

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Departamento de Ciencia Animal



**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A TESTOSTERONA SOBRE
PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL TEJIDO
ADIPOSO DE HEMBRAS OVINAS**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO A
LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN,
PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO**

SOFÍA PAZ BELLALTA BREMER

CONCEPCIÓN – CHILE

2018

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Departamento de Ciencia Animal

**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A TESTOSTERONA SOBRE
PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL TEJIDO
ADIPOSO DE HEMBRAS OVINAS**



SOFÍA PAZ BELLALTA BREMER

**TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO A
LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN,
PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO**

CONCEPCIÓN - CHILE

2018

**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A TESTOSTERONA SOBRE
PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL TEJIDO
ADIPOSO DE HEMBRAS OVINAS**

Profesor Patrocinante

**Dr. Daniel Sandoval S.
Médico Veterinario. Dr. Cs
Profesor Asociado**

Profesor Guía



**Dr. Sergio Recabarren M.
Lic. en Biología. M. Cs.
Profesor Emérito**

Profesor Guía

**Dr. Pedro Rojas G.
Médico Veterinario. Dr. Cs.
Profesor Asociado**

**Director Departamento
Ciencia Animal**

**Dr. Rodrigo Allende V.
Médico Veterinario. M. Cs.
Profesor Asociado**

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue financiado a través del proyecto FONDECYT n° 1140433 (2014-2018) y el Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Animal de la Universidad de Concepción, Campus Chillan.



TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO	PÁGINA
I. RESUMEN.....	1
II. SUMMARY.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. MATERIALES Y MÉTODO.....	14
V. RESULTADOS.....	19
VI. DISCUSIÓN.....	27
VII. CONCLUSIONES.....	30
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	41
APÉNDICE.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°	PÁGINA
EN EL TEXTO	
1. Parámetros morfométricos de grasa subcutánea en hembras ovinas. C, control. T, EPT.....	20
2. Parámetros morfométricos de grasa subcutánea en hembras ovinas. C, control. T, EPT.....	22
EN EL APÉNDICE	
3. Partidores de oligonucleótidos utilizados en ensayos qPCR.....	42



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	PÁGINA
EN EL TEXTO	
1. Morfología del tejido adiposo en mamíferos, corte histológico y representación gráfica (adaptado de Villena, 2013; Contreras <i>et al.</i> , 2016).....	4
2. Procesos fisiológicos y metabólicos regulados por el tejido adiposo blanco en mamíferos (adaptado de Esteve, 2014)	6
3. Esquema de metabolización de glucosa y ácidos grasos en el adipocito blanco en mamíferos (adaptado de Badimon <i>et al.</i> , 2015).....	7
4. Esquema de la vía de señalización de la insulina en el adipocito blanco (adaptado de Cannon y Nedergaad, 2004).....	8
5. Esquema cronológico del diseño experimental del estudio. d, días; s, semanas.....	16
6. Microfotografías representativas de GSC en hembras ovinas: fetos y 38 semanas de edad. Barra error 50 μm	19
7. Comparación de parámetros morfométricos de GSC en hembras ovinas.....	21
8. Microfotografías representativas de GV en hembras ovinas: fetos y 38 semanas de edad. Barra error 50 μm	22

9. Comparación de parámetros morfométricos de GV en hembras ovinas.....	23
10. Perfil de expresión de genes de la vía de señalización de la insulina de GSC en hembras ovinas.....	24
11. Perfil de expresión de genes de la vía de señalización de la insulina de GV en hembras ovinas.....	25



I. RESUMEN

EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A TESTOSTERONA SOBRE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL TEJIDO ADIPOSO DE HEMBRAS OVINAS

EFFECTS OF PRENATAL TESTOSTERONE EXPOSURE ON MORPHOMETRIC AND GENETIC PARAMETERS IN THE ADIPOSE TISSUE OF EWES

La exposición prenatal a un exceso de testosterona (EPT) ha evidenciado un efecto reprogramador en la función metabólica de la descendencia, sin embargo aún no hay claridad en la repercusión directa sobre el tejido adiposo, un órgano esencial en la regulación de energía en respuesta a la insulina. El objetivo de este estudio fue determinar si la EPT tiene un impacto sobre la morfología y expresión génica del tejido adiposo subcutáneo (GSC) y visceral (GV). Muestras de tejido adiposo de hembras ovinas EPT fueron evaluadas en fetos de 120 días de gestación (120 dg) y en individuos puberales (38 semanas de edad). Cortes histológicos de las muestras fueron evaluadas para un análisis morfométrico considerando densidad, área, perímetro y diámetro mayor. Posterior a eso se analizó la expresión génica de los elementos de la vía de señalización de la insulina a través de ensayos qPCR. Las hembras EPT no manifestaron cambios durante la etapa fetal, sin embargo, durante la etapa puberal se evidenció una hipertrofia de las células del tejido adiposo en GV ($P < 0,05$), y no así en GSC. En cuanto al perfil de expresión de la vía de la insulina, la EPT en etapa fetal demostró un efecto supresor de los factores de la vía en GSC y GV, mientras que a las 38 semanas un efecto supresor de la expresión de GLUT4 en GSC ($P < 0,05$) y promotor en GV ($P < 0,05$), con un aumento destacado en la expresión de Akt. Estos resultados sugieren que la EPT repercute en el metabolismo del tejido adiposo de hembras, siendo GV más sensible a los efectos de la testosterona.

Palabras clave: reprogramación fetal, testosterona, tejido adiposo, ovinos.

II. SUMMARY

EFFECTS OF PRENATAL TESTOSTERONE EXPOSURE ON MORPHOMETRIC AND GENETIC PARAMETERS IN THE ADIPOSE TISSUE OF EWES

Prenatal exposure to an excess of testosterone (PTE) provide evidence on the programming effect associated to metabolic consequences on the offspring. Little is known about the direct effect on adipose tissue, an essential organ in response to insulin. The aim of this study was to evaluate if PTE has an impact on morphometric and genetic parameters of subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissue. Samples of PTE and control ewes were evaluated on fetal (120 gestational days) and pubertal stage (38 weeks old). Histologic sampling was performed for morphometric analysis considering density, area, perimeter and diameter. Later, qPCR assays were performed to evaluate the expression of elements involved in the insulin receptor signaling pathway. There were no differences during foetal stage, yet PTE ewes during pubertal stage resulted on hypertrophic VAT ($P < 0,05$), while no changes in SAT. Regarding the expression profile of the insulin pathway, PTE was decreased in SAT and VAT during foetal stage. At 38 weeks old, SAT indicated a decrease in final GLUT4 expression ($P < 0,05$), although VAT manifested an increase in the pathway ($P < 0,05$), with a notable overexpression of Akt. These results are consistent with the hypothesis that PTE induces changes in female adipose tissue and its metabolism, being VAT more sensitive to these effects.

Key words: fetal programming, testosterone, adipose tissue, ewes.

III. INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo representa entre el 3 y 70% del peso corporal en humanos adultos (Hausman *et al.*, 2001). Una de sus principales características es la sensibilidad que presenta frente a modificaciones en el balance de energía e ingreso de nutrientes, por lo que alteraciones en estos factores desde edades tempranas podrían repercutir sobre su proceso de desarrollo y funcionamiento.

El tejido adiposo forma parte del tejido conectivo y está compuesto por adipocitos, células que almacenan lípidos en su citoplasma. Se encuentran rodeados de tejido conectivo altamente vascularizado e innervado y a la vez contiene macrófagos, fibroblastos y células precursoras. Dentro de sus funciones, los adipocitos tienen un rol crítico en la homeostasis de la energía, no solo almacenando triglicéridos, sino que también en el control de la termogénesis bajo señales neuroendocrinas, ingesta de alimentos, inmunidad y función neuroendocrina (Ahima, 2006).

El tejido adiposo se clasifica en 3 tipos: tejido blanco (white adipose tissue, WAT); tejido pardo (brown adipose tissue, BAT); y tejido blanco/pardo (brown and white adipose tissue, BRITE). El tejido adiposo blanco se compone histológicamente por adipocitos con una única vacuola (uniloculares), escaso citoplasma y núcleo excéntrico. Su principal función es almacenar energía. Por otra parte, el tejido adiposo pardo está conformado por adipocitos con múltiples vacuolas (multiloculares) que tienen como función generar energía térmica gracias a su gran cantidad de mitocondrias. Predomina en estado fetal y en mamíferos que hibernan. Este tejido sufre reemplazo y transdiferenciación progresiva a blanco durante la etapa postnatal (Villena, 2013). Finalmente, el tejido adiposo blanco/pardo presenta características intermedias, desarrollando vacuolas de diferentes tamaños y múltiples mitocondrias (Rosenwald y Wolfrum, 2014). Los tres tipos celulares difieren en aspectos anatómicos, morfológicos, bioquímicos, funcionales y genéticos (Symonds *et al.*, 2012) (Figura 1).

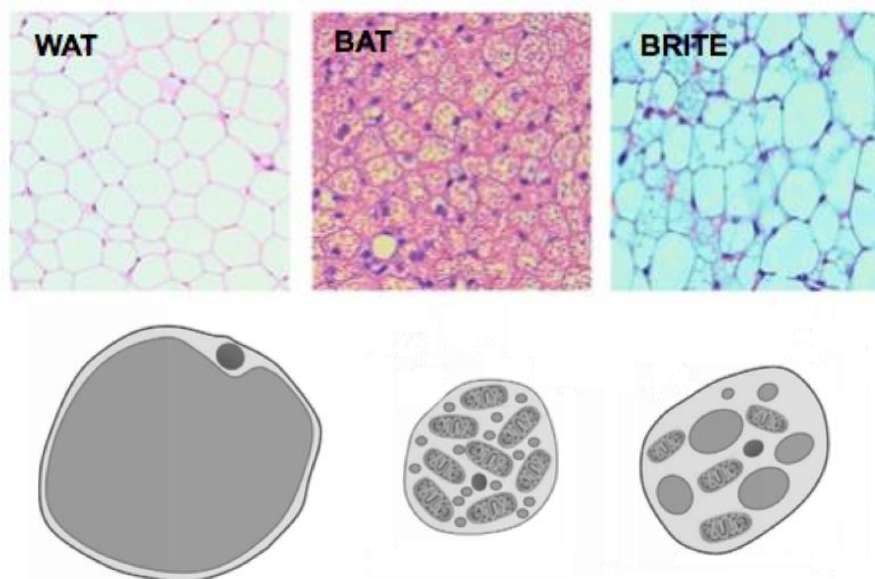


Figura 1. Morfología del tejido adiposo en mamíferos, corte histológico y representación gráfica (adaptado de Villena, 2013; Contreras *et al.*, 2016). WAT, tejido adiposo blanco. BAT, tejido adiposo pardo. BRITE, tejido adiposo mixto.

El tejido predominante en individuos adultos es el WAT y se caracteriza por sus células poliédricas con una gran vacuola para almacenar ácidos grasos. El citoplasma es pequeño por lo que solo es posible evidenciar el núcleo conjunto a la membrana citoplasmática y la vacuola que almacena lípidos (Rosenwald y Wolfrum, 2014). En mamíferos este tejido se localiza a nivel subcutáneo general, más específicamente en miembros posteriores y zona abdominal (Hausman *et al.*, 2001; Tchkonja *et al.*, 2013; Esteve, 2014); y rodeando vísceras, principalmente omento, mesenterio, riñones y pericardio (Ahima, 2006; Sarr *et al.*, 2012).

Adipogénesis

El proceso de desarrollo y diferenciación de los adipocitos se define como adipogénesis. Este proceso comienza el día 30 de la gestación en ovinos, posterior a la formación del páncreas, y su aumento es pronunciado hacia el término de la gestación (Symonds *et al.*, 2012). Los periodos críticos de establecimiento de la población de adipocitos son la edad fetal y durante la adolescencia (Rosen y Spiegelman, 2014).

Durante el desarrollo fetal, grupos de células mesenquimales se condensan próximos a vasos sanguíneos, comienzan un periodo de proliferación y diferenciación en preadipocitos. Posterior a esto, desarrollan lóbulos de grasa y se convierten en adipocitos maduros. El proceso culmina al adquirir su capacidad endocrina con secreción de adipocinas (Poissonnet *et al.*, 1983; Sarr *et al.*, 2012). La diferenciación es regulada por múltiples factores transcripcionales, siendo el principal el factor proliferador de peroxisoma (PPAR gamma) en el tejido adiposo blanco (Hausman *et al.*, 2001; Sarjeant y Stephens, 2012; Sarr *et al.*, 2012; Esteve, 2014). Esta diferenciación también puede desarrollarse a nivel postnatal pero en menor porcentaje (Sarret *et al.*, 2012).

Una vez maduro, la célula manifiesta su potencial de almacenaje y regulación de energía. Con el aumento excesivo de energía que ingresa en forma de glucosa y ácidos grasos, la célula los metaboliza y esto conlleva a cambios morfológicos producto de su acumulación. En primera instancia ocurre la hipertrofia, donde cada célula crece producto de la acumulación de lípidos en vacuolas únicas. Una vez saturada y sin posibilidad de expansión, la célula puede sufrir una ruptura con migración de macrófagos a la zona o resultar en un aumento en la producción de adipocinas proinflamatorias (TNF α , MCP-1 e IL1 β) que colaboran en el proceso (Kang *et al.*, 2016) y reclutar a más preadipocitos para formar nuevos adipocitos, proceso denominado hiperplasia (Van Harmelen *et al.*, 2003; Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2017).

El tejido adiposo participa activamente en la homeostasis de la energía. Por un lado responde constantemente a las modificaciones del balance de energía e ingreso de nutrientes, lo que altera ciertos parámetros como proliferación de preadipocitos y su diferenciación en adipocitos maduros, hipertrofia de estos y finalmente apoptosis (Hausman *et al.*, 2001). Por otro lado, cumple una función endocrina al secretar leptina, adiponectina y resistina, entre una serie de otros factores involucrados en el metabolismo. La leptina es una hormona que actúa regulando de forma negativa el apetito: estimula la producción de péptidos anorexigénicos y disminuye los orexigénicos al interactuar con el receptor de leptina (LR) a nivel del núcleo

arqueado en el hipotálamo (Ahima, 2006). La adiponectina es una proteína cuya función es aumentar la sensibilidad a la insulina, promoviendo oxidación de ácidos grasos, supresión de gluconeogénesis en el hígado e inhibiendo la migración de monocitos (Ahima, 2006). Por su parte, la resistina es una proteína que promueve la inflamación al estimular la síntesis de factores proinflamatorios y aumenta con la expansión de la masa adiposa (Ahima, 2006; Esteve, 2014; Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2017) (Figura 2).

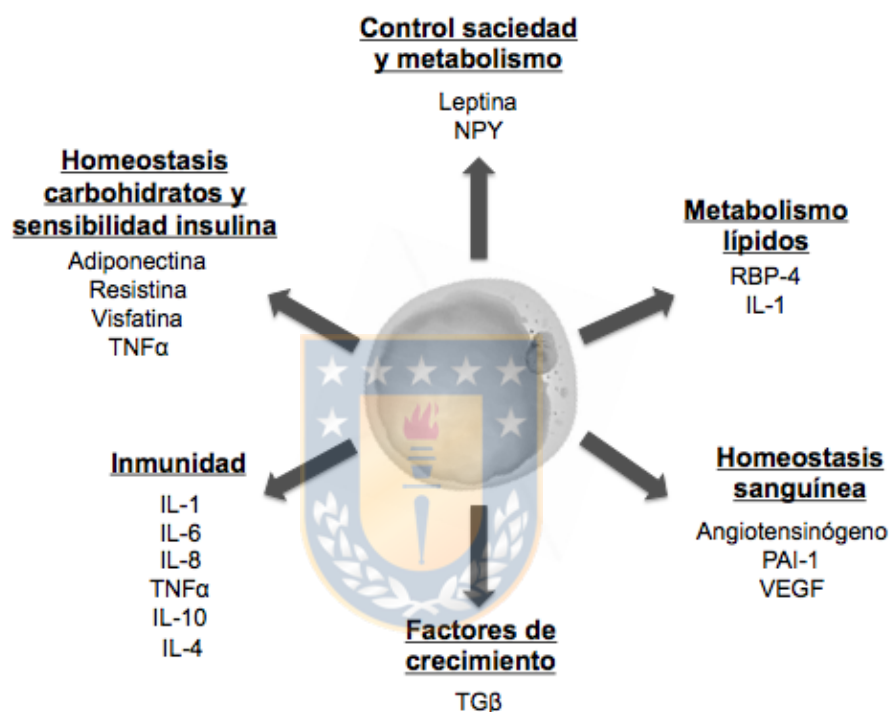


Figura 2. Procesos fisiológicos y metabólicos regulados por el tejido adiposo blanco (adaptado de Esteve, 2014). IL-1, Interleucina 1; IL-6, Interleucina 6; IL-8, Interleucina 8; IL-10, Interleucina 10; IL-4, Interleucina 4; TNF alfa, Factor de Necrosis Tumoral alfa; TGF beta, Factor de crecimiento transformante beta; NPY, Neuropeptido Y; RBP-4, Proteína de unión a retinol 4; PAI-1, Plasminógeno activador/inhibidor-1; VEGF, Factor de crecimiento endotelial vascular.

Para el ingreso y almacenamiento de energía dentro de las células participa la insulina, hormona peptídica producida en el páncreas encargada de estimular los procesos de lipogénesis y lipólisis en tejido graso (Rosenfield y Ehrmann, 2016). La insulina permite la captación de glucosa en células diana y la síntesis de proteínas,

crecimiento y diferenciación celular principalmente en hígado, tejido adiposo y músculo (Padmanabhan *et al.*, 2006; Boucher *et al.*, 2014).

Con el aumento de los niveles de glucosa, insulina y ácidos grasos post prandial, se activa la vía metabólica interna de la célula que permite el ingreso de glucosa (Boucher *et al.*, 2014). Esta molécula se descompone en el proceso del ciclo de Krebs, para así llevar a su transformación y almacenamiento en forma de triglicéridos. Durante este proceso la insulina activa la enzima acetil-CoA carboxilasa en el citoplasma que permite la formación de ácido grasos (Witters *et al.*, 1988). Al mismo tiempo, permite el ingreso de ácidos grasos hacia la célula (Badimon *et al.*, 2015). Por otro lado, la insulina disminuye la lipólisis debido a que inhibe la enzima lipasa sensible a hormonas (HSL), desencadenando una baja en la tasa de movilización externa de ácidos grasos desde el adipocito (Dimitriadis *et al.*, 2011). Al contrario, la caída de glucosa e insulina durante el ayuno permite la acción de la HSL estimulada por catecolaminas, lo que resulta en un estímulo para la lipólisis dentro del adipocito y así utilizar las reservas de energía (Ahima, 2006) (Figura 3).

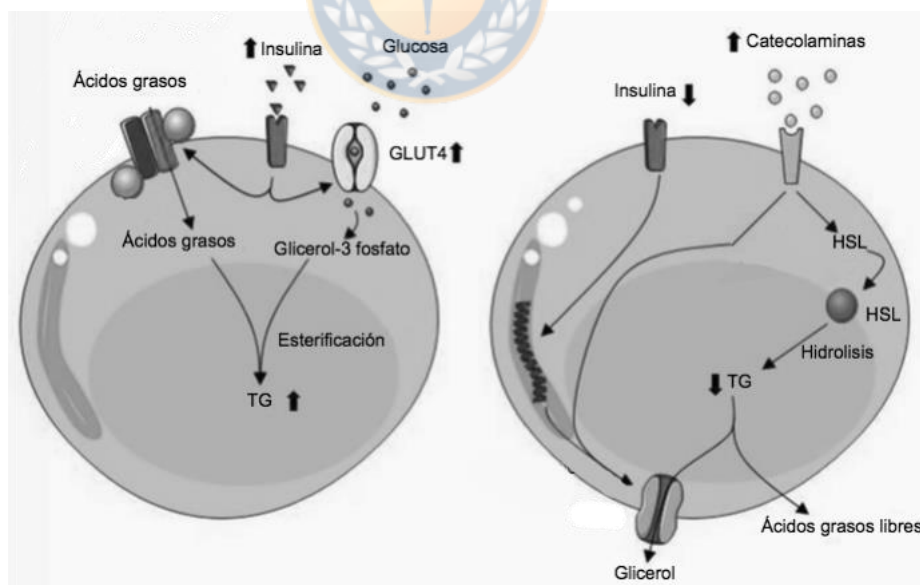


Figura 3. Esquema de metabolización de glucosa y ácidos grasos en el adipocito blanco en mamíferos (adaptado de Badimon *et al.*, 2015). Derecha, lipólisis. HSL, Lipasa Sensible a Hormonas. TG, Triacilglicéridos.

Vía de señalización de la insulina en el tejido adiposo

La acción biológica de la insulina sobre el tejido adiposo depende en primer lugar de la interacción con su receptor de membrana (IR). Está conformado por una proteína tetramérica con dos subunidades extracelulares y dos transcelulares, que una vez conjunto al ligando, la proteína manifiesta un cambio conformacional que lleva a la activación de sus sustratos: insulín receptor substrate IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4. Estas moléculas producen el reclutamiento de la enzima fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) que promueve al segundo mensajero de la proteína de membrana para activar una señalización descendente a través de la proteína quinasa B (PKB/Akt). Finalmente se activa la proteína quinasa C (PKC), lo que resulta en una migración de vesículas intracelulares que contienen al transportador de glucosa GLUT4 ya sintetizado y su fusión con la membrana plasmática para la captación e internalización de glucosa (Boucher *et al.*, 2014) (Figura 4).

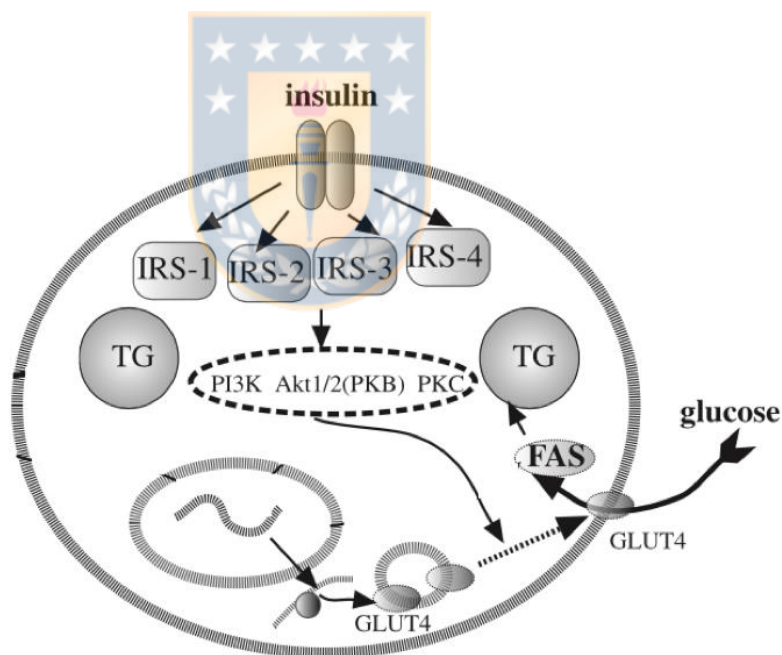


Figura 4. Esquema de la vía de señalización de la insulina en el adipocito blanco (adaptado de Cannon y Nedergaad, 2004). IRS, sustrato del receptor de insulina (1-4). PI3K, fosfatidilinositol 3-cinasa. Akt1/2/ PKB, proteína quinasa B. PKC, proteína quinasa C. FAS, enzima sintasa ácidos grasos. GLUT4, transportador de glucosa tipo 4. TG, triglicéridos.

La intensidad y duración de la vía de señalización juega un rol importante en la especificidad de la respuesta y sus efectos fenotípicos, por lo tanto, la habilidad de desactivar la señal de la insulina en diferentes niveles es determinante (Boucher *et al.*, 2014). Algunos de los mecanismos inhibitorios pueden estar alterados en condiciones fisiopatológicas llevando así a una disminución de su sensibilidad y consecuente resistencia insulínica (RI) (Boucher *et al.*, 2014). La RI se define como la deficiente captación de la glucosa por los diferentes tejidos y la incapacidad de mantener la euglucemia, con la supresión de la síntesis de glucosa a nivel hepático y lipólisis, resultando en un aumento de los requerimientos de insulina (Khan, 1985; Bergman, 2005; Padmanabhan *et al.*, 2006).

Una actividad fuera de la vía de señalización podría llevar a perturbaciones en el metabolismo y homeostasis (Boucher *et al.*, 2014). A la vez, esta vía resulta sensible a señales externas ya que depende de diversos estímulos extracelulares para su correcto funcionamiento (Boucher *et al.*, 2014). En este sentido, incluso desde la etapa fetal, podría estar expuesto a distintos factores que potencialmente modificarían esta vía de señalización (Nada *et al.*, 2010).

Reprogramación fetal

La reprogramación fetal ha sido definida como el readecuamiento fisiológico por efecto de un estímulo o insulto precoz en un periodo del desarrollo fetal, lo que resulta en consecuencias funcionales, adversas a largo plazo (Barker, 2008). El proceso por el cual ocurre la reprogramación fetal es mediante la inducción, delección o impedimento del desarrollo de ciertas estructuras somáticas, como resultado de un estímulo durante un periodo crítico (Lucas, 1998). Estos periodos del desarrollo embrionario de mayor plasticidad, también llamados ventanas críticas del desarrollo, podrían permitir la modificación de la expresión de genes relevantes (Barker, 2008). Se ha establecido que un órgano o tejido específico puede ser programado *in utero* durante el desarrollo fetal y provocar consecuencias adversas en su función en la vida postnatal (Recabarren *et al.*, 2008).

Diferentes estudios han determinado que factores nutricionales, drogas, toxinas, hormonas tales como la insulina, los factores de crecimiento insulinosímiles (IGF), glucocorticoides y esteroides sexuales como la testosterona actuarían como señales endocrinas o de maduración, que adaptarían el desarrollo fetal a condiciones intrauterinas adversas, alterando las condiciones de sobrevivencia tanto *in utero* como en la vida postnatal (Recabarren *et al.*, 2008; Sarr *et al.*, 2012; Seki *et al.*, 2012).

Testosterona como disruptor endocrino

Entre los esteroides androgénicos se encuentra la testosterona, hormona sintetizada por células de Leydig en el testículo, ovario, glándulas adrenales y placenta (Miller y Auchus, 2011). Sus receptores están ubicados en el interior del núcleo regulando de forma directa los procesos transcripcionales (Mayes y Watson, 2004) y puede cumplir un rol tanto estimulatorio como inhibitorio de genes en el desarrollo *in utero* (Padmanabhan *et al.*, 2006). Este tipo de andrógeno tiene la capacidad de regular el crecimiento de tejidos al controlar las tasas de proliferación celular, apoptosis y diferenciación en tejidos fetales (Padmanabhan *et al.*, 2006). Se encuentra involucrado en la señalización de recursos y nutrientes disponibles para el crecimiento de los tejidos fetales, así tiene un papel que podría determinar cambios fenotípicos del feto (Fowden y Forhead, 2009).

Se ha determinado que la exposición prenatal a andrógenos actúa como un factor de reprogramación fetal que ha desencadenado efectos adversos sobre la función reproductiva y metabólica (Recabarren *et al.*, 2009; Mahoney y Padmanabhan, 2010; Hogg *et al.*, 2011; Lazic *et al.*, 2011). El efecto de la señalización anormal de este andrógeno durante ventanas críticas de la gestación genera condiciones adversas que demuestran disrupción en la homeostasis y señalización de glucosa/insulina y podría llevar a condiciones postnatales que asemejan resistencia a la insulina en individuos sanos (Nada *et al.*, 2010).

Durante los últimos años, distintos estudios han demostrado que el exceso de testosterona durante la gestación retarda el crecimiento intrauterino y produce individuos de bajo peso al nacimiento en distintas especies, sin embargo, desencadena una resistencia a la insulina en la descendencia de hembras (Recabarren *et al.*, 2005). Se describe la presencia de receptores de andrógenos en el páncreas y una exposición de testosterona en exceso durante su organogénesis podría alterar el desarrollo y posterior funcionamiento (Eisner *et al.*, 2000; Recabarren *et al.*, 2005). Este efecto se ha inducido con administración exógena, por lo que sugiere que la reprogramación ocurre vía acción androgénica (Recabarren *et al.*, 2005; Mahoney y Padmanabhan *et al.*, 2010). A la vez, esta resistencia a la insulina ha registrado aumento en el tamaño de adipocitos y dislipidemia (Alexanderson *et al.*, 2007).

Del mismo modo, en condiciones *in vitro*, estudios han demostrado que el tratamiento crónico con testosterona induce RI en adipocitos subcutáneos en mujeres, alterando la vía de señalización desde su receptor de membrana, asociando la reducción del 50% en la tasa de lipólisis inducida por catecolaminas debido a la inhibición de la lipasa sensible a hormonas (HSL) en grasa subcutánea, pero no así en grasa visceral; y a la reducción en niveles de leptina (Dicker *et al.*, 2004).

En relación a los antecedentes mencionados, se considera que la testosterona podría tener un efecto reprogramador en el tejido graso, alterando la captación de glucosa tanto en etapa fetal como postnatal, siendo un símil a la situación patológica del síndrome de ovario poliquístico (PCOS) en mujeres gestantes, condición caracterizada por una disfunción de la esteroidogénesis ovárica generando como resultado hiperandrogenismo (Sir-Petermann *et al.*, 2002). El PCOS se encuentra en estrecha relación con la resistencia a la insulina (RI) en la descendencia, por lo que juega un papel decisivo en las consecuencias metabólicas de ésta a largo plazo, entre las que destacan el desarrollo precoz de síndrome metabólico, diabetes tipo II y enfermedad cardiovascular (Sir-Petermann *et al.*, 2012). Esta repercusión en el

metabolismo se atribuye a factores del ambiente al no ser evidenciadas de forma *in vitro* (Corbould y Dunaif, 2007).

Modelo experimental de PCOS en ovinos

Debido a que el diagnóstico de PCOS se realiza por exclusión, múltiples modelos en animales han sido utilizados para replicar las condiciones y descartar factores genéticos de la patología (Franks, 2012). El modelo ovino ha sido una herramienta validada para estos estudios, y durante los últimos años se ha utilizado a esta especie para demostrar los efectos de la exposición prenatal a testosterona, considerando semejanzas en aspectos endocrino-reproductivos con la mujer y el fácil manejo de la especie (Abbott *et al.*, 2007; Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2013). El modelo ovino ha concluido características reproductivas y metabólicas concordantes con el PCOS (Recabarren *et al.*, 2005). Tanto mujeres con PCOS como su descendencia presentan desbalances como bajo peso al nacimiento y a largo plazo resistencia a la insulina, aumento de tejido adiposo, alteración en niveles de triglicéridos, colesterol y disfunción pancreática (Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2013).

A través del modelo ovino se ha estudiado particularmente lo que sucede con la insulina. Padmanabhan *et al.* (2010) demostraron RI inducida por la testosterona, con el aumento compensatorio de insulina para mantener la glicemia. Esto repercute en los tejidos que presentan receptores de insulina, como es el caso del tejido adiposo, pero se desconoce la respuesta específica de la cascada de señalización de la insulina y su efecto en la célula adiposa. Existe evidencia de un aumento en la expresión de genes que codifican la vía de señalización de la insulina en el tejido adiposo de ovejas y mujeres tratadas prenatalmente con dosis excesivas de testosterona (Nada *et al.*, 2010). Sin embargo, en la actualidad no existen estudios concordantes con lo que sucede a dosis que podrían asimilar de mejor forma las condiciones tisulares de PCOS en mujeres.

Estas observaciones sugieren que la exposición prenatal a testosterona puede actuar como un disruptor endocrino y modificar la expresión de genes *in utero*

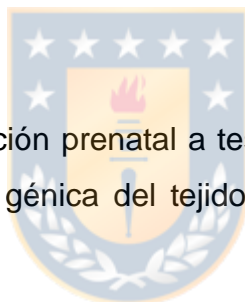
(Fowden y Forhead, 2009). La exposición prenatal a testosterona (EPT) induce alteración en la sensibilidad de la insulina en el tejido adiposo como efecto de reprogramación fetal, pero debido a que no se conoce el impacto directo de la EPT a nivel tisular en relación a la expresión del receptor de insulina, en la presente memoria se estudió la repercusión a nivel morfológico y en el perfil de expresión génica. Este modelo experimental permitió evaluar la respuesta del tejido *in vivo* como un acercamiento en el contexto de la sensibilidad de la insulina, captación de glucosa e impacto directo en las células adiposas, colaborando en la comprensión de la etiología del trastorno en la homeostasis de la glucosa y manifestación tisular.

Hipótesis

La exposición prenatal a testosterona induce alteraciones estructurales y de expresión génica en el tejido adiposo de ovinos.

Objetivo general

Definir el efecto de la exposición prenatal a testosterona sobre las características morfológicas y de expresión génica del tejido adiposo subcutáneo y visceral en hembras ovinas.



Objetivos específicos

- Determinar el impacto de la exposición prenatal a testosterona en la morfología de adipocitos de grasa subcutánea y visceral en hembras ovinas durante la etapa prenatal y puberal.
- Evaluar el efecto de la exposición prenatal a testosterona sobre el perfil de expresión de genes de la vía de señalización de la insulina (IR, IRS-1, IRS-2, PI3K, Akt, PKC y GLUT4) en tejido adiposo subcutáneo y visceral de hembras ovinas, durante la etapa prenatal y puberal.

IV. MATERIALES Y MÉTODO

Diseño experimental

El presente estudio consideró la utilización de animales de investigación, en los cuales se desarrollaron los procedimientos a continuación indicados siguiendo los lineamientos establecidos por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción.

Tamaño de muestra

El tamaño de la muestra fue determinado considerando el análisis de resultados de una variable continua y la literatura en relación a resultados anteriores (Recabarren *et al.*, 2005). Según la siguiente ecuación, en donde, s (desviación estándar esperada), d (magnitud de la diferencia) y C (constante definida según valores de α y β) (Dell *et al.*, 2002).

$$n = 2 + C (s/d)^2$$

$$n = 2 + 10,51 (4/3)^2; n = 20,59 \text{ (20 hembras)}$$



Animales

En este estudio se utilizaron 40 ovejas adultas mestizas de suffolk down. Fueron distribuidas en dos grupos de 20 animales tratadas (T- hembras) y 20 control (C- hembras). Posterior a la selección se efectuó una sincronización de estros y cruce con machos de fertilidad comprobada. La sincronización de estros fue realizada con un implante de progesterona intravaginal durante 7 días (Eazy Breed CIDR®, Zoetis) seguido por una inyección intramuscular única de 75 μ g de prostaglandina PGF2alfa (Ovolute®, Dragpharma). Finalmente se realizó diagnóstico y control de gestación a través de control ecográfico después del día 28 de la monta.

Las madres fueron alimentadas con heno de alfalfa y pradera natural. Fueron mantenidas en establos en la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Campus Chillán.

Protocolo de androgenización

A las madres del grupo tratado se aplicó 30 mg de testosterona (Steraloids Inc.®) intramuscular dos veces por semana entre el día 30 y 90 de gestación. Luego 40 mg de testosterona intramuscular, dos veces por semana entre el día 90 y 120 de gestación. Al grupo control se le administró igual volumen de aceite vegetal estéril, vía intramuscular. Entre la semana 30 y 38, las hembras de la descendencia fueron tratadas con 40 mg de testosterona intramuscular, dos veces por semana como potenciación puberal tanto en hembras controles como tratadas. Este es un protocolo validado que intenta simular concentraciones fisiológicas de hiperandrogenismo en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (PCOS) (Sir-Petermann *et al.*, 2002; Recabarren *et al.*, 2008) (Figura 5).

Recolección de muestras fetales

Las muestras de tejidos fetales fueron recolectadas de los individuos a los 120 días de gestación (120 dg) a través de cesárea de 10 C-hembras y 10 T-hembras. Fueron sometidas a un protocolo anestésico, premedicadas con acepromacina (0,02 mg/kg intramuscular), atropina (0,02 mg/kg intramuscular) y ketamina (5 mg/kg intravenoso). La mantención de la anestesia fue con el uso de halotano (2%).

Se consideró solo fetos hembras a las cuales se realizó eutanasia con sobredosis de tiopental sódico intravenoso en la vena umbilical (30 mg/kg), asegurando la muerte por ausencia de signos vitales. Se procedió a extraer las muestras de omento (grasa visceral, GV) y región femoral (grasa subcutánea, GSC). Las madres recibieron tratamiento postquirúrgico y control médico veterinario continuo (Figura 5).

Recolección de muestras postnatales

El resto de las madres, 10 T-hembras y 10 C-hembras, continuaron su gestación a término (aproximadamente 150 días) donde fueron mantenidas en establos durante la parición y cuidado materno. La vigilancia médico veterinaria fue continua para todos los animales.

Posterior a la androgenización de la semana 30 a la 38, puberal, se realizó la extracción de GSC y GV bajo anestesia inhalatoria (halotano, 2%). Finalizada la extracción de muestras los animales fueron eutanasiados por sobredosis de tiopental sódico intravenoso (100 mg/kg) en relación a lo establecido por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción (Kosut *et al.*, 1997; Recabarren *et al.*, 2005) (Figura 5).

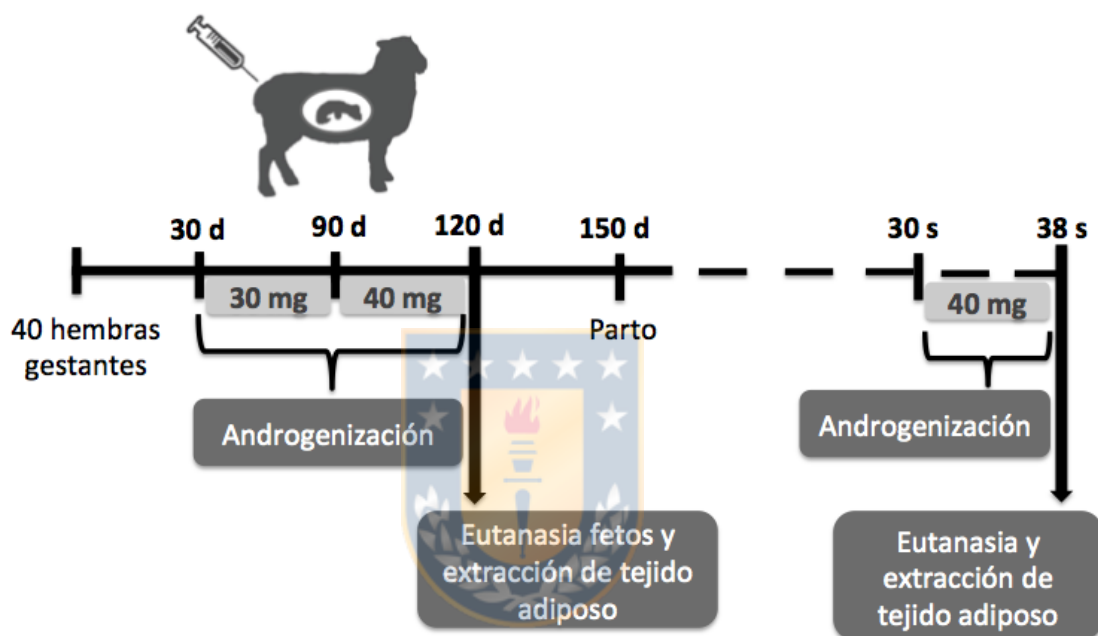


Figura 5. Esquema cronológico del diseño experimental del estudio. d, días; s, semanas.

Estudio morfológico del tejido adiposo

De cada individuo (fetos y puberales) se extrajo aproximadamente 1 cm³ de tejido adiposo subcutáneo (región femoral) y visceral (omento) y esto fue fijado por 24 horas en paraformaldehído al 4%. Luego fueron incluidas en parafina sólida y seccionadas en cortes histológicos de 4 µm de espesor. Finalmente, teñidas con hematoxilina-eosina.

Para el análisis morfológico del tejido adiposo, se procedió a obtener 3 microfotografías (40x) representativas y seleccionadas al azar de las secciones de

cada animal utilizando un microscopio Leica DM2000 y cámara DF295 (Leica). Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software ImageJ (NIH, USA) para determinar su densidad (número de células por campo), área, diámetro mayor y perímetro de cada adipocito según Parlee *et al.* (2014). Los resultados fueron expresados como promedio \pm error estándar de la media (promedio \pm SEM).

Estudio molecular del tejido adiposo

El protocolo fue realizado según Rojas-García *et al.* (2010).

Extracción de ARN total

De un total de 8 individuos por grupo, se homogeneizaron entre 25 y 50 mg de grasa subcutánea (GSC) y visceral (GV) con un sonicador de ultrasonido BioLogics 300 UT (Biologics Inc. USA) en 5 pulsos a 70% de poder en hielo. La extracción de ARN fue realizada en 1 mL de TRIzol (Invitrogen®) siguiendo las indicaciones del fabricante y diluyendo finalmente el ARN en 30 μ L de agua grado biología molecular (BM). El ARN total extraído fue cuantificado posteriormente, utilizando un espectrofotómetro (Epoch. Biotek. USA) a una absorbancia de 260 nm. El ARN total fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

Transcripción reversa

Posterior a la obtención del material genético, 1 μ g de ARN total fue incubado a 37°C por 10 minutos con DNase 10X buffer, 2 U DNase I (New England Biolabs. USA) en un volumen de 10 μ L. Seguidamente, se incubó la reacción con 25 mM EDTA (New England Biolabs. USA) a 75°C por 10 minutos y 60 mM random primers (New England Biolabs. USA) a 25°C por 5 minutos. Finalmente, las muestras fueron incubadas a 42°C por 1 hora con M-MuLV 10X buffer, 200 U M-MuLV RT (New England Biolabs. USA), 10 mM dNTPs mix y 0,2 U Inhibidor RNAsas (New England Biolabs. USA) en un volumen final de 20 μ L y el proceso concluyó incubado a 65°C por 20 minutos. El ADNc fue almacenado a -20°C hasta su utilización. Muestra control negativo, fue procesada en ausencia de M-MuLV RT.

qPCR (PCR en tiempo real)

Los ensayos de expresión de los elementos de la vía de señalización de la insulina (IR, IRS-1, IRS-2, PI3K, Akt, PKC y GLUT4), fueron evaluados por qPCR. Para esto 1 uL de ADNc, fue incubado con 6,5 uL de SensiMix SYBR No-ROX kit (Bioline. USA), 10 mM de cada primers (Tabla 3, Apéndice) en un volumen final de 12,5 uL de reacción. Las muestras fueron analizadas por triplicado en un termociclador Rotor-Gene RG-6000 (Corbett Research, Mortlake, Australia), utilizando un protocolo de desnaturalización de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 58°C por 30 segundos y elongación a 72°C por 30 segundos).

Cuantificación qPCR

Los niveles de expresión de los genes fueron determinados por el método de $\Delta\Delta Ct$ y normalizados por β -actina. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism v. 6.0 (CA, USA).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para densidad, área, perímetro y diámetro fueron evaluados utilizando la prueba de t-student, considerando una diferencia significativa de $P \leq 0,05$; para comparar resultados entre grupo tratado y control.

Los resultados obtenidos del análisis de expresión de elementos de la vía de señalización de la insulina fueron normalizados y evaluados utilizando la prueba de t-student, considerando una diferencia significativa de $P \leq 0,05$; para comparar resultados entre grupo EPT y grupo control.

V. RESULTADOS

Al descartar a los individuos machos en este estudio, finalmente se analizaron muestras de 24 hembras: 12 fetos y 12 individuos puberales.

Objetivo 1. Determinar el impacto de la exposición prenatal a testosterona en la morfología de adipocitos de grasa subcutánea y visceral en hembras ovinas durante la etapa prenatal y puberal.

Parámetros morfométricos: grasa subcutánea

La composición del tejido adiposo es similar entre ovejas EPT y control, presentando adipocitos blancos definidos y tejido conectivo circundante (Figura 6).

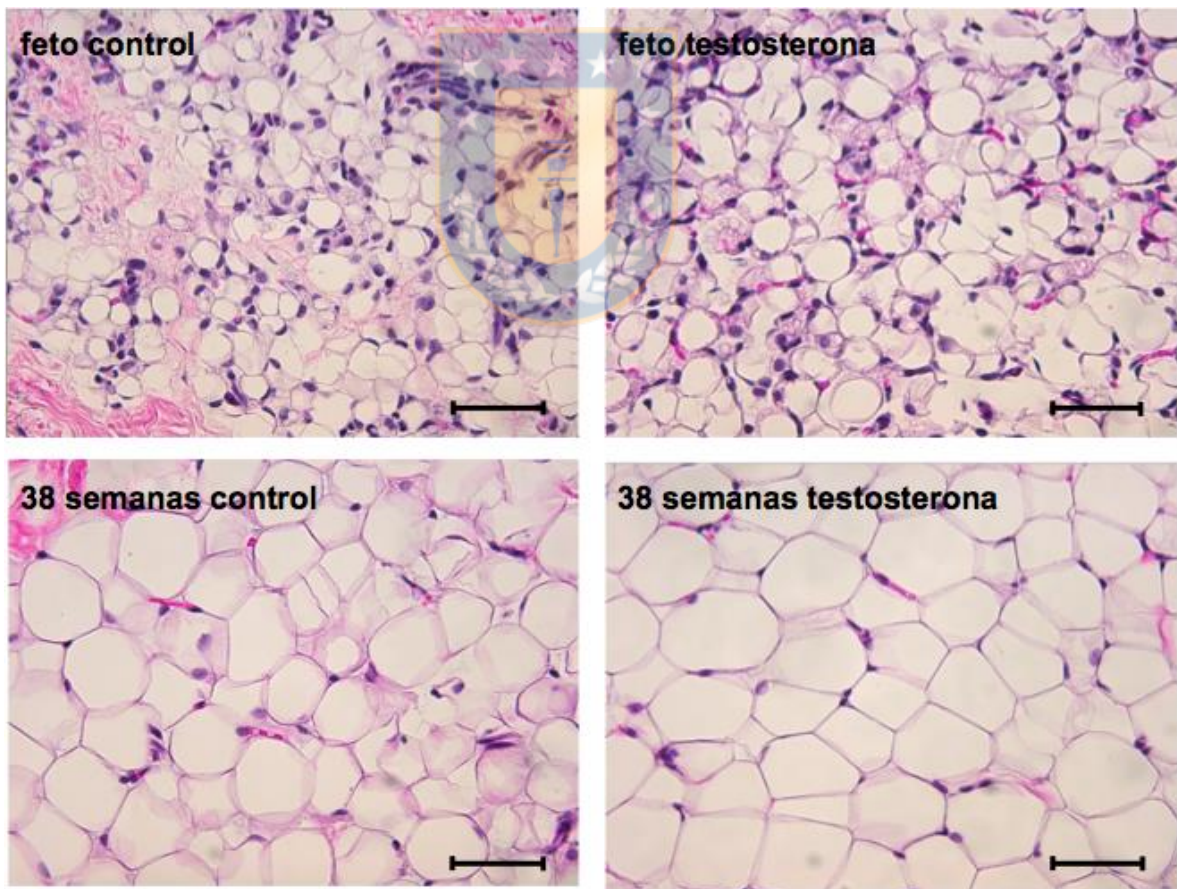


Figura 6. Microfotografías representativas de GSC en hembras ovinas: fetos y 38 semanas de edad. Barra error 50 μm .

Con el propósito de determinar el número total de células se cuantificó en un área normalizada en mm^2 . En fetos, la densidad fue de $965,6 \pm 120$ y $927,3 \pm 68$ por mm^2 . El área promedio de los adipocitos fue de $148,1 \pm 13,1$ y $147,3 \pm 18,2 \mu\text{m}^2$; perímetro de $45,5 \pm 2,0$ y $45,1 \pm 2,6 \mu\text{m}$ y diámetro $15,9 \pm 0,6$ y $16,0 \pm 0,9 \mu\text{m}$ entre controles (C) y EPT (T), respectivamente. A las 38 semanas de edad (etapa puberal) la densidad fue de $534,0 \pm 46$ y $534,4 \pm 49,3$ por mm^2 ; el área de $760,6 \pm 103$ y $1031,4 \pm 144 \mu\text{m}^2$; perímetro de $101,5 \pm 7,2$ y $117 \pm 8,6 \mu\text{m}$; y diámetro de $36,8 \pm 2,5$ y $43 \pm 3,2 \mu\text{m}$ para controles (C) y EPT (T), respectivamente (Tabla 1 y Figura 7). Para todos los parámetros de fetos y 38 semanas no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$).

Tabla 1. Parámetros morfométricos de grasa subcutánea en hembras ovinas. C, control. T, EPT.

	Fetos		38 semanas	
	C (n=6)	T (n=6)	C (n=5)	T (n=7)
Densidad (n/ mm^2)	$965,6 \pm 120$	$927,3 \pm 68$	$534,0 \pm 46$	$534,4 \pm 49,3$
Área (μm^2)	$148,1 \pm 13,11$	$147,3 \pm 18,2$	$760,6 \pm 103$	$1031,4 \pm 144$
Perímetro (μm)	$45,5 \pm 2$	$45,1 \pm 2,6$	$101,5 \pm 7,2$	$117 \pm 8,6$
Diámetro (μm)	$15,9 \pm 0,6$	$16,0 \pm 0,9$	$36,8 \pm 2,5$	$43 \pm 3,2$

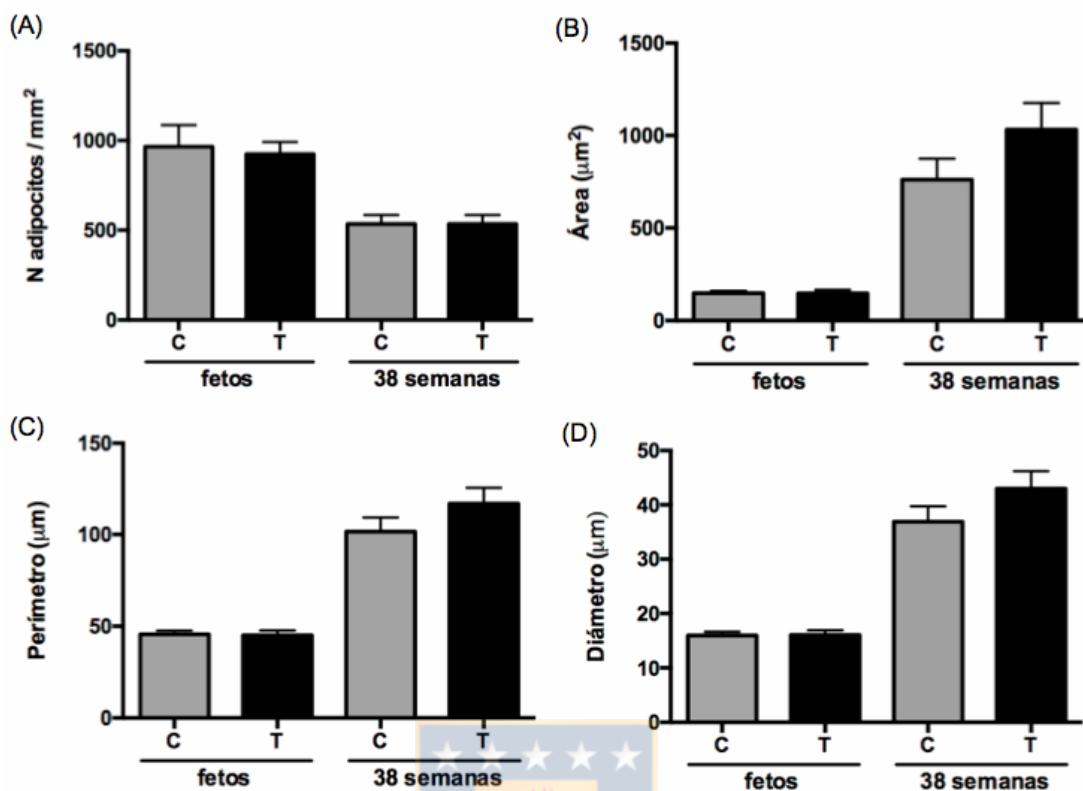


Figura 7. Comparación de parámetros morfométricos de GSC en hembras ovinas. A, Densidad (n/mm²). B, Área de adipocitos (µm²). C, Perímetro adipocitos (µm). D, Diámetro mayor de adipocitos (µm). C, control; T, EPT.

Parámetros morfométricos: grasa visceral

El tejido adiposo a nivel visceral se presenta bien definido en ambas etapas y condiciones (Figura 8). En fetos, la densidad fue de $1148,0 \pm 170,9$ y $862,9 \pm 90,2$ por mm²; el área de $140,2 \pm 15,8$ y $113,6 \pm 12,8 \mu\text{m}^2$; perímetro de $43,1 \pm 2,2$ y $38,9 \pm 1,8 \mu\text{m}$; y diámetro $15,2 \pm 0,7$ y $13,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$ en controles (C) y EPT (T), respectivamente. A las 38 semanas de edad la densidad fue $556,3 \pm 53,5$ y $361,2 \pm 39,5$ por mm²; el área $1063,3 \pm 121$ y $1905,3 \pm 261 \mu\text{m}^2$; perímetro de $120,7 \pm 7,1$ y $160,3 \pm 11,7 \mu\text{m}$; y diámetro $44,1 \pm 2,7$ y $69,3 \pm 7,5 \mu\text{m}$ en controles y EPT, respectivamente (Tabla 2 y Figura 9). Durante la etapa fetal se observa una tendencia similar entre controles y tratados. A las 38 semanas de edad existe un aumento con diferencias estadísticamente significativas entre densidad, área, perímetro y diámetro (Tabla 2 y Figura 9).

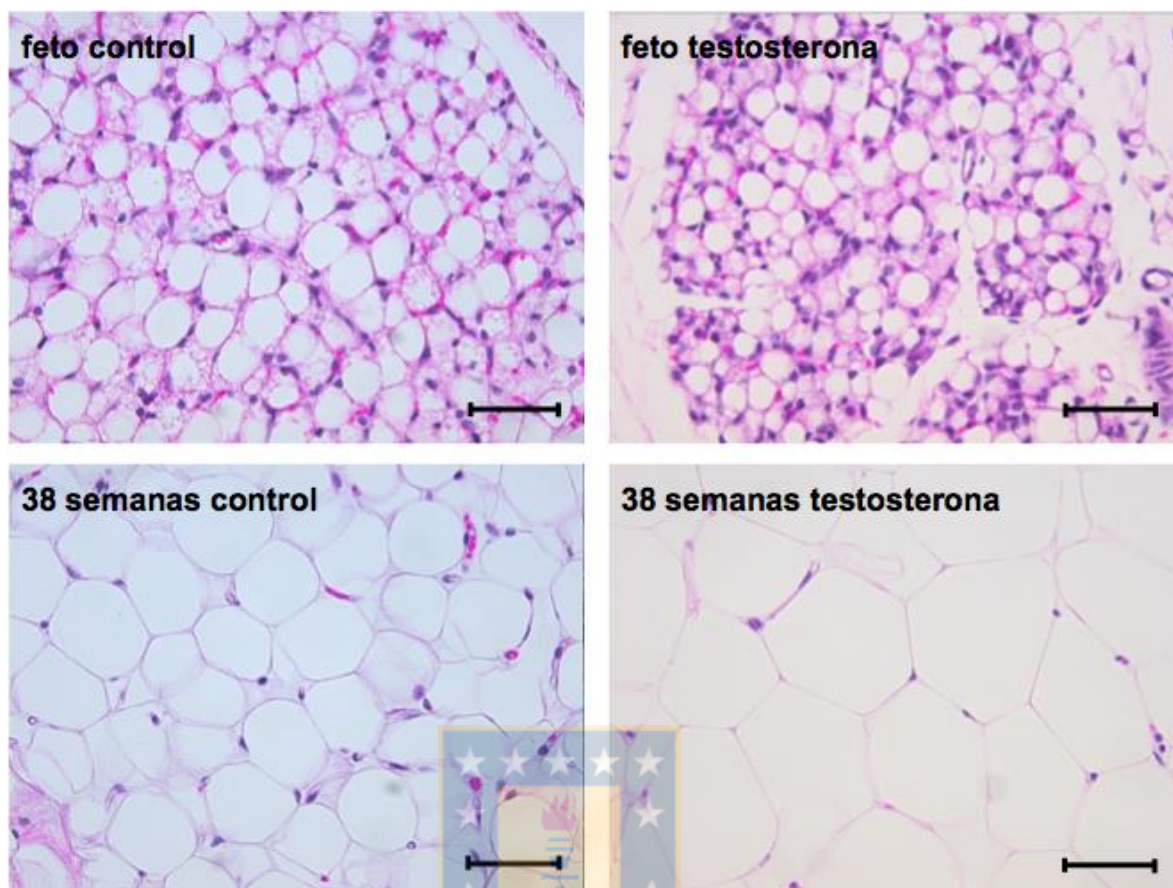


Figura 8. Microfotografías representativas de GV en hembras ovinas: fetos y 38 semanas de edad. Barra error 50 μm .

Tabla 2. Parámetros morfométricos de grasa visceral en hembras ovinas. C, control. T, EPT (* $P < 0,05$; ** $< 0,01$; **** $< 0,0001$).

	Fetos		38 semanas	
	C (n=6)	T (n=6)	C (n=5)	T (n=7)
Densidad (n/mm ²)	1148,0 \pm 170,9	862,9 \pm 90,2	556,3 \pm 53,5	361,2 \pm 39,5**
Área (μm^2)	140,2 \pm 15,8	113,6 \pm 12,8	1063,3 \pm 121	1905,3 \pm 261****
Perímetro (μm)	43,1 \pm 2,2	38,9 \pm 1,8	120,7 \pm 7,1	160,3 \pm 11,7*
Diámetro (μm)	15,2 \pm 0,7	13,8 \pm 0,6	44,1 \pm 2,7	69,3 \pm 7,5*

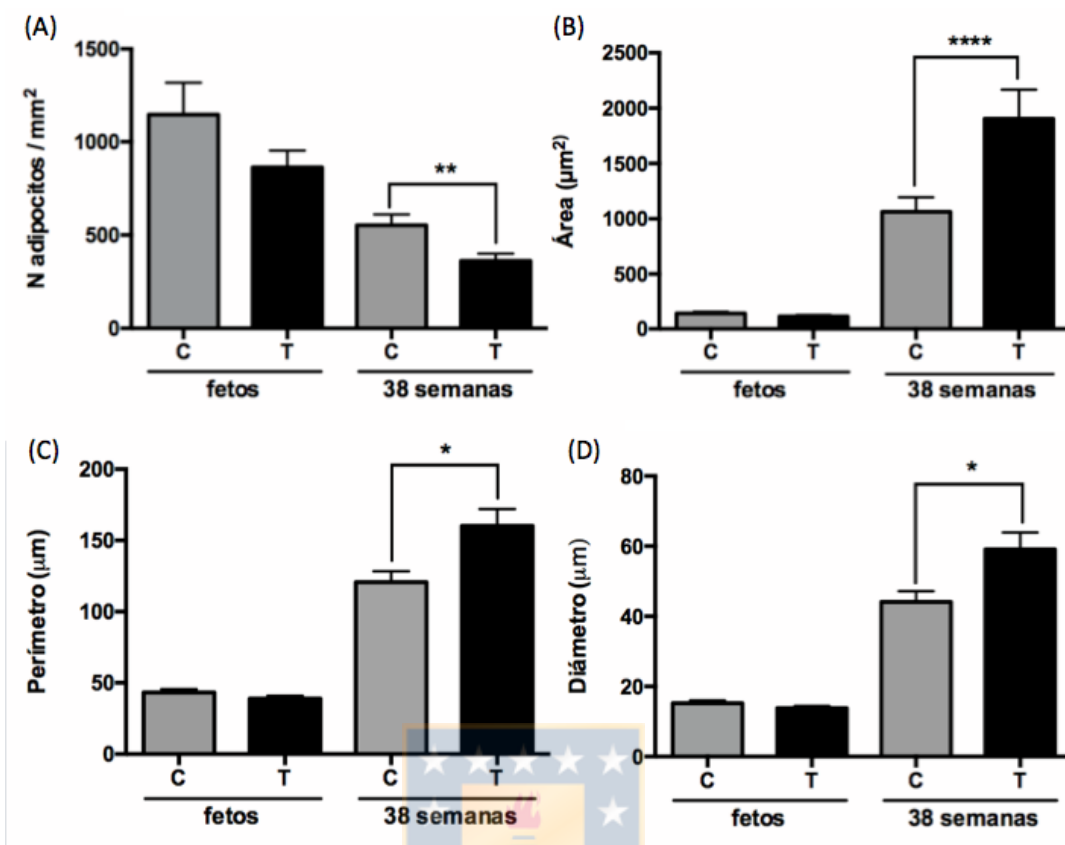


Figura 9. Comparación de parámetros morfométricos de GV en hembras ovinas. A. Densidad (n/mm^2). B. Área de adipocitos (μm^2). C. Perímetro adipocitos (μm). D. Diámetro mayor de adipocitos (μm). C, control; T, EPT. (* $P < 0,05$; ** $< 0,01$; **** $< 0,0001$).

Objetivo 2. Evaluar el efecto de la exposición prenatal a testosterona sobre el perfil de expresión de genes de la vía de señalización de la insulina (IR, IRS-1, IRS-2, PI3K, Akt, PKC y GLUT4) en tejido adiposo subcutáneo y visceral de hembras ovinas, durante la etapa prenatal y puberal.

Perfil de expresión de genes relacionados a la vía de señalización de la insulina en grasa subcutánea

Con los datos normalizados en relación a β -actina se observa que el perfil de la vía de señalización del receptor de insulina presenta diferencias entre grupo EPT y grupo control (Figura 10).

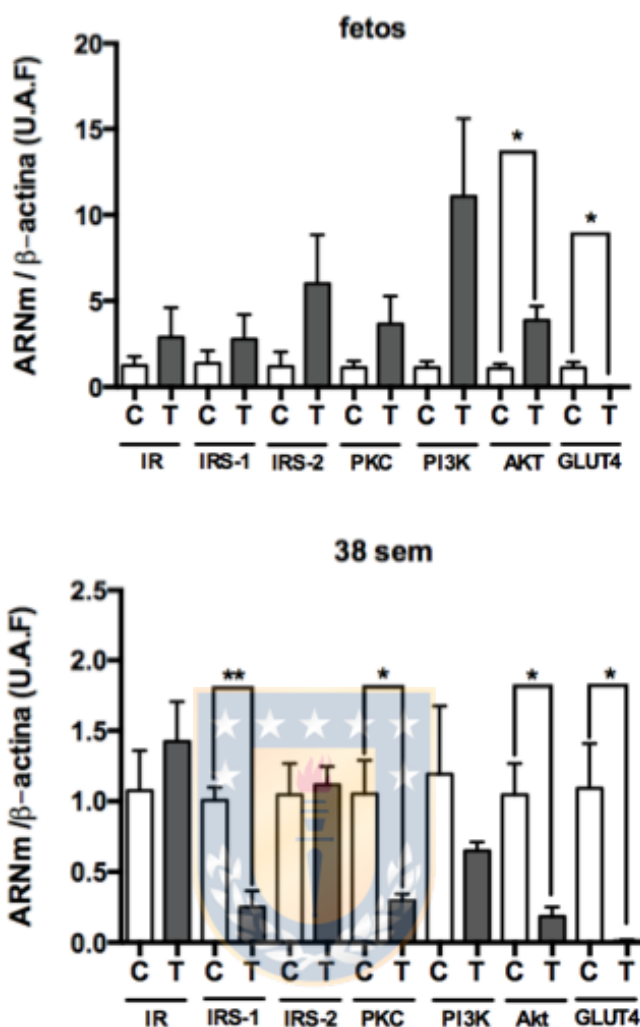


Figura 10. Perfil de expresión de genes de la vía de señalización de la insulina de GSC en hembras ovinas. A. Fetos control (C) y EPT (T). B. Adultos de 38 semanas control (C) y EPT (T); (* $P < 0,05$; ** $< 0,01$).

El perfil de expresión de ARNm de la vía de señalización determinó que a nivel fetal, el grupo EPT presenta una tendencia al aumento en la expresión de genes de Akt ($P = 0,0326$); mientras que una disminución significativa de la expresión final de GLUT4 ($P = 0,0429$). A las 38 semanas de edad existe una disminución de IRS-1 ($P = 0,0072$), PKC ($P = 0,0466$), Akt ($P = 0,0323$) y GLUT4 ($P = 0,0376$) en individuos EPT.

Perfil de expresión de genes relacionados a la vía de señalización de la insulina en grasa visceral

Con los datos normalizados en relación a β -actina se observa que del mismo modo, el perfil de la vía de señalización del receptor de insulina presenta diferencias entre grupo EPT y grupo control (Figura 11).

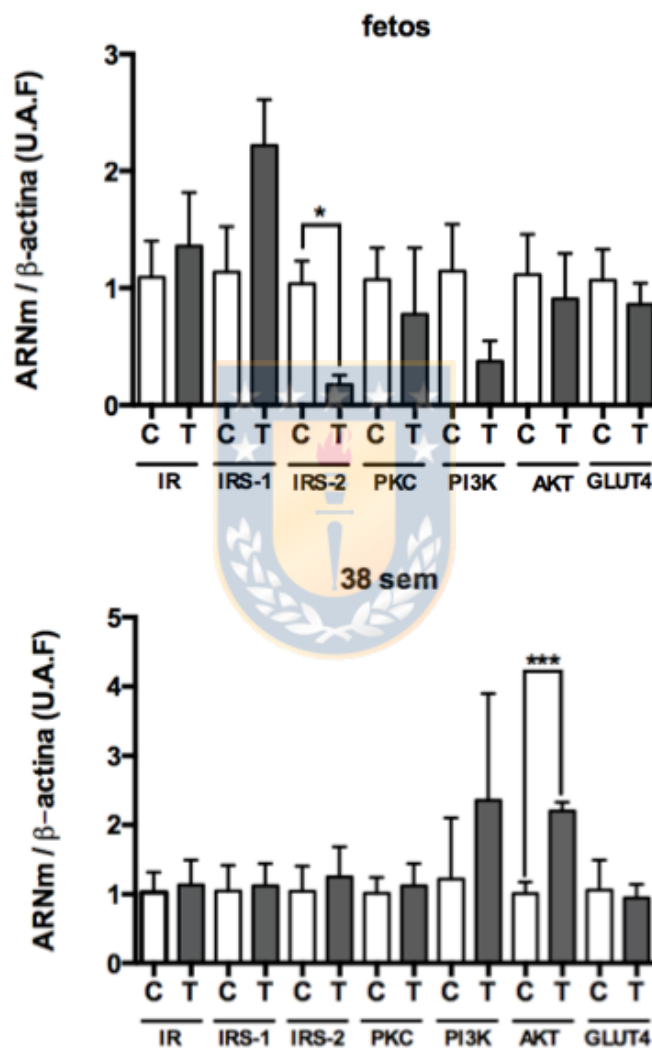


Figura 11. Perfil de expresión de genes de la vía de señalización de la insulina de GV en hembras ovinas. A. Fetos control (C) y tratados (T). B. Adultos de 38 semanas control (C) y EPT (T) (*P < 0,05; *** < 0,001).

El perfil de expresión de los niveles de transcrito para los elementos de la vía de señalización en GV, determinaron que en fetos se produce una disminución de IRS-2 ($P = 0,0165$), los restantes elementos no presentaron diferencia significativa ($P > 0,05$). El perfil de ARNm a las 38 semanas determinó que existe un aumento en la expresión de Akt ($P = 0,0006$). Los niveles de transcrito para los restantes elementos no presentaron diferencia significativa ($P > 0,05$).



VI. DISCUSIÓN

El tejido adiposo presenta receptores de andrógenos, estrógenos y progesterona (Crandall *et al.*, 1998; De Pergola, 2000), regulando la transcripción de ciertos genes (Mayes y Watson, 2004), y de esta forma podría explicarse su efecto disruptor durante periodos críticos de la gestación que luego son potenciados con un hiperandrogenismo persistente. En grasa subcutánea (GSC), los parámetros morfométricos evaluados como densidad, área, perímetro y diámetro de las células adiposas no manifestaron cambios entre el grupo expuesto prenatalmente a testosterona y el grupo control (Figura 6 y 7). En fetos, las células del tejido adiposo comienzan la acumulación de lípidos alrededor del día 70 de gestación hasta los 30 días posterior al nacimiento (Gemmell y Alexander, 1978; Symonds *et al.*, 2012), por lo que estos resultados podrían sugerir que a los 120 días de gestación, momento de extracción de las muestras, el tejido adiposo aún no se encuentra completamente diferenciado y la exposición prenatal a testosterona no sería un factor que influye sobre la morfología durante este periodo. De la misma forma, en GSC a las 38 semanas de edad no hubo diferencia en cuanto a los parámetros morfométricos evaluados entre grupo EPT y grupo control.

Aun cuando no existieron cambios en grasa visceral (GV) durante la etapa fetal, este estudio determinó una hipertrofia de las células a las 38 semanas de edad ($P < 0,05$) (Figura 7 y 9). Individuos EPT aumentan tanto en área, perímetro y diámetro de células en GV, disminuyendo la densidad por campo (Figura 8). En efecto, se sugiere que podría existir un efecto reprogramador de la testosterona potenciado por la administración a las 38 semanas. Estos resultados concuerdan con el aumento de estas mediciones en adipocitos de ratas expuestas prenatalmente a testosterona (Alexanderson *et al.*, 2007). De la misma forma, estudios de mujeres con PCOS, con constantes niveles de hiperandrogenismo, presentan adipocitos aberrantes en tamaño (Manneras-Holm *et al.*, 2011; Echiburú *et al.*, 2018), y la potenciación puberal de testosterona asimilaría esta condición. Al contrario, otros estudios indican una reducción en diámetro y volumen de adipocitos en ovinos

expuestos prenatalmente a testosterona, pero manifestando perfiles metabólicos propios de la resistencia a la insulina, donde los autores asocian a un periodo de adaptación de los adipocitos (Veiga-López *et al.*, 2013).

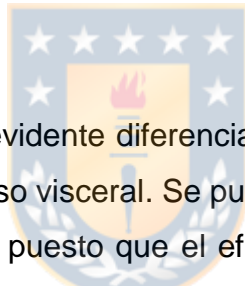
En relación a la expresión de la vía del receptor de insulina en GSC, tanto en fetos como en etapa puberal, se relacionan al hecho de que Akt es un punto determinante en la vía de señalización (Boucher *et al.*, 2014), y en este caso sí se evidencia una alteración vinculándolo posteriormente a una disminución de la expresión de GLUT4 (Figura 10). Como posible consecuencia de un déficit de GLUT4, una alteración en el ingreso de glucosa. Aun así, no es factible evaluar la expresión final ni funcionalidad de proteínas respectivas, pero se ha establecido que un nivel bajo de GLUT4 es un indicador celular prematuro de resistencia a la insulina (Carvalho *et al.*, 2001), por lo que este estudio podría esclarecer una tendencia a esta patología donde la glucosa deja de ingresar a la célula incluso en etapa fetal, y así se observa al no presentar cambios significativos en su morfometría.

En cuanto GSC en etapa puberal, se habla de que un déficit de IRS-1 está altamente relacionado con resistencia a la insulina (Carvalho *et al.*, 2001). Este efecto explicaría resultados anteriores de Recabarren *et al.* (2005), que evidencian alteraciones en el perfil de insulina en etapas tardías. Por otro lado, estudios han demostrado que el cultivo *in vitro* de tejido adiposo de mujeres con PCOS no presentan alteraciones de esta proteína, y por lo tanto se propone que sería el efecto propio de la testosterona *in vivo* que podría producir la alteración de la expresión de IRS-1 (Corbould y Dunaif, 2007). Tal efecto se ve potenciado en este estudio por la administración de testosterona a las 30 semanas. En cuanto a la disminución de PKC, se describe que la falta de este factor produce individuos con baja composición grasa (Mehta, 2014).

Los resultados de expresión génica de grasa visceral (GV) evaluados en etapa fetal registraron que IRS-2 sería el punto crítico (Figura 11). En estudios anteriores, se ha establecido que IRS-2 juega un papel importante en el transporte de glucosa a

nivel de preadipocitos, células que serían predominantes durante la etapa fetal (Miki *et al.*, 2001).

Un aumento significativo de Akt en GV en etapa puberal (Figura 11) concuerda con los estudios de Nada *et al.* (2010) frente a una dosis excesiva de testosterona. Se ha descrito que Akt cumple un rol importante en el metabolismo de las células de tejidos sensibles a la insulina, favoreciendo una posterior fosforilación y translocación de GLUT4 a la membrana de los adipocitos como respuesta a esta hormona (Boucher *et al.*, 2014). En el tejido adiposo, la falta de esta proteína produce lipodistrofia (Shearin *et al.*, 2016), y la activación constitutiva de este factor de la vía produce una disrupción en el metabolismo lipídico, promoviendo un aumento en el tejido adiposo y la adipogénesis (Cederquist *et al.*, 2017), como se puede evidenciar en este estudio junto a los parámetros morfométricos en grasa visceral.



Los resultados señalan una evidente diferencia entre el comportamiento del tejido graso subcutáneo y tejido graso visceral. Se puede inferir que sí existen diferencias en cuanto a su metabolismo, puesto que el efecto se ve pronunciado en el tejido adiposo visceral (Figura 8 y 9). GV presenta un mayor flujo sanguíneo, tasa metabólica y respuesta a la insulina en comparación con GSC (Virtanen *et al.*, 2002; Laviola *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, se habla de que GV tiene mayor cantidad de receptores de testosterona disponibles en comparación a GSC, el cual presenta mayor cantidad de receptores de estrógenos (Sjögren *et al.*, 1995; Crandall *et al.*, 1998). Los resultados de este estudio indican un aumento determinante de Akt e hipertrofia en GV, por lo tanto sería más sensible que GSC, concordante con la expresión de receptores (De Pergola, 2000). Las mujeres con PCOS se caracterizan por un aumento en grasa abdominal (GV) y se correlaciona con la respuesta a la testosterona. Esto presenta mayores riesgos en cuanto a disfunciones metabólicas, asociado a hiperglicemia e hiperinsulinemia (Sir-Petermann *et al.*, 2012).

El tejido adiposo depende, y a la vez determina, la relación entre la nutrición y metabolismo, en asociación a otros órganos; así, el conjunto de alteraciones en la vía de señalización de la insulina en individuos en etapa fetal podría relacionarse con los parámetros metabólicos obtenidos anteriormente por Recabarren *et al.* (2005), donde individuos de 5 semanas de edad manifestaron una alteración en la sensibilidad de la insulina en etapa temprana asociado a una hiperinsulinemia compensatoria.

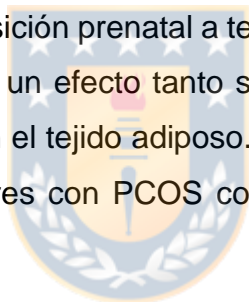
Posteriormente, a las 38 semanas de edad, los adipocitos de individuos EPT alcanzan tamaños mayores, especialmente en GV. Esto podría sugerir una respuesta diferencial del tejido adiposo en individuos expuestos prenatalmente a testosterona en comparación con el grupo control, similar a lo que ocurre en individuos de bajo peso corporal al nacimiento que luego cursan con enfermedades metabólicas y coronarias producto de restricciones durante la gestación (Barker, 2008). Las consecuencias de esta compensación podrían presentar disturbios en el metabolismo de los individuos, puesto que con la hipertrofia de los adipocitos éstos se vuelven disfuncionales y pierden la sensibilidad a la insulina asociado a la inflamación del tejido (Badimon *et al.*, 2015).

Es importante recalcar el efecto directo de la testosterona sobre el tejido adiposo, el cual actúa a través de distintos niveles y no necesariamente sobre el receptor de insulina. Por un lado, la testosterona puede cumplir un rol inhibitorio de la acción de la insulina, facilitando la acumulación de lípidos intracelulares, ya que modula el ingreso de ácidos grasos a través de la lipoproteinlipasa (LPL) por lo que condicionaría el ingreso de ácidos grasos a la célula (Bhasin, 2003; Blouin *et al.*, 2010). Si bien este estudio no puede definir este efecto, una alteración de LPL está vinculado a la obesidad y también se observa en mujeres con PCOS (Ek *et al.*, 1997), y en ese sentido podría potenciar la hipertrofia observada en GV. Por otro lado, la testosterona inhibe la lipólisis a través de la lipasa sensible a hormonas (HSL), condicionando a un mayor almacenaje de la energía (Dimitriadis *et al.*, 2011). Este efecto se podría asociar al aumento de morfometría de GV, con un mayor número de receptores de testosterona, que podría evaluarse en futuros estudios.

No se descarta que la testosterona podría activar otras vías paralelas para el ingreso de la glucosa a través de GLUT4 u otro transportador (Mitsubishi *et al.*, 2016).

Por último, la EPT también influye en otros órganos responsables de la homeostasis de la energía: páncreas, hígado y músculo (Eisner *et al.*, 2000; Nada *et al.*, 2010). De esta forma, la relación entre la EPT y el metabolismo podría ser aún más compleja al tener otros factores a considerar, siendo externos al adipocito pero que en conjunto influirían en su respuesta al almacenaje de energía. De la misma manera, otros factores podrían ejercer un efecto en la vía de señalización de la insulina, como es la inflamación, leptina y adiponectina, entre otros (Emanuelli *et al.*, 2000; Kubota *et al.*, 2002; Niswender *et al.*, 2004).

Con los datos obtenidos en este estudio, es posible sugerir que los resultados son una consecuencia de la exposición prenatal a testosterona junto a una potenciación en etapas tardías generando un efecto tanto sobre la morfometría como sobre el metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo. Esto concuerda con lo que sucede en la descendencia de mujeres con PCOS contribuyendo al entendimiento de la disfunción metabólica.



VII. CONCLUSIONES

1. La exposición prenatal a testosterona no ejerce un efecto a nivel morfológico en fetos ovinos (120 dg) en GSC y GV. Sin embargo, durante la etapa puberal (38 sem), la GV responde a la testosterona manifestando una hipertrofia.
2. El perfil de expresión de los elementos de la vía de señalización de la insulina en hembras EPT a las 38 semanas demuestra un efecto supresor de la testosterona sobre GSC. Sin embargo, en GV se genera un aumento en la expresión de Akt.



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott, D.H., D.A. Dumesic, J.E. Levine, A. Dunaif and V. Padmanabhan. 2007. Animal models and fetal programming of the polycystic ovary syndrome. pp: 259-272. In: R. Azziz (Ed.). *Androgen Excess Disorders in Women: Polycystic Ovary Syndrome and Other Disorders* (2nd ed.) Humana Press Inc., Totowa, N.J., U.S.A.
2. Ahima, R.S. 2006. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity* 14(suppl 5): 242S-249S.
3. Alexanderson, C., E. Eriksson, E. Stener-Victorin, T. Lystig, B. Gabrielsson, M. Lönn and A. Holmäng. 2007. Postnatal testosterone exposure results in insulin resistance, enlarged mesenteric adipocytes, and an atherogenic lipid profile in adult female rats: comparisons with estradiol and dihydrotestosterone. *Endocrinology* 148(11): 5369-5376.
4. Badimon, L., B. Oñate y G. Vilahur. 2015. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y su potencial reparador en la enfermedad isquémica coronaria. *Rev. Esp. Cardiol.* 68(7): 599-611.
5. Barker, D.J.P. 2008. Human growth and cardiovascular disease. pp: 21-38. In: D.J.P. Barker, R.L. Bergmann and P.L. Ogra (Eds.). *The window of opportunity: pre-pregnancy to 24 months of age.* Vol 61. Karger. Basel, Switzerland.
6. Bergman, R.N. 2005. Minimal model: perspective from 2005. *Horm. Res.* 64 (suppl 3): 8-15.
7. Bhasin, S. 2003. Effects of testosterone administration on fat distribution, insulin sensitivity and atherosclerosis progression. *Clin. Infect. Dis.* 37 (suppl 2): 142-149.
8. Blouin, K., M. Nadeau, M. Perreault, A. Veilleux, R. Drolet, P. Marceau, J. Mailloux, V. Luu-The and A. Tchernof. 2010. Effects of androgens on adipocyte differentiation and adipose tissue explant metabolism in men and women. *Clin. Endocrinol.* 72: 176-188.

9. Boucher, J., A. Kleinridders and C.R. Kahn. 2014. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 6: a009191.
10. Cannon, B., J. Nedergaard. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84: 277-359.
11. Carvalho, E., P.A. Jansson, I. Nagaev, A.M. Wentzel and U. Smith. 2001. Insulin resistance with low cellular IRS-1 expression is also associated with low GLUT4 expression and impaired insulin-stimulated glucose transport. *FASEB J.* 15(6): 1101-1103.
12. Cederquist, C.T., C. Lentucci, C. Martínez-Calejman, V. Hayashi, J. Orofino, D. Guertin, S.K. Fried, M. Lee, M.D. Cardamone and V. Perissi. 2017. Systemic insulin sensitivity is regulated by GPS2 inhibition of AKT ubiquitination and activation in adipose tissue. *Mol. Metab.* 6: 125-137.
13. Contreras, C., R. Nogueiras, C. Diéguez, G. Medina-Gómez y M. López. 2016. Hypothalamus and thermogenesis: Heating the BAT, browning the WAT. *Mol. Cell. Endocrinol.* 438: 107-115.
14. Corbould, A., A. Dunaif. 2007. The adipose cell lineage is not intrinsically insulin resistant in polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 56(5): 716-722.
15. Crandall, D.L., D.E. Busler, T.J. Novak, R.V. Weber and J.G. Kral. 1998. Identification of estrogen receptor β RNA in human breast and abdominal subcutaneous adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248(3): 523-526.
16. De Pergola, G. 2000. The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone. *Int. J. Obes.* 24 (suppl 2): 59-63.
17. Dell, R., S. Holleran and R. Ramakrishnan. 2002. Sample size determination. *ILAR J.* 43(4): 207-213.
18. Dicker, A., M. Rydén, E. Näslund, I.E. Muehlen, M. Wirén, M. Lafontan and P. Arner. 2004. Effect of testosterone on lipolysis in human pre-adipocytes from different fat depots. *Diabetologia* 47: 420-428.
19. Dimitriadis, G., P. Mitrou, V. Lambadiari and E. Maratou. 2011. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93 (suppl 1): 23-59.

20. Echiburú, B., F. Pérez-Bravo, J.E. Galgani, D. Sandoval, C. Saldías, N. Crisosto, M. Maliqueo and T. Sir-Petermann. 2018. Enlarged adipocytes in subcutaneous adipose tissue associated to hyperandrogenism and visceral adipose tissue volumen in women with polycystic ovary syndrome. *Steroids* 130: 15-21.
21. Eisner, J.R., D.A. Dumesic, J.W. Kemnitz and D.H. Abbott. 2000. Timing of prenatal androgen excess determines differential impairment in insulin secretion and action in adult female rhesus monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85(3): 1206-1210.
22. Ek, I., P. Arner, A. Bergqvist, K. Carlström and H. Wahrenberg. 1997. Impaired adipocyte lipolysis in nonobese women with the polycystic ovary syndrome: a possible link to insulin resistance? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(4): 1147 - 1153.
23. Emanuelli, B., P. Peraldi, C. Filloux, D. Sawka-Verhelle, D. Hilton and E. Van Obberghen. 2000. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 275(21): 15985-15991.
24. Esteve, M. 2014. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol. Nutr.* 61(2): 100-112.
25. Fowden, A.L., A.J. Forhead. 2009. Endocrine regulation of foeto-placental growth. *Horm. Res.* 72: 257-265.
26. Franks, S. 2012. 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(6): 2536-2538.
27. Gemmell, R.T., G. Alexander. 1978. Ultrastructural development of adipose tissue in foetal sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 31: 505-515.
28. Gonzalez-Muniesa, P. M.A. Martinez-Gonzalez, F.B. Hu, J. Després, Y. Matsuzawa, R.J.F. Loos, L.A. Moreno, G.A Bray and J.A Martinez. 2017. Obesity. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 3: 17034.
29. Hausman, D.B., M. DiGirolamo, T.J. Bartness, G.J. Hausman and R.J. Martin. 2001. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes. Rev.* 2: 239-254.

30. Hogg, K., C. Wood, A.S. McNeilly and W.C. Duncan. 2011. The *in utero* programming effect of increased maternal androgens and a direct fetal intervention on liver and metabolic function in adult sheep. PLOS ONE 6: e24877.
31. Kang, Y.E., J.M. Kim, K.H. Joung, J.H. Lee, B.R. You, M.J. Choi, M.J. Ryu, Y.B. Ko, M.A. Lee, J. Lee, B.J. Ku, M. Shong, K.H. Lee and H.J. Kim. 2016. The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction. PLOS ONE 11(4): e0154003.
32. Khan, C.R. 1985. The molecular mechanism of insulin action. Ann. Rev. Med. 36: 429-451.
33. Kosut, S.S., R.I. Wood, C. Herbosa-Encarnación and D.L. Foster. 1997. Prenatal androgens time neuroendocrine puberty in the sheep: effect of testosterone dose. Endocrinology 138(3): 1072-1077.
34. Kubota, N., Y. Terauchi, T. Yamauchi, T. Kubota, M. Moroi, J. Matsui, K. Eto, T. Yamashita, J. Kamon, H. Satoh, W. Yano, P. Froguel, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki and T. Noda. 2002. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. J. Biol. Chem. 277(29): 25863-25866.
35. Laviola, L., S. Perrini, A. Cignarelli, A. Natalicchio, A. Leonardini, F. De Stefano, M. Cuscito, M. De Fazio, V. Memeo, V. Neri, M. Cignarelli, R. Giorgino and F. Giorgino. 2006. Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. Diabetes 55(4): 952-961.
36. Lazic, M., F. Aird, J.E. Levine and A. Dunaif. 2011. Prenatal androgen treatment alters body composition and glucose homeostasis in male rats. J. Endocrinol. 208(3): 293-300.
37. Lucas, A. 1998. Programming by early nutrition: an experimental approach. J. Nutr. 128: 401S-406S.
38. Mahoney, M.M., V. Padmanabhan. 2010. Developmental programming: impact of fetal exposure to endocrine disrupting chemicals on gonadotropin-releasing hormone and estrogen receptor mRNA in sheep hypothalamus. Toxicol. Appl. Pharmacol. 247(2): 98-104.

39. Manneras-Holm, L., H. Leonhardt, J. Kullberg, E. Jennische, A. Odén, G. Holm, M. Hellström, L. Lönn, G. Olivecrona, E. Stener-Victorin and M. Lönn. 2011. Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids are strongly associated with insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96(2): E304-E311.
40. Mayes, J.S., G.H. Watson. 2004. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes. Rev.* 5: 197-216.
41. Mehta, K.D. 2014. Emerging role of protein kinase C in energy homeostasis: a brief overview. *World J. Diabetes* 5(3): 385-392.
42. Miller, W.L., R.J. Auchus. 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroideogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.* 32: 81-151.
43. Miki, H., T. Yamauchi, R. Suzuki, K. Komeda, A. Tsuchida, N. Kubota, Y. Terauchi, J. Kamon, Y. Kaburagi, J. Matsui, Y. Akanuma, R. Nagai, S. Kimura, K. Tobe and T. Kadowaki. 2001. Essential role of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 21(7): 2521-2532.
44. Mitsuhashi, K., T. Senmaru, T. Fukuda, M. Yamazaki, K. Shinomiya, M. Ueno, S. Kinoshita, J. Kitawaki, M. Katsuyama, M. Tsujikawa, H. Obayashi, N. Nakamura and M. Fukui. 2016. Testosterone stimulates glucose uptake and GLUT4 translocation through LKB1/AMPK signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrine* 51: 174-184.
45. Nada, S.E., R.C. Thompson and V. Padmanabhan. 2010. Developmental programming: differential effects of prenatal testosterone excess on insulin target tissues. *Endocrinology* 151(11): 5165-5173.
46. Niswender, K.D., D.G. Baskin and M.W. Schwartz. 2004. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends. Endocrinol. Metab.* 15(8): 362-369.
47. Padmanabhan, V., A. Veiga-Lopez. 2013. Animal models of the polycystic ovary syndrome phenotype. *Steroids* 78(8): 734-740.

48. Padmanabhan, V., M. Manikkam, S. Recabarren and D. Foster. 2006. Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic dysfunction in the female. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246: 165-174.
49. Padmanabhan, V., A. Veiga-Lopez, D.H. Abbott., S.E. Recabarren and C. Herkimer. 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.
50. Parlee, S.D., S.I. Lentz, H. Mori and O.A. MacDougald. 2014. Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. *Methods Enzymol.* 537: 93-122.
51. Poissonnet, C.M., A.R. Burdi and F.L. Bookstein. 1983. Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum. Dev.* 8: 1-11.
52. Recabarren, S.E., P.P. Rojas-García, M.P. Recabarren, K. Norambuena y T. Sir-Petermann. 2009. Impacto de la exposición prenatal a testosterona sobre parámetros biométricos y endocrinos en ovinos recién nacidos. *Arch. Med. Vet.* 41: 43-51.
53. Recabarren, S.E., P.P. Rojas-García, M.P. Recabarren, V.H. Alfaro, R. Smith, V. Padmanabhan y T. Sir-Petermann. 2008. Prenatal testosterone excess reduces sperm count and motility. *Endocrinology* 149(12): 6444-6448.
54. Recabarren, S.E., V. Padmanabhan, E. Codner, A. Lobos, C. Durán, M. Vidal, D.L. Foster and T. Sir-Petermann. 2005. Postnatal developmental consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated prenatally with testosterone. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289: E801-E806.
55. Rojas-García, P.P., M.P. Recabarren, L. Sarabia, J. Schön, C. Gabler, R. Einspanier, M. Maliqueo, T. Sir-Petermann, R. Rey and S.E. Recabarren. 2010. Prenatal testosterone excess alters sertoli and germ cell number and testicular FSH receptor expression in rams. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299(6): E998-E1005.

56. Rosen, E.D., B.M. Spiegelman. 2014. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 156: 20-44.
57. Rosenfield, R.L., D.A. Ehrmann. 2016. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS): the hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited. *Endocr. Rev.* 37(5): 467-520.
58. Rosenwald, M., C. Wolfrum. 2014. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte* 3: 4-9.
59. Sarjeant, K., J.M. Stephens. 2012. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 4: a008417.
60. Sarr, O., K. Yang and T.R.H. Regnault. 2012. *In utero* programming of later adiposity: the role of fetal growth restriction. *J. Pregnancy*. 2012, 134758.
61. Seki, Y., L. Williams, P.M. Vuguin and M.J. Charron. 2012. Minireview: epigenetic programming of diabetes and obesity: animal models. *Endocrinology* 153(3): 1031-1038.
62. Shearin, A.L., B.R. Monks, P. Seale and M.J. Birnbaum. 2016. Lack of AKT in adipocytes causes severe lipodystrophy. *Molec. Metab.* 5: 472-479.
63. Sir-Petermann, T., M. Maliqueo, B. Angel, H.E. Lara, F. Pérez-Bravo, and S.E. Recabarren. 2002. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum. Reprod.* 17(10): 2573-2579.
64. Sir-Petermann, T., A. Ladrón de Guevara, A.C. Villarroel, J. Preisler, B. Echiburú y S. Recabarren. 2012. Síndrome de ovario poliquistico y embarazo. *Rev. Med. Chile* 140: 919-925.
65. Sjögren, J., M. Li and P. Björntorp. 1995. Androgen hormone binding to adipose tissue in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1244: 117-120.
66. Symonds, M.E., M. Pope, D. Sharkey y H. Budge. 2012. Adipose tissue and fetal programming. *Diabetologia*. 55: 1597-1606.
67. Tchkonina, T., T. Thomou, Y. Zhu, I. Karagiannides, C. Pothoulakis, M. Jensen and J. Kirkland. 2013. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab.* 17(5): 644-656.

68. Van Harmelen, V., T. Skurk, K. Röhrig, Y-M. Lee, M. Halbleib, I. Aprath-Husmann and H. Hauner. 2003. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int. J. Obes.* 27: 889-895.
69. Veiga-López, A., J. Moeller, D. Patel, W. Ye, A. Pease, J. Kinns and V. Padmanabhan. 2013. Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess on insulin sensitivity, adiposity and free acid profile in postpubertal female sheep. *Endocrinology* 154(5): 1731-1742.
70. Villena, J.A. 2013. Brown adipose tissue and control of body weight: a new potential target for the treatment of obesity [en línea]. IConcept Press, Australia. <https://www.researchgate.net/publication/259341917_Brown_Adipose_Tissue_and_Control_of_Body_Weight_A_New_Potential_Target_for_the_Treatment_of_Obesity>. [Consulta: 05 junio 2016].
71. Virtanen, K.A., P. Lönnroth, R. Parkkola, P. Peltoniemi, M. Asola, T. Viljanen, T. Tolvanen, J. Knuuti, T. Rönnemaa, R. Huupponen and P. Nuutila. 2002. Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87(8): 3902-3910.
72. Witters, L.A., T.D. Watts, D.L. Daniels and J.L. Evans. 1988. Insulin stimulates the desphosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxilase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 5473-5477.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Declaro que el trabajo presentado es personal e inédito, que cada una de las citas bibliográficas son correctas y están debidamente reconocidas, que no contiene copias totales ni parciales de otras investigaciones excepto citas aceptadas como trabajos científicos, que no afectan los derechos de autor y que se mantiene dentro del marco ético de trabajos científicos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción.



Sofía Paz Bellalta Bremer

APÉNDICE

Tabla 3. Partidores de oligonucleótidos utilizados en ensayos qPCR.

Genes	Secuencias 5' - 3'	Amplicón (bp)	Número GeneBank
IR	F: GACGCAGGCCGGAGATGACCA R: GCTCCTGCCCGAAGACCGACTC	200	AJ844652.1
IRS-1	F: TGGCACTGGGCGTAGAGGAGAAGG R: CGCCATCAGCTACGCCGACAT	293	XM_581382.3
IRS-2	F: CCCGAGAAGGTGGCCCGCATCA R: AGCAACACGCCCGAGTCCATC	268	NM_003749.2
PI3K	F: TATATGGCGTAGCTGTGGAGA R: AGGGCAAATAATAGTGGTGAT	391	M_93252.1
AKT	F: GACCACGCCAGCCCCACCAGT R: GGACAAGGACGGCCACATCAAGA	168	NM_173986.2
PKC	F: CCTCCCACGTGTTGAAAGGA R: GCGGAAGAAGGCATGAGACT	104	XM_004014045.1
GLUT4	F: GCTTGGCTTCTTCATCTTCACCTT R: TGCTCAGACCACCCTTCCCTCCAG	162	AB005283.1