias alteraciones en la concentración y motilidad espermática (Recabarren y col., 2008) y un aumento del número de células de Sertoli en el testículo, pero disminuyeron el número de células germinales (Rojas-García y col., 2010). Aunque la T es esencial para la

---

programación normal de diferentes características reproductivas en carneros, por ejemplo durante la pubertad neuroendocrina, como lo demuestran los tratamientos con antiandrógenos como el flutamida (Jackson y col., 2008), un exceso de T o DHT durante momentos específicos de la gestación puede tener efectos perjudiciales en los carneros.

**En el segundo estudio** se analizaba el efecto de la exposición del feto ovino macho a dosis elevadas de testosterona, lo que inducía un incremento de células de Sertoli en los testículos del animal tras el nacimiento. Junto a hallazgos previos que demostraban que dosis de testosterona elevadas inducían un incremento en el número de células de Sertoli e impedía la espermatogénesis en animales adultos (Rojas-García y col., 2010), estos datos sustentan la hipótesis de que la reprogramación durante el desarrollo fetal por un exceso de testosterona prenatal da lugar a una alteración temprana en la población de células de los túbulos seminíferos. Esas perturbaciones tempranas, junto a la baja expresión de TGFBR1 observada en machos tratados con testosterona pueden contribuir en la reducción del número de células germinales (Rojas-García y col., 2010), disminución de la circunferencia escrotal y la bajada de motilidad y recuento espermático en machos adultos tratados con testosterona (Recabarren y col., 2008). Los resultados obtenidos que hacen referencia a que los testículos de machos tratados con testosterona recién nacidos tienen tendencia a ser más pesados que los machos control están de acuerdo con los resultados publicados por Bormann y col.(2011), usando un periodo de tratamiento diferente (en los días 30-90 de gestación). Considerando que las células de Sertoli de los túbulos seminíferos son los componentes más destacados de los testículos durante la etapa fetal y prepuberal, el incremento del número de células de Sertoli pueden explicar ese incremento de peso testicular observado. En mamíferos, el aumento o disminución del volumen testicular antes del comienzo de la pubertad está directamente asociado con el incremento o reducción del número de cel. de Sertoli, respectivamente (Rey y col., 1993; Nistal y col., 1982; Müller et Skakkebak 1983; Lukas-Croisier y col., 2003). Aunque nuestro diseño experimental no analizaba los mecanismos que contribuyen a incrementar el número de cel. de Sertoli, existe evidencia de que los andrógenos inducen la proliferación de cél. de Sertoli en los estadios tempranos de la vida ( Johnston y col., 2004; Tan y col., 2005; Scott y col., 2008). Por tanto, el incremento en el número de cél. de Sertoli parece ser un reflejo directo del tratamiento con testosterona prenatal. El efecto proliferativo de los andrógenos sobre las cél. de Sertoli fetales está probablemente mediado por cél. mioideas peritubulares que



---

expresan AR durante el desarrollo fetal (Scott y col., 2008), ya que las células de Sertoli no expresan el AR hasta la vida postnatal (Majdic y col., 1995; Al-Attar y col., 1997; Berensztein y col., 2006; Chemes y col., 2008; Boukari y col., 2009). Los hallazgos de este estudio, que documentan el incremento temprano en el número de células de Sertoli sin que existan cambios en el número de células germinales durante la etapa temprana postnatal en contraposición al reducido número de células germinales durante la edad adulta (Rojas-García y col., 2010) sugiere que la afectación de las células de Sertoli es el objetivo del exceso de T prenatal y que la pérdida de células germinales observada en machos adultos tratados con testosterona puede ocurrir próximo a la pubertad, cuando comienza la espermatogénesis. Hasta este momento, la evidencia indica que el número de espermátidas en adultos es proporcional al número de células de Sertoli producidas durante el desarrollo perinatal (Orth y col., 1988). El número aumentado de células de Sertoli frente al descenso en el recuento espermático (Recabarren y col., 2008) en carneros adultos tratados con testosterona durante su vida prenatal está en desacuerdo con esta premisa y sugiere poderosamente que la alteración de la función de las cél. de Sertoli puede ser un factor desencadenante. En qué medida la perturbación temprana en el número y función de cél. de Sertoli contribuyen a la posterior alteración en la espermatogénesis está por determinar. La falta de cambio en la expresión de FSHR en los testículos infantiles frente a una incrementada expresión de FSHR en machos postpuberales (Rojas-García y col., 2010) sugiere el desarrollo posterior de esta disrupción. Existen evidencias que indican que la expresión de FSHR en la membrana de las cél. de Sertoli en testículos fetales, del recién nacido y de adultos, difiere dependiendo del momento de estudio (Johnston y col., 2004; Boukari y col., 2009). Por ejemplo, el mayor crecimiento testicular FSH-dependiente en ovino se produce entre los días 60 y 90 tras el nacimiento, momento en el que es evidente un incremento en el número de sitios de enlace de FSH en el testículo (Yarney and Sanford, 1989), concretamente uno o dos meses más tarde que en nuestro estudio.

La señalización alterada de TGFB en las cél. de Sertoli pueden ser un factor contribuyente en la alteración de la función testicular, evidenciada por una disminución del número de espermatozoides (Rojas-García y col., 2010). TGFB regula varias funciones testiculares como la espermatogénesis, esteroidogénesis o síntesis de la matriz extracelular (Teerds and Dorrington, 1993; Lui y col., 2003; Wagener y col., 2005; Zhang y col., 2004). Reciente estudios han resaltado los efectos de TGFBs en el mantenimiento de la integridad de la

---

barrera hemato-testicular (Lui y col., 2003; Su y col., 2010; Yan y col., 2008; Caussanel y col., 1997; Gautier y col., 1994).

La reducida expresión de TGFBR1 encontrada en machos tratados con testosterona a las 4 semanas de vida sugiere un impacto potencial del tratamiento con testosterona prenatal sobre el desarrollo postnatal de la barrera hemato-testicular. Los bajos niveles plasmáticos de LH en machos tratados con T y la pérdida de diferencias entre los grupos tratados son consistentes con los hallazgos obtenidos en un estudio anterior que utilizaba 60 mg de TP desde el día 30 al día 90 de gestación (Recabarren y col., 2007). Los niveles plasmáticos de FSH, LH y T en machos tratados y control durante el estudio soportan la hipótesis de que el mayor número de cél. de Sertoli fue resultado del efecto directo del exceso de testosterona prenatal sobre el testículo y un cambio en los niveles circulantes endógenos de testosterona no tendrá efecto. Ya que la LH y la T son liberadas de forma pulsátil, la ausencia de cambios en estas hormonas debe ser tomada con cautela, ya que han sido tomadas en un único tiempo.

En resumen, los hallazgos de este trabajo soportan la hipótesis de que la exposición prenatal a un exceso de testosterona impide el desarrollo ontogénico de los testículos a través de su impacto sobre el número de cél. de Sertoli y la expresión de mediadores importantes para la diferenciación testicular. Las alteraciones de las cél. de Sertoli, evidentes a partir de las 4 semanas de vida, indican su repercusión sobre la alteración de la función de las cél. de Sertoli en la reprogramación de la diferenciación testicular.

**En un tercer estudio** diseñado para analizar la respuesta hipofisaria y testicular de carneros jóvenes expuestos a altas concentraciones de testosterona en su vida fetal, se observó que tras dicho tratamiento, se incrementó la respuesta hipofisaria a GnRH, mientras que disminuía la sensibilidad testicular. El fallo del testículo para responder a un incremento en la liberación de LH parece estar relacionado con la disminución de LHR y la ausencia de cambios en las enzimas esteroideogénicas. Los mecanismos dejan ver esas diferencias funcionales y a continuación se discute su importancia sobre la fertilidad del macho.

Desde hace tiempo se sabe que la GnRH regula la síntesis y liberación de LH (Stanislaus y col. 1998 ). Recientemente, nuestro equipo ha observado que la amplitud de los pulsos de

---

LH en machos tratados con T y con DHT prenatal está aumentada (Recabarren y col. 2012). En estos estudios, no quedó claro si el incremento en la amplitud de los pulso de LH fue resultado de un incremento en el aporte de GnRH o por un aumento en la sensibilidad hipofisaria a la GnRH. Otros estudios han observado que la sensibilidad hipofisaria está incrementada en la hembras nacidas de madres tratadas con testosterona durante la gestación (Manikkam y col. 2008 ). Los hallazgos relativos a la mayor liberación de LH tras la administración de análogos a la GnRH en este estudio indican que la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH está también aumentada en machos, al igual que se ha descrito en el caso de las hembras (Manikkam y col. 2008 ). Además, estos hallazgos soportan que el incremento en la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH es un factor que participa en el incremento de la amplitud de los pulsos endógenos de LH, observado en machos tratados con testosterona. (Recabarren y col. 2012 ). Sin embargo, aún hay que seguir estudiando si el mecanismo que participa en este incremento está relacionado con una mayor síntesis de LH o una mayor expresión del receptor GnRH (Katt y col. 1985, Turzillo y col. 1995a, 1995b, Sakurai y col. 1997) y si la cantidad de LH liberada es función del número de receptores de GnRH (Evans y col. 1997) y del contenido de LH (Clarke y col. 1987). Debemos puntualizar que estos hallazgos no excluyen la existencia de una participación adicional debida al incremento de la secreción de GnRH. De forma interesante, un estudio reciente ha proporcionado evidencia sobre el efecto de la testosterona a nivel de la hipófisis. Los autores encontraron que las glándulas hipofisarias de ovejas adultas (de ambos sexos) tratadas con testosterona en su época prenatal fueron un 40% más pesadas que las de los animales control. Mientras que no se observaron diferencias en la intensidad de células inmunorreactivas a LH o a receptores de estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) en la hipófisis de ovejas tratadas con testosterona prenatal o en ovejas control, el porcentaje de células con co-localización de LH $\beta$  y ER $\alpha$  fue menor en hembras tratadas con testosterona en la vida prenatal. Esto sugiere que el estradiol tiene una retroalimentación muy reducida y, por tanto, provoca hipersecreción de LH (Robinson y col. 2011), una posibilidad que debe ser estudiada en machos expuestos a testosterona. La magnitud de respuesta a un análogo de GnRH administrado a las 30 semanas fue la mitad que el observado a las 20 semanas tanto en los machos control como en los que fueron expuestos a testosterona. Esto probablemente refleja el feedback negativo ejercido por la testosterona procedente de los testículos maduros. Con el incremento de testosterona que se produce en el macho a medida que

---

envejece, la hipófisis se expone a una mayor retroalimentación negativa por testosterona (Olster & Foster 1986). Estudios anteriores realizados por Tilbrook y col. (1991) en carneros se ha demostrado que el feedback de la testosterona se ejerce principalmente a nivel del hipotálamo. Esto podría haber dado lugar a una reducción en la sensibilización a GnRH a nivel pituitario, con reducción en la producción y liberación de LH desde la hipófisis.

Los hallazgos de este estudio demuestran el papel de la LH en la estimulación de la respuesta gonadal de testosterona. La respuesta de la LH resultante del estímulo del análogo de GnRH se tradujo en un incremento de testosterona a nivel gonadal en ambos grupos de animales. El incremento por una respuesta aguda a la testosterona a las 30 semanas (postpuberal) comparado con la respuesta a las 20 semanas (prepuberal) en ambos grupos de tratamiento probablemente refleja el aumento de sensibilidad de los testículos que están madurando a la LH. En corderos, la respuesta a LH endógena incrementa a medida que ellos crecen (Foster y col. 1978). Paradójicamente, el incremento en la liberación de LH que ocurrió en machos expuestos a testosterona después del test con análogo de la GnRH no mostró un incremento en la liberación aguda de testosterona evaluada en ambos momentos del desarrollo. Además, la secreción de testosterona acumulada a lo largo del periodo de estudio de 48h fue más reducido en machos expuestos a testosterona a las 30 semanas que en machos control. En general, estas observaciones demuestran una reducida sensibilidad testicular de los machos expuestos a estimulación con LH. Esto está fundamentado en que el área bajo la curva de la proporción entre testosterona: LH fue más baja en machos de 30 semanas de edad expuestos a testosterona que en los machos control.

Mientras que la sensibilidad testicular a análogos de la GnRH fue reducida en machos tratados con testosterona en el periodo prenatal, la liberación de testosterona basal fue alta en comparación con los machos control. Esto sugiere que los machos tratados en época prenatal con testosterona pueden tener incrementado la frecuencia de pulsos de GnRH, al igual a lo que ocurre en hembras y por tanto están sujetos a estimulación repetitiva de la hipófisis y de la gónada. Si es así, una mayor estimulación con LH endógena que ha sido liberada en respuesta a estímulo de GnRH podría no conducir a un incremento en la producción de testosterona.

Hay diferentes explicaciones para la reducida respuesta de la testosterona ante la

---

estimulación con análogos de la GnRH. Una posibilidad es que la LH liberada tras el test pueda ser de diferente naturaleza cualitativa comparada con la que se libera en los animales control y no reconocible por el método RIA empleado. Un adecuado procesamiento post-transcripcional de la molécula de LH (Cicccone & Kaiser 2009) y la fracción resultante de polisacáridos es importante para conferir actividad biológica a dicha molécula (Bergendahl & Veldhuis 2001). Varios estudios han mostrado que cambios en la mezcla de isoformas de LH pueden contribuir a las diferencias en la respuesta de la gónada femenina, pero se conoce menos sobre la respuesta en las células de Leydig de la gónada masculina (Castro-Fernández y col. 2000, Perera-Marín y col. 2007, Olivares y col. 2009). En un modelo de rata para estudiar la obesidad inducida por la dieta, la bioactividad de la LH fue reducida, representando el hipogonadismo masculino (Olivares y col. 2010). Muchas formas ácidas predominan en hombres eugonadales (Bergendahl & Veldhuis 2001). Los patrones alterados de liberación de GnRH endógena (evaluada por la pulsatilidad de la LH) durante el periodo posterior al desarrollo en machos expuestos a testosterona (Recabarren y col. 2012) pueden haber contribuido a la producción de LH con menor filtrado ácido que no se aporta de manera constante en los machos expuestos a testosterona ni en los machos control. Esta premisa es consistente con los hallazgos anteriores, en los que la estimulación con hCG en los machos control y en los expuestos a testosterona obtiene respuestas de testosterona similares a las 40 semanas de edad (Recabarren y col. 2008a). La reducida expresión de ARNm del receptor de LH de los machos expuestos a testosterona en comparación con los machos control puede ser la responsable de la reducida respuesta testicular. Sin embargo, una disminuida expresión de ARNm LHR no estuvo correlacionada con el AUC de testosterona en respuesta al test con análogo de GnRH. Debe determinarse aún si los cambios en las proteínas LHR están correlacionados con la respuesta de la testosterona. La falta de diferencias en los niveles de ARNm de ciertas enzimas esteroidogénicas indica que la disminución de la respuesta acumulativa de la testosterona en machos expuestos a testosterona puede no ser función de limitación por las enzimas esteroidogénicas. Además, a pesar de que la expresión de ARNm 3BHS y 17BHS tipo 3 en las células de Leydig en cultivo incrementó en respuesta a la estimulación con hCG, no hubo efecto del tratamiento prenatal, confirmando las observaciones en la expresión testicular de ARNm. Estos hallazgos relacionados con el ARNm necesitan ser interpretados con cuidado ya que los cambios pueden haberse producido a nivel proteico. Estos hallazgos proveen evidencia

---

de que la exposición a un exceso de testosterona durante el desarrollo fetal no solo altera la diferenciación testicular, sino que también provoca una reducción en el número de células espermáticas y compromete la función de las células de Sertoli (Recabarren y col. 2008a, 2008b, Rojas-García y col. 2010, 2013), y también provoca la disrupción de la interface del eje pituitario-gonadal. Aún hay que investigar cómo deben relacionarse estos hallazgos.

Aunque nosotros no analizamos la espermatogénesis en este estudio, nosotros hemos investigado extensivamente esto en estudios previos. Esos estudios no mostraron diferencias entre los machos control y aquellos expuestos a testosterona (Rojas-García y col. 2013) a las 4 semanas de edad. En contraste, se observó que la espermatogénesis estuvo deteriorada con un menor número de espermatogonias, espermátocitos I y espermátidas por túbulo en machos adultos tratados con testosterona durante la etapa prenatal (Rojas-García y col. 2010).

Teniendo en cuenta que la función reproductiva de los adultos es la culminación del adecuado desarrollo ontogénico del eje hipotálamo-pituitario-gonadal, cualquier perturbación en esta secuencia de desarrollo podría conducir hacia la perturbación de la fertilidad. En el presente estudio, se observó un desequilibrio en la relación entre la hipófisis y el testículo en machos peripuberales debido a la exposición prenatal a testosterona. Esto podría poner en peligro la fertilidad futura de aquellos machos expuestos a testosterona. Ya que el exceso de testosterona puede ser considerado como un disruptor endocrino así como ambiental (Skakkebaek y col. 2001), estos hallazgos en nuestro modelo animal podría, aunque con precaución, extenderse a la salud reproductiva humana, en particular, para hijos de mujeres gestantes con PCOS. Como apoyo a esta premisa, placentas de madres PCOS mostraron menor actividad aromatasa y mayor actividad 3 $\beta$ -HSD1, lo que podría provocar un incremento de los niveles de andrógenos durante la gestación (Maliqueo y col. 2013). Los estudios de Veiga-López y col. (2011) en ovinos han encontrado que los fetos ovinos macho y hembra cuyas madres recibieron testosterona, tienen niveles plasmáticos elevados de esa hormona, en comparación con sus controles.

El contexto de los presentes resultados deber ser útil para entender las probables consecuencias sobre la función testicular, un área que ha sido poco estudiada ya que el enfoque ha sido puesto principalmente en las consecuencias de androgenización prenatal en las hembras. En esencia, se encontró que carneros prenatalmente expuestos a los

---

andrógenos mostraron deficiencias en la producción de esperma y un número alterado de células de Sertoli (Recabarren y col., 2008; Veiga-Leal y col., 2011), que puede comenzar con trastornos tales como la alteración de la secreción pulsátil de LH. Curiosamente, los hallazgos en carneros adultos tuvieron lugar cuando se observaron niveles similares de LH basal y niveles similares de T estimulada por GnRH. En el presente estudio, el aumento de la LH pulsátil debido al incremento de amplitud del pulso de LH podría tener efectos deletéreos sobre la función testicular o los testículos podrían ser refractarios a los efectos de la LH incrementada. Es necesario llevar a cabo más estudios para corroborar estas hipótesis. En resumen, la exposición prenatal a un exceso de testosterona en machos altera el patrón de liberación de LH, lo que sugiere cambios en la respuesta a la liberación de GnRH del hipotálamo, o en el patrón de liberación de GnRH desde el hipotálamo. Nuevos estudios deben llevarse a cabo con el fin de determinar qué mecanismos son los que realmente participan.

---

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

*(DEL ARTÍCULO 1: PRENATAL EXPOSURE TO ANDROGEN EXCESS INCREASE LH PULSE AMPLITUDE DURING POSTNATAL LIFE IN MALE SHEEP. RECABARREN SE, RECABARREN M, ROJAS-GARCÍA PP, CORDERO M, REYES C, SIR-PETERMANN T. 2012. HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 44:688-693)*

- I. La exposición prenatal a un exceso de andrógenos altera el patrón normal de liberación de LH en machos, lo que sugiere que dichos andrógenos inducen cambios en la respuesta hipofisaria y/o en el patrón de liberación de GnRH hipotalámica.
  
- II. Los patrones de secreción de LH observados en machos expuestos prenatalmente a testosterona y a dihidrotestosterona fueron similares, y demuestra el origen androgénico (y no estrogénico) en la modificación de las características de liberación de LH.

*(DEL ARTÍCULO 2: ALTERED TESTICULAR DEVELOPMENT AS A CONSEQUENCE OF INCREASE NUMBER OF SERTOLI CELL IN MALE LAMBS EXPOSED PRENATALLY TO EXCESS TESTOSTERONE. ROJAS-GARCIA, PP, RECABARREN MP, SIR-PETERMANN T, REY R, PALMA S, CARRASCO A, PEREZ-MARIN C.C.,PADMANABHAN V., RECABARREN SE. 2013. ENDOCRINE 43:705-713)*

- III. La exposición prenatal a un exceso de testosterona impide el desarrollo ontogénico de los testículos a través de su impacto sobre el número de cél. de Sertoli y la expresión de mediadores importantes para la diferenciación testicular.



---

IV. Las alteraciones de las cél. de Sertoli, evidentes a partir de las 4 semanas de vida, indican su repercusión sobre la alteración de la función de las cél. de Sertoli en la reprogramación de la diferenciación testicular.

*(DEL ARTÍCULO 3: PITUITARY AND TESTIS RESPONSIVENESS OF YOUNG MALE SHEEP EXPOSED TO TESTOSTERONE EXCESS DURING FETAL DEVELOPMENT.*

*Recabarren MP, P P Rojas-Garcia, R Einspanier, V Padmanabhan, T Sir-Petermann, **SE**, **Recabarren**. 2013. *Reproduction* 145:567-576)*

V. Durante la época peripubertal, los machos expuestos a testosterona durante la gestación presentan una mayor sensibilidad hipofisaria a la GnRH, mientras que sus testículos redujeron su actividad/sensibilidad frente a LH.

---

## 7. RESUMEN

La función reproductiva de los animales y humanos puede ser modificada por numerosos factores ambientales, los cuales se harían presente desde la etapa fetal. Los factores ambientales podrían provenir de la madre, como también del medio ambiente externo y que se incorporan al microambiente uterino a través de diversos mecanismos.

El período de desarrollo embrionario-fetal es particularmente sensible a estímulos de diverso orden. Durante este período, se desarrollan los diversos órganos y se programan sus funciones. La plasticidad del desarrollo es un concepto que permite explicar los cambios que se producen en el embrión o el feto y que alterarían la organogénesis y el funcionamiento de diversos órganos y cuya mayor expresión en las alteraciones funcionales, se observa en la vida postnatal, algunas de las cuales se pueden manifestar como síndromes. La hipótesis del origen fetal de las enfermedades del adulto descansa en este concepto. Según esta hipótesis, el patrón de desarrollo definido por el genoma, se altera producto de señales provenientes de la madre o del medio ambiente y desvían su trayectoria de desarrollo. El mecanismo por el cual se genera este fenómeno se denomina epigénesis.

El aumento de las hormonas de origen materno puede constituir estímulos de programación fetal. Sin embargo, el término **reprogramación fetal** sería más adecuado ya que la reprogramación daría cuenta de los cambios generados por la epigénesis, a diferencia de la **programación** que estaría dada por el genoma. Una de esas hormonas es la testosterona. Estudios experimentales en monas y ovejas han establecido que si las madres son expuestas a niveles suprafisiológicos de testosterona, las crías hembras presentan retardo del crecimiento intrauterino, infertilidad, obesidad, insulino-resistencia y cambios de conducta en su vida postnatal. En las hembras ovinas con exposición prenatal a testosterona (EPT) en útero, se han observado alteraciones neuroendocrinas, ováricas, genitales y conductuales desde el nacimiento hasta la edad adulta. Las hembras ovinas prepuberales presentan menor peso corporal, inicio precoz de los ciclos estrales y mayor secreción de estradiol en respuesta al test de análogo de GnRH, en comparación a las hembras nacidas de madres controles. La mayor cantidad de estudios sobre los efectos de la reprogramación fetal inducida por testosterona en ovinos, se han enfocado en las crías hembras dado que los

---

resultados obtenidos se pueden trasladar, como modelo experimental, a un síndrome endocrino-metabólico, que aqueja a un porcentaje elevado (10 al 15 %) de mujeres en edad fértil, conocido como Síndrome de Ovario Poliquístico. El efecto reprogramador de la testosterona sobre los machos ha sido menos explorado. Recientemente nuestro laboratorio demostró que los machos adultos nacidos de madres tratadas con testosterona, presentaban disminución en el porcentaje de espermios en el eyaculado, menor circunferencia escrotal y menor concentración de espermatozoides. Sorprendentemente, la cantidad de células de Sertoli en los túbulos seminíferos era mayor. Sin embargo, los mecanismos que conducen a estos fenómenos y la ontogenia de estos efectos se desconocen, lo que lleva a preguntarse si estos fenómenos de reprogramación o epigenéticos se establecen desde la etapa fetal, o se desarrollan en la vida postnatal. Para responder a esta interrogante, en la presente tesis se establecieron los siguientes objetivos específicos, a lo que se dará respuesta a través de los trabajos de investigación realizados.

1. Evaluar los efectos de la exposición fetal al exceso de andrógenos (testosterona o DHT) sobre el eje hipotálamo-pituitario mediante el estudio de la **pulsatilidad de LH** en diferentes fases del desarrollo sexual postnatal en machos.
2. Evaluar si la exposición fetal a un exceso de testosterona causa una disrupción temprana en la **población celular testicular** y en **mediadores locales de la función testicular**.
3. Evaluar la **respuesta del eje pituitario-gonadal y el compromiso de la función testicular tras la administración de análogos a la GnRH** en machos expuestos prenatalmente a testosterona.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que la exposición prenatal a un exceso de andrógenos altera el patrón normal de liberación de LH en machos, lo que sugiere que dichos andrógenos inducen cambios en la respuesta hipofisaria y/o en el patrón de liberación de GnRH hipotalámica. Los patrones de secreción de LH observados en machos expuestos prenatalmente a testosterona y a dihidrotestosterona fueron similares, y demuestra el origen androgénico (y no estrogénico) en la modificación de las características de liberación de LH. La exposición prenatal a un exceso de testosterona impide el desarrollo ontogénico de los testículos a través de su impacto sobre el número de cél. de Sertoli y la expresión de mediadores importantes para la diferenciación testicular.

---

Finalmente, fue posible concluir que durante la época peripubertal, los machos expuestos a testosterona durante la gestación presentan una mayor sensibilidad hipofisaria a la GnRH, mientras que sus testículos redujeron su actividad/sensibilidad frente a LH.

En resumen, la exposición prenatal de machos ovinos a testosterona altera el funcionamiento del eje gonadal ovino. Nuevos estudios serán necesarios para reconocer los mecanismos epigenéticos involucrados en las alteraciones de la funcionalidad del eje gonadal.



---

## 8. ABSTRACT

The reproductive function of animals and humans can be modified by many environmental factors, which could affect the growing fetus. These environmental factors could come from the mother, as well as from the external environment and may reach the uterine microenvironment through various mechanisms.

The period of embryo-fetal development is particularly sensitive to stimuli of different order. During this period, various organs are developing and their functions are programmed. The plasticity of development is a concept that allows to explain the changes that occur in the embryo or fetus and that they would alter the organogenesis and the functioning of various organs and whose greatest expression in functional alterations, is observed in postnatal life, some of which may be manifested as syndromes. The hypothesis of the fetal origin of adult diseases rests on this concept. According to this hypothesis, the pattern of development defined by the genome, is altered by signals derived from the mother or from the environment and could divert its pathway of development. The mechanism by which this phenomenon occurs is now called Epigenesis.

The increase of hormones of maternal origin could constitute stimuli of fetal programming. However, the term fetal reprogramming would be more appropriate since the reprogramming would realize the changes generated by the epigenesis, in contrast to programming that would be given by the genome. One of these hormones is testosterone. Experimental studies in monkeys and sheep have established that if mothers are exposed to high levels of testosterone, their young female offspring exhibit intrauterine growth retardation, and in the other hand, infertility, obesity, insulin resistance and changes in the behavior during their postnatal life. In female sheep, with prenatal exposure to testosterone (PET) in uterus, it has been observed neuroendocrine, ovarian, genital and behavioural alterations from birth up to adulthood. The prepubertal female sheep have lower body weight, early onset of estrous cycles and greater secretion of estradiol in response to GnRH analogue test, in comparison to females born to control mothers. Most of studies about the fetal reprogramming by testosterone in ovines have been focused in female offspring, because their results could be translated, as an experimental model, to a endocrine-metabolic syndrome that affect to an elevated percentage of women in fertile age, known as

---

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). The reprogramming effect of testosterone on males has been less explored. Our laboratory recently demonstrated that males born to mothers treated with testosterone presented a decrease in percentage of sperm in the ejaculate, less scrotal circumference, and less spermatocytes concentration. Surprisingly, the amount of Sertoli cells in the seminiferous tubules was higher. However, mechanisms that drive to this and the ontogenia of these findings are unknown. This leads to the questions if these reprogramming phenomena are established since the fetal stage or they are developed during the postnatal life. To answer these interrogants, in the present thesis, the following specific objectives were defined to which, answers will be reached by the research work.

1. To evaluate the effects of the fetal exposure to an excess of androgens (testosterone and DHT) on the hypothalamus-pituitary axis by means of the LH pulsatility in different stages of the postnatal sexual development in males.
2. To evaluate if the fetal exposure to an excess of testosterone produces an early disruption in the testicular cellular population and in the local mediators of the testicular function. .
3. To evaluate the pituitary-testicular axis and the compromise of the testicular function in response to a GnRH analogue in males prenatally exposed to testosterone.

Results obtained allowed to conclude that the prenatal exposure to an excess of androgens in males alters the normal pattern of LH secretion. This suggests that prenatal androgens drives to changes in the pituitary responsiveness and/or in the GnRH secretion pattern. The pattern of LH secretion was similar in either males, prenatally exposed to testosterone or DHT, demonstrating an androgenic effect (and non-estrogenic) in the modification of the pulsatile LH secretion characteristics. The prenatal exposure to an excess of testosterone hinder the ontogenic development of testis by its impact on the Sertoli cells number and in the expression of local mediators important for the normal testicular differentiation. Finally, it was possible to conclude that males exposed to an excess of testosterone during gestation exhibited a higher pituitary responsiveness to the GnRH while testis showed a less sensitivity to the LH stimulus.

In summary, the prenatal exposure to testosterone in male ovines alters the gonadal axis function. New studies are required to recognize the epigenetic mechanisms involved in the gonadal axis functionality.

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, Colman RJ, Kemnitz JW. 1998 Insights into the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies of prenatally androgenized female Rhesus monkeys. *Trends Endocrinol Metab* 9:62-67.

Abney TO. 1999. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. *Steroids*; 64 : 610-617.

Anderson RA and Sharpe RM. 2000 Regulation of inhibin secretion in the human male and its clinical applications. A Review. *Intl J Androl* 23 136-144

Anderson LM, Diwan BA, Fear NT, Roman E. 2000 Critical windows of exposure for children's health: cancer in human epidemiological studies and neoplasms in experimental animal models. *Environ. Health Perspect.* 108(Suppl.3):573-594.

Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR. 1999 Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99:409-419.

Atanassova N, McKinnell C, Walker M, Turner KJ, Fisher JS, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe RM. 1999. Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology* 140: 5364-5373

Atanassova NN, Walker M, McKinnell C, Fisher JS, Sharpe RM. 2005 Evidence that androgens and oestrogens, as well as follicle-stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. *J Endocrinol.* 184:107-117

Attal JA. 1969 Levels of testosterone, androstenedione, estrone and estradiol-17 beta in the testes of fetal sheep. *Endocrinology.* 85:280-289.

Baarends XM, Uilenbroek JTJ, Kramer P, Hoogerbrugge JW, Vanleeuwen ECM, Themmen APN, Grootegoed JA. 1995 Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 136:4951-4962.

Barker DJ and Clark P. 1997 Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev. Reprod.* 2:105-112.

Bar-Shira Maymon B, Paz G, Elliott DJ, Hammel I, Kleiman SE, Yogev L, Hauser R, Botchan A, Yavetz H. 2000. Maturation phenotype of Sertoli cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Hum Reprod.* 15:1537-1542.

Barsoum IB, Yao HH. 2010. Fetal Leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation. *J Androl.* 31:11-15

Berenbaum SA, Duck SC, Bryk K. 2000 Behavioral effects of prenatal versus postnatal androgen excess in children with 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 85:727-733.

Biason-Lauber A, Konrad D. 2008. WNT4 and Sex Development. *Sex Dev* 2:210-218.



- 
- Bilińska B, Schmalz-Fraczek B, Sadowska J, Carreau S. 2000. Localization of cytochrome P450 aromatase and estrogen receptors alpha and beta in testicular cells--an immunohistochemical study of the bank vole. *Acta Histochem.*102 :167-181
- Birch RA, Padmanabhan V, Foster DL, Robinson JE. 2003 Prenatal programming of reproductive neuroendocrine function: fetal androgen exposure produces progressive disruption of reproductive cycles in sheep. *Endocrinology* 144:1426–1434.
- Boisen KA., Main KM, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. 2001 Are male reproductive disorders a common entity? The testicular dysgenesis syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 948:90-99.
- Bonde JP, Flachs EM, Rimborg S, Glazer CH, Giwercman A, Ramlau-Hansen CH, Hougaard KS, Høyer BB, Hærviig KK, Petersen SB, Rylander L, Specht IO, Toft G, Bräuner EV. 2016. The epidemiologic evidence linking prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemicals with male reproductive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 23:104-125 .
- Brehm R, Zeiler M, Rüttinger C, Herde K, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Lécureuil C, Steger K, Konrad L, Biermann K, Failing K, Bergmann M. 2007 A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol.* 171:19-31.
- Brennan J, Capel B. 2004 One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet.* 5:509-521
- Brown TR. 1995. Human androgen insensitivity syndrome. *J Androl* 16 :299-303
- Cabrera MS, Vogiatzi MG, New MI. 2001. Long term outcome in adult males with classic congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:3070-3078.
- Carette D, Weider K, Gilleron J, Giese S, Dompierre J, Bergmann M, Brehm R, Denizot JP, Segretain D, Pointis G. 2010. Major involvement of connexin 43 in seminiferous epithelial junction dynamics and male fertility. *Dev Biol.* 346:54-67.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE.1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 305: 609-613.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. 1995. Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: is there a common cause? *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 7:137-139
- Carreau S, Genissel C, Bilinska, Levallet J. 1999. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl* 22:211-223.
- Carreau S, Levallet J. 2002. Testicular estrogens and male reproduction. *News Physiol Scie* 15: 195-198.
- Carreau S, Delalande C, Silandre D, Bourguiba S, Lambard S. 2006. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. *Mol Cell Endocrinol.* 246 :65-68.
- Cate RL, Mattaliano RJ, Heisson C, Tizard R, Farber NM, Cheung A. 1986 Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expresion of the human gene in animal cells. *Cell* 45:685-698.

- 
- Catlin EA, Tonnu VC, Ebb RG, Pacheco BA, Manganaro TF, Ezzell RM, Donahoe PK, Teixeira J. 1997. Müllerian inhibiting substance inhibits branching morphogenesis and induces apoptosis in fetal rat lung. *Endocrinology* 138: 790-796.
- Cavicchia JC, Sacerdote FL 1988 Topography of the rat blood-testis barrier after intratubular administration of intercellular tracers. *Tissue Cell* 20:577–586.
- Challis JRG, Sloboda D, Matthews SC, Holloway A, Alfraidy N, Howe D, Fraser M, Moss TJM & Newnham JP 2001 The fetal placental hypothalamic–pituitary–adrenal axis, parturition and postnatal health. *Mol Cell Endocrinol* 185 135–144
- Cheng CY, Mruk DD 2002 Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 82:825–874
- Clark AM, Garland KK, Russell LD. 2000. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for the formation of adult type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod* 63: 1825-1838.
- Clarke IJ, Scaramuzzi RJ, Short RV. 1976 Effects of testosterone implants in pregnant ewes on their female offspring. *J Embryol Exp Morphol.* 36:87-99.
- Clarke IJ, Scaramuzzi RJ, Short RV. 1977 Ovulation in prenatal androgenized ewes. *J Endocrinol* 73:385–389.
- Clarke SJ, Ellis N, Styne, DM, Gluckman PD, Kaplan SL, Grumbach L. 1984. Hormone ontogeny in the ovine fetus. XVII. Demonstration of pulsatile luteinizing hormone secretion by the fetal pituitary gland. *Endocrinology* 115: 1774-1779.
- Cotinot C, Pailhoux E, Jaubert F, Fellous M. 2002 Molecular genetics of sex determination. *Semin Reprod Med.* 20:157-168.
- de Bruin JP, Dorland M, Bruinse HW, Spliet W, Nikkels PG, te Velde ER 1998 Fetal growth retardation as a cause of impaired ovarian development. *Early Hum Dev* 51:39–46
- de Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P. 1998 Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol.* 18:6653-6665.
- de Santa Barbara P, Moniot B, Poulat F, Berta P. 2000 Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dyn.* 217:293-8.
- Den Hond E, Tournaye H, De Sutter P, Ombelet W, Baeyens W, Covaci A, Cox B, Nawrot TS, Van Larebeke N, D'Hooghe T. 2015. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environ Int.* 84:154-160
- Desai M, Babu J, Ross MG. 2007. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 293: R2306-R2314.
- Dym M, Fawcett DW 1970 The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3:308–326.
- Efstathiadis A 1998 Genetics of mouse growth. *Int J Dev Biol* 42 955–976

- 
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457-463.
- Fisher JS. 2004 Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction*. 127:305-315.
- Foresta C, Bettella A, Moro E, Roverato A, Merico M, Ferlin A. 2001. Sertoli cell function in infertile patients with and without microdeletions of the azoospermia factors on the Y chromosome long arm. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:2414-2419.
- Foucault P, Drosowsky MA, Carreau S. 1994. Germ cell and Sertoli cell interactions in human testis: evidence for stimulatory and inhibitory effects. *Hum Reprod*.9:2062-2068
- Fowden AL 1995 Endocrine regulation of fetal growth. *Repr Fert Develop* 7: 351–363
- Fowden AL & Forhead AJ 2001 The role of hormones in intrauterine development. In *Lung Biology in Health and Disease*, vol 151, pp 199–228. Ed. DJP Barker. New York: Marcel Dekker.
- Fowden AL 2003 The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta* 24 803–812.
- Frojdman K, Paranko J, Virtanen I, Pelliniemi LJ. 1992. Intermediate filaments and epithelial differentiation of male rat embryonic gonad. *Differentiation* 50: 113–123.
- Fumel B, Guerquin MJ, Livera G, Staub C, Magistrini M, Gauthier C, Flamant F, Guillou F, Fouchécourt S. 2012. Thyroid hormone limits postnatal Sertoli cell proliferation in vivo by activation of its alpha1 isoform receptor (TRalpha1) present in these cells and by regulation of Cdk4/JunD/c-myc mRNA levels in mice. *Biol Reprod* 87: 1-9.
- Ge R, Hardy MP. 2007. Regulation of Leydig cell during pubertal development. En: *The Leydig Cell in Health and Disease*. Ed: AH Payne y MP Hardy. Cap 4, pp 55- 70. Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA.
- Gilleron J, Carette D, Durand P, Pointis G, Segretain D. 2009. Connexin 43 a potential regulator of cell proliferation and apoptosis within the seminiferous epithelium. *Int J Biochem Cell Biol*. 41:1381-1390
- Gilleron J, Malassiné A, Carette D, Segretain D, Pointis G. 2011. Chemical connexin impairment in the developing gonad associated with offspring infertility. *Curr Med Chem*. 18:5145-5158
- Ghirri P, Ciulli C, Vuerich M, Cuttano A, Faraoni M, Guerrini L, Spinelli C, Tognetti S, Boldrini A 2002 Incidence at birth and natural history of cryptorchidism: a study of 10,730 consecutive male infants. *J Endocrinol Invest* 25:709–715
- Giuli G, Shen WH, Ingraham HA. 1997 The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development*. 124:1799-1807.
- Griffin JE. 1992. Androgen resistance- the clinical and molecular spectrum. *N Engl J Med* 326:611-618.
- Griswold MD, McLean D. 2006. The sertoli cell. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, editado por Jimmy D Neill, Tercera Edicion, pp 949-1006, Elsevier,

- 
- Habert R., H. Lejeune, JM Saez. 2001. Ontogenesis of Leydig cell and regulation of their functions. *Mol Cell Endocrinol* 79:47-74
- Heckert L, Griswold MD. 1993 Expression of the FSH receptor in the testis. *Recent Prog Horm Res.* 48:61-77.
- Herrmann BL, Saller B, Janssen OE, Gocke P, Bockisch A, Sperling H, Mann K Broecker M. 2002. Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation of the CYP 19 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5476-5484.
- Hikim, AS, Swerdloff RS, Wang C. 2005. The testis. En *Endocrinology, Basic and Clinical Principles*. Editado por S Melmed y PM Conn. Segunda Edición. Páginas 405-418. Humana Press. New Yersey, USA
- Hochereau-de Reviers MT, Monet-Kuntz C, Courot M. 1987 Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J Reprod Fertil Suppl.*34:101-114
- Hochereau-de Reviers MT, Perreau C, Pisselet C, Locatelli A, Bosc M. 1995 Ontogenesis of somatic and germ cells in sheep fetal testis. *J Reprod Fertil.* 103:41-46.
- Ikeda Y. 1996. SF-1: a key regulator of development and function in the mammalian reproductive system. *Acta Paediatr Jpn.* 38:412-419
- Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J. 1996. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ.* 312:467-471
- Irvine DS. 1997. Declining sperm quality: a review of facts and hypotheses. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 11:655-671
- Jenkins TG, Aston KI, Meyer TD, Hotaling JM, Shamsi MB, Johnstone EB, Cox KJ, Stanford JB, Porucznik CA, Carrell DT. 2016. Decreased fecundity and sperm DNA methylation patterns. *Fertil Steril.* 105:51-57
- Jockenhövel F, Schubert M. 2009. Male hypogonadism. 3<sup>rd</sup> Edition, Uni-Med Verlag AG. Bremen, Alemania.
- Josso N, di Clemente N and Gouedard L. 2001 Anti-mullerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 179,25-32.
- Jost A, B. Vigier, J. Prepin, J. Perchellet. 1973. Studies on sex differentiation in mammals *Rec Prog Horm Res* 29:1-41
- Juengel JL, Sawyer HR, Smith PR, Quirke LD, Heath DA, Lun S, Wakefield SJ, McNatty KP. 2002 Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol.* 191:1-10
- Juul A, Almstrup K, Andersson AM, Jensen TK, Jørgensen N, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Toppari J, Skakkebaek NE. 2014. Possible fetal determinants of male infertility. *Nat Rev Endocrinol*10:553-562
- Kacsoh B. 2000 *Endocrine Physiology*. The Mc Graw-Hill Companies Inc.

- 
- Kaitu'u-Lino TJ, Sluka P, Foo CF, Stanton PG. 2007 Claudin-11 expression and localisation is regulated by androgens in rat Sertoli cells in vitro. *Reproduction*. 133:1169-1179
- Kent J 1996 a male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122: 2813-2822.
- Kidder GM, Cyr DG. 2016. Roles of connexins in testis development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 50:22-30.
- Kilcoyne KR, Smith LB, Atanassova N, Macpherson S, McKinnell C, van den Driesche S, Jobling MS, Chambers TJ, De Gendt K, Verhoeven G, O'Hara L, Platts S, Renato de Franca L, Lara NL, Anderson RA, Sharpe RM. 2014. Fetal programming of adult Leydig cell function by androgenic effects on stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.111:E1924-1932
- Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B. 2006 Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol*. 4:e187
- Kim Y, Bingham N, Sekido R, Parker KL, Lovell-Badge R, Capel B. 2007 Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:16558-16563.
- King TF, Lee MC, Williamson EE, Conway GS. 2016. Experience in optimizing fertility outcomes in men with congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 84:830-836.
- Lasala C, Carre-Eusebe D, Picard JY, Rey R. 2004 Subcellular and molecular mechanisms regulating anti-mullerian hormone gene expression in mammalian and nonmammalian species. *DNA and Cell Biology* 23:572-585.
- Lasala C, Schteingart HF, Arouche N, Bedecarrás P, Grinspon RP, Picard JY, Josso N, di Clemente N, Rey RA. 2011. SOX9 and SF1 are involved in cyclic AMP-mediated upregulation of anti-Mullerian gene expression in the testicular prepubertal Sertoli cell line SMAT1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 301:E539-547.
- Lassurguère J, Livera G, Habert R, Jégou B. 2003. Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture. *Toxicol Sci*. 73:160-169.
- Lee MM, Donahoe PK.1993. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev*.14:152-164
- Lucas A. 1991 Programming by early nutrition in man. In: Block G.R. and Whelan J. (Eds) *The Childhood Environment and Adult Disease*. (pp. 38-55) : John Wiley & Sons
- Lucas A, Fewtrell MS, Cole TJ. 1999. Fetal origins of adult disease-the hypothesis revisited. *BMJ*.319: 45-249.
- Lukas-Croissier C, Lasala C, Nicaud J, Bedecarras P, Kumar TR, Dutertre M, Matzuk MM, Picard JY, Josso N, Rey R 2003 Follicle stimulating hormone increases testicular anti-mullerian hormone (AMH) production through Sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH gene. *Mol Endocrinol*. 17:550-561.

- 
- Mackay S, Smith RA. 2007 Effects of growth factors on testicular morphogenesis. *Int Rev Cytol.* 260:113-173.
- Mc Laren 1999. Signalling for germ cells. *Genes Dev* 13:373-376
- Manikkam M, Steckler TL, Welch KB, Inskeep EK, Padmanabhan V. 2006 Fetal programming: prenatal testosterone treatment leads to follicular persistence/luteal defects. Partial restoration of ovarian function by cyclic progesterone treatment. *Endocrinology* 147:1997–2007.
- Martin OV, Shialis T, Lester JN, Scrimshaw MD, Boobis AR, Voulvoulis N. 2008. Testicular dysgenesis syndrome and the estrogen hypothesis: a quantitative meta-analysis. *Environ Health Perspect.* 116:149-157
- Masek KS, Wood RI, Foster DL. 1999. Prenatal dihydrotestosterone differentially masculinizes tonic and surge modes of luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 140:3459-3466
- Mauleon P. 1961 Deroulement de l'ovogenese compare chez differentd mammiferes domestiques. *Proceedings of IV international Congress of Animal Reproduction, The Hague*, pp 348-354.
- Matsumoto A. 1996 Spermatogenesis. In *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. Vol 1. Eds. Adashi E, Rock J and Rosenwaks Z.
- McLachlan JA. 2001 Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev.* 22:319-341.
- Merlet J, Racine C, Moreau E, Moreno SG, Habert R. 2007 Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:3615-3620.
- Morí, H., Christensen, A. K. 1980 Morphometric analysis of Leydig celis in the normal rat testis. *J. Cell. Biology.* 84: 340-354.
- Mori C. 2001 Possible effects of endocrine disruptors on male reproductive function. *Kaibogaku Zasshi* 76:361-368.
- Mruk DD, Cheng CY. 2004 Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev.* 25:747-806
- Mulchahey JJ, DiBlasio AM, Martin MC, Blumenfeld Z, Jaffe RB. 1987 Hormone production and peptide regulation of the human fetal pituitary gland. *Endocr Rev.* 8:406-425
- Mullaney BP, Rosselli M, Skinner MK. 1994 Developmental regulation of Sertoli cell lactate production by hormones and the testicular paracrine factor, PModS. *Mol Cell Endocrinol.* 104:67-73.
- New MI 2001. Factors determining final height in congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14(Suppl 2):933–937.
- New MI, Carlson A, Obeid J, Marshall I, Cabrera MS, Goseco A, Lin-Su K, Putnam AS, Wei JQ, Wilson RC 2001. Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5651–5657

- 
- Norton JN, Vigne JL, Skinner MK. 1994 Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: analysis of common signal transduction pathways. *Endocrinology*. 134:149-157.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 22: 289-318.
- Orth, JM. 1984. The role of follicle stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rat. *Endocrinology* 115:1248-1255.
- Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. 1988. Evidence from Sertoli-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on number of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122: 787-794
- Orvis GD, Jamin SP, Kwan KM, Mishina Y, Kaartinen VM, Huang S, Roberts AB, Umans L, Huylebroeck D, Zwijsen A, Wang D, Martin JF, Behringer RR. 2008. Functional redundancy of TGF-beta family type I receptors and receptor-Smads in mediating anti-Mullerian hormone-induced Mullerian duct regression in the mouse. *Biol Reprod* 78:994-1001
- Ozanne SE. 2001 Metabolic programming in animals. *Br Med Bull* 60:143–152.
- Padmanabhan V, Manikkam M, Recabarren S, Foster D. 2006 Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic dysfunction in the female. *Mol Cell Endocrinol*. 246:165-174.
- Pasqualini T, Chemes H, Rivarola MA. 1981. Testicular testosterone levels during puberty in cryptorchidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*15545-1554
- Payen E, Pailhoux E, Abou Merhi R, Gianquinto L, Kirszenbaum M, Locatelli A, Cotinot C. 1996 Characterization of ovine SRY transcript and developmental expression of genes involved in sexual differentiation. *Int J Dev Biol*. 40:567-575.
- Payen E, Pailhoux E, Gianquinto L, Hayes H, Le Penne N, Bezard J, Cotinot C. 1997 The ovine SOX2 gene: sequence, chromosomal localization and gonadal expression. *Gene*. 189:143-147
- Picon R. 1969 Action of the fetal testis on the development in vitro of the Müllerian ducts in the rat. *Arch Anat Microsc Morphol Exp*. 58:1-19
- Plant TM, Marshall GR. 2001 The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocrine Reviews* 22, 764-786.
- Pierik FH, Vreeburg JT, Stijnen T de Jong FH and Weber RF. 1998. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 83 3110-3114.
- Portela A, Esteller M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 28:1057-1068.
- Prince FP. 2001. The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *J Endocrinol* 168:213-216
- Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS. 1995 Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev*. 16:271-321.

- 
- Quirke LD, Juengel JL, Tisdall DJ, Lun S, Heath DA, McNatty KP. 2001. Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. *Biol Reprod.* 65:216-228
- Rae MY, Rhind SM, Fowler PA, Miller DW, Kyle CE, Brooks AN. 2002. Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetus. *Reproduction* 124: 33-39.
- Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE. 1999 Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:3836-3844.
- Recabarren SE, A. Lobos, E. Codner, V. Padmanabhan, D.L. Foster. 2003. Insulin sensitivity indices of male and female lamb differ during early postnatal period in the absence of differences in detectable sex steroids. 85th Endocrine meeting of the Endocrine Society, USA. Abstract P2-256. Philadelphia, USA, 19-22 June, 2003
- Recabarren SE, Padmanabhan V, Codner E, Lobos A, Durán C, Vidal M, Foster DL, Sir-Petermann T. 2005b. Postnatal consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated prenatally with testosterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:801-806.
- Recabarren SE, Sir-Petermann T, Maliqueo M, Lobos A, Rojas-García P. 2006 Prenatal exposure to androgens as a factor of fetal programming. *Rev Med Chil.* 134:101-108.
- Recabarren SE, Lobos A, Figueroa Y, Padmanabhan V, Foster DL, Sir-Petermann T. 2007 Prenatal testosterone treatment alters LH and testosterone responsiveness to GnRH agonist in male sheep. *Biol Res.* 40:329-338
- Recabarren SE, Rojas-García PP, Recabarren MP, Alfaro VH, Smith R, Padmanabhan V, Sir-Petermann T. 2008. Prenatal testosterone excess reduces sperm count and motility. *Endocrinology* 149:6444-6448.
- Reed CE, Fenton SE. 2013. Exposure to diethylstilbestrol during sensitive life stages: a legacy of heritable health effects. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 99:134-146
- Reisch N, Flade L, Scherr M, Rottenkolber M, Pedrosa Gil F, Bidlingmaier M, Wolff H, Schwarz HP, Quinkler M, Beuschlein F, Reincke M. 2009. High prevalence of reduced fecundity in men with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:1665-1670
- Rey R, Al-Attar L, Louis F, Jaubert F, Barbet P, Nihoul-Fékété C, Chaussain JL, Josso N. 1996a Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-Müllerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *Am. J. Pathol.* 148: 1689–1698
- Rey R, Lhommé C, Marcillac I, Lahlou N, Duvillard P, Josso N, Bidart JM. 1996b Anti-Müllerian hormone as a serum marker of granulosa-cell tumors of the ovary: comparative study with serum alpha-inhibin and estradiol. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174:958–965.
- Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarrás P. 2003 AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol.* 211:21-31.
- Rhind SM, Rae MT, Brooks AN. 2001 Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122: 205–214-



---

Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER. 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:7986-7991.

Robinson JE, Birch RA, Taylor JA, Foster DL, Padmanabhan V. 2002. In utero programming of sexually differentiated gonadotrophin releasing hormone (GnRH) secretion. *Domest Anim Endocrinol*. 23:43-52-

Robinson JE, Birch RA, Grindrod JA, Taylor JA, Unsworth WP. 2003. Sexually differentiated regulation of gnRH release by gonadal steroid hormones in sheep. *Reprod Suppl*. 61:299-310

Rochira V, Balestrieri A, Madeo B, Spaggiari A, Carani C. 2002. Congenital estrogen deficiency in men: a new syndrome with different phenotypes; clinical and therapeutic implications in men. *Mol Cell Endocrinol*. 193:19-28.

Rojas-García,P.P. Recabarren MP, Sarabia L, Schön J, Gabler Ch, Einspanier R, Maliqueo M, Sir-Petermann T, Rey R, Recabarren SE. 2010 Prenatal testosterone excess alters Sertoli and germ cell number and testicular FSH receptor expression in rams. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 299: E998-E1005

Ross MG, Desai M. 2005. Gestational programming: population survival effects of drought and famine during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R25–R33.

Roselli CE, Stadelman H, Reeve R, Bishop CV, Stormshak F. 2007. The ovine sexually dimorphic nucleus of the medial preoptic area is organized prenatally by testosterone. *Endocrinology* 148:4450-4457

Roselli CE, Estill CT, Stadelman HL, Meaker M, Stormshak F. 2011. Separate critical periods exist for testosterone-induced differentiation of the brain and genitals in sheep. *Endocrinology* 152:2409-2415

Rosser C, Herkimer C, Sarma HN, Recabarren SE, Dunaif A, Padmanabhan V. 2003 Fetal programming: prenatal exposure to excess testosterone programs hyperinsulinemia. *Biol Reprod* 68(Suppl 1):293(Abstract 440).

Roullier-Fabre V, C. Levacher, C. Pairault, C. Racine, E. Moreau, R. Olasso, G. Livera, S. Migrenne, G. Delbes, R. Habert. **2003**. Development of the foetal and neonatal testis. *Andrologia* 35:79-83

Rota A, Ballarin C, Vigier B, Cozzi B, Rey R. 2002 Age dependent changes in plasma anti-Mullerian hormone concentrations in the bovine male, female, and freemartin from birth to puberty: relationship between testosterone production and influence on sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol*. 129:39–44.

Russell LD, Peterson RN. 1985. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *Int Rev Cytol*.94:177-211.

Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. 2004 Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol*. 266:201-208.

Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. 2005 Expression of Sox8, Sf1, Gata4, Wt1, Dax1, and Fog2 in the mouse ovarian follicle: implications for the regulation of Amh expression. *Mol Reprod Dev*. 70:271-277.

- 
- Schmahl J, Kim Y, Colvin JS, Ornitz DM, Capel B. 2004 Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development*. 131:3627-3636.
- Sharma TP, Herkimer C, West C, Ye W, Birch R, Robinson JE, Foster DL, Padmanabhan V. 2002. Fetal programming: prenatal androgen disrupts positive feedback actions of estradiol but does not affect timing of puberty in female sheep. *Biol Reprod*. 66: 924-933.
- Sharpe RM. 1998 The roles of oestrogen in the male. *Trends Endocrinol Metab* 9:371-377
- Sharpe RM, Skakkebaek NE. 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341:1392-1395.
- Sharpe RM, Atanassova N, McKinnell C, Parte P, Turner KJ, Fisher JS, Kerr JB, Groome NP, Macpherson S, Millar MR, Saunders PT. 1998. Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats treated neonatally with diethylstilbestrol: a possible role for estrogens in Sertoli cell development. *Biol Reprod* 59:1084-1094
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cell, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125: 769-784.
- Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. 1994 Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77:651-661.
- Sibley C, Glazier J & D'Souza S 1997 Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Expl Physiol* 82 389-402.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, y col. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*.15 :342-355.
- Skakkebaek NE, Rajpert-de Meyts E and Main KM. 2001 Testicular dysgenesis syndrome : an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction* 16: 972-978
- Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. 2011. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reprod Toxicol*.31:337-43
- Sklar CA, Mueller PL, Gluckman PD, Kaplan SL, Rudolph AM, Grumbach MM. 1981 Hormone ontogeny in the ovine fetus. VII. Circulating luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in mid- and late gestation. *Endocrinology*. 108:874-880.
- Sridharan S, Brehm R, Bergmann M, Cooke PS. 2007 Role of connexin 43 in Sertoli cells of testis. *Ann N Y Acad Sci*. 1120:131-143.
- Stanton PG. 2016. Regulation of the blood-testis barrier. *Semin Cell Dev Biol*. S1084-9521(16)30179-30183, DOI 10.1016/j.semcdb.2016.06.018. [Epub ahead of print]
- Stel J, Legler J. 2015. The role of epigenetic in the latent effects of early life exposure to obesogenic endocrine disrupting chemicals. *Endocrinology* 156: 3466-3472.

- 
- Sweeney T, Saunders PT, Millar MR, Brooks AN. 1997 Ontogeny of anti-müllerian hormone, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and androgen receptor expression during ovine total gonadal development. *J Endocrinol.* 53:27-32.
- Sweeney T, Nicol L, Roche JF, Brooks AN. 2000. Maternal exposure to octylphenol suppresses ovine fetal follicle-stimulating hormone secretion, testis size, and sertoli cell number. *Endocrinology* 141:2667-2673
- Tabb MM, Blumberg B. 2006. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol Endocrinol.* 20:475-482
- Taguchi O, Cunha GR, Lawrence WD, Robboy SJ. 1984 Timing and irreversibility of Müllerian duct inhibition in the embryonic reproductive tract of the human male. *Dev Biol.* 106:394-398.
- Thomas GB, McNeilly AS, Gibson F, Brooks AN. 1994. Effects of pituitary-gonadal suppression with gonadotrophin releasing hormone agonist on fetal gonadotrophin secretion, gonadal development and maternal steroid secretion in the sheep. *J Endocrinol* 141: 317-324.
- van Haaster LH, de Jong FH, Docter R, de Rooij DG. 1993. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. *Endocrinology* 133:755-760.
- Veurink M, Koster M, Berg LT. 2005. The history of DES, lessons to be learned. *Pharm World Sci.* 27:139-143.
- Viger RS, Mertineit C, Trasler JM, Nemer M. 1998 Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. *Development.* 125:2665-2675.
- Viguera-Villaseñor RM, Moreno-Mendoza NA, Reyes-Torres G, Molina-Ortiz D, León MC, Rojas-Castañeda JC. 2006. The effect of estrogen on testicular gonocyte maturation. *Reprod Toxicol* 22:513-520.
- Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA. 1994 Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134:2307-2316.
- Wang PY, Koishi K, McGeachi AB, Kimber M, Maclaughlin DT, Donahoe PK, McLennan IS. 2005. Müllerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor *in vitro*. *PNAS* 102: 16421-16425.
- Wittmann W, McLennan IS. 2011. The male bias in the number of Purkinje cells and the size of murine cerebellum may require Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone. *J Neuroendocrinol* 23: 831-838.
- Wolf CJ, Hotchkiss A, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray Jr LE 2002 Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study. *Toxicol Sci* 65:71-86
- Yan HH, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2008 Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB J.* 22:1945-1959

---

Yao HH, Barsoum I. 2007. Fetal Leydig cell. En: *The Leydig cell in Health and Disease*, Ed: A.H. Payne y MP Hardy. Cap 3, pp 47-54, Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA.

Zamboni L, Upadhyay S. 1982. The contribution of the mesonephros to the development of the sheep fetal testis. *Am J Anat.* 165:339-356.

Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, Wang RS, Chang YJ, Mendis-Handagama C, Hu L, Lardy H, Chang C. 2006 Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:17718-17723.

Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS, Hess RA. 2002 Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl.* 23:870-881.





# IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN A UN EXCESO DE TESTOSTERONA DURANTE EL DESARROLLO FETAL EN EL EJE GONADAL DE MACHOS OVINOS

Durante el período embrionario-fetal se desarrollan los diversos órganos y se programan sus funciones, siendo particularmente sensible a estímulos de diversa índole. La plasticidad del desarrollo es un concepto que permite explicar los cambios que se producen en el embrión o feto y que alterarían la organogénesis y el funcionamiento de diversos órganos, teniendo su máxima expresión en las alteraciones funcionales que se observan en la vida postnatal, algunas de las cuales se pueden manifestar como síndromes. Los estudios realizados en esta Tesis Doctoral permitieron reconocer la existencia de diferencias en la proliferación y en la apoptosis de células germinales y células de Sertoli, de acuerdo a la edad del individuo. Por otro lado, en machos ovinos prepúberes (24 semanas de edad) nacidos de madres tratadas con testosterona (machos-T) y en machos-T fetales, la expresión de mRNA para AMH fue mayor, concordante con la mayor expresión del mRNA del receptor de FSH. Sin embargo, la expresión del mRNA de los factores de transcripción dependientes de FSH no mostró diferencias entre grupos o edades. El eje gonadal experimentó alteraciones que se manifestaron en diferencias en las características de la secreción pulsátil de LH y en la respuesta de la gónada al estímulo de LH. Las diferencias en la secreción pulsátil de LH podrían estar asociadas a una diferencia en la sensibilidad de la pituitaria a la GnRH. En resumen, la exposición prenatal de machos ovinos a testosterona altera el funcionamiento del eje gonadal ovino. Tras estos hallazgos, se deben iniciar nuevas investigaciones que permitan reconocer los mecanismos epigenéticos involucrados en las alteraciones de la funcionalidad del eje gonadal.

