



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

**EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN  
PRENATAL A UN EXCESO DE TESTOSTERONA SOBRE  
LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DEL PÁNCREAS  
ENDOCRINO EN OVEJAS**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

ALBERT RONALD CARRASCO MORALES

CHILLÁN-CHILE

2020

Profesor Guía: Sergio Recabarren Morgado

Dpto. de Ciencia Animal

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

---

Dr. Sergio Recabarren Morgado  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



---

Dr. Daniel Sandoval Silva  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

---

Dr. Víctor Hugo Parraguez Gamboa  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias  
Universidad de Chile

---

Dr. Marcelo Ratto Fuster  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Austral de Chile

Director de Programa

---

Dr. Fidel Castro Reboredo  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción



*A todos los que han contribuido de una u otra forma a mi vida.*

*A Josefa.*

*A mis padres y hermanos.*

*A mis amigos.*

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que hicieron posible concluir este proceso, asistiéndome directa o indirectamente a ello desde una perspectiva académica, científica o personal.

En primer lugar, agradecer profundamente la tutela del Dr. Sergio Recabarren Morgado, quien fue una parte fundamental en este proceso. Dr. Recabarren, agradezco su apoyo y confianza en todo momento, por su guía y asistencia, por su exigencia, por su dedicación, por motivarme y aconsejarme, por nuestras conversaciones y la formación que en todo momento me procuró. Agradezco su ánimo, su prestancia y su ayuda, ya que todo ello fue un aliento importante que me instó a finalizar exitosamente este proceso.

Agradezco al Dr. Pedro Rojas García por su amabilidad, por su calidad humana, por su ayuda, por abrirme las puertas del laboratorio, su comprensión, su confianza y la formación científica y académica prestada. Le manifiesto mi gratitud a la Dra. Mónica Recabarren Alarcón, por ayudarme, por sus consejos y asistencia, por su gran guía y formación en varios aspectos de mi vida. Al Dr. Manuel Maliqueo Yevilao por aceptarme y formarme científicamente durante mi unidad de investigación, por su guía, por su amistad, por su asistencia en la preparación de modelos experimentales, en el perfeccionamiento de los protocolos y técnicas de laboratorio y sus valiosos consejos y grandes conversaciones. A la Dra. Teresa Sir-Petermann, al Dr. Nicolás Crisosto y a la Dra. Bárbara Echiburú por su guía, su tutoría y su amistad.

En especial agradezco a mi familia, un pilar importante en mi vida. A mi padre y mi madre quienes se esmeraron e hicieron de mi gran parte de lo que soy, agradezco su abnegación, su dedicación y su incondicionalidad, por su compañía en este proceso y en todo momento. Agradezco los valores que inculcaron en mí y su compromiso constante con mi formación y la de mis hermanos. A mis hermanos Róbinson, Jean, Karen y Allan, por su compañía, nuestras conversaciones y todos los momentos que compartimos juntos.

Agradezco a Felipe Díaz, tu amistad, tus consejos y tu ayuda; a Jonathan, Mario, Alonso y Nicolás por su ayuda, compañía, asistencia y amistad. A los distintos estudiantes de pregrado, a los tesisistas del laboratorio que me ayudaron a concretar los diferentes estudios y experimentos realizados.

A mis amigos: Felipe Navarrete, Ignacio Troncoso, Pedro Pablo Silva, Pablo Melo, Miguel Ángel Opazo, Andrés Rodríguez, Nelson Vera, Eduardo Larenas y muchos otros que me acompañaron, aconsejaron, por sus palabras o simplemente por estar ahí en los distintos momentos, por ser una parte fundamental en mis logros y en mi vida. A mis amigos José Manríquez y Alejandra Velásquez por su asistencia y enorme ayuda para concretar mis experimentos, por su tiempo y su gran contribución en mi formación y trabajo científico.

Al Dr. Fernando Saravia y al Dr. José Cox por su asistencia, guía y cooperación con los procedimientos y manejos reproductivos de las hembras empleadas en los estudios. Al Dr. Rubén Pérez por su formación y ser un referente y mentor. A don José Garcés por su ayuda y cooperación en los manejos preventivos de los animales experimentales. Al Dr. Fidel Castro por sus consejos, su guía, su amabilidad y comprensión, a la Dra. Lleretny Rodríguez por facilitarme las dependencias y equipamientos del laboratorio de Biotecnología Animal, a Daniela Rojas por su enorme ayuda y cooperación, aportando con su trabajo y conocimiento al desarrollo de varios experimentos, a la Sra. Clara Castro por su disposición, su amabilidad y asistencia.

Finalmente agradecer a ti, Josefa, nuestros momentos juntos, tus ojos y tu sonrisa iluminan mi alma, tus palabras me motivan a querer y buscar más, no por mí, por ti, porque contigo aprendí aquello que nadie puede enseñarte. Por ti y para ti...

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis fue financiada por:

Proyecto FONDECYT N° 1140433 (2014-2017).

Beca CONICYT para estudios de doctorado nacional (2014-2018).

Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Animal, Universidad de Concepción.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xxiii
RESUMEN.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxviii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Páncreas.....	2
1.1 Estructura y función.....	2
1.2 Desarrollo del páncreas endocrino.....	3
2. Insulina.....	6
2.1 Estructura y función.....	6
2.2 Secreción de insulina.....	7
3. Resistencia a la insulina y diabetes.....	9
3.1 Resistencia a la insulina.....	9
3.2 Diabetes mellitus.....	10
3.3 Alteración en la funcionalidad de las células $\beta$ pancreáticas.....	10
4. Programación fetal, epigénesis y reprogramación fetal.....	12
4.1 Programación y reprogramación del desarrollo.....	12
4.2 Epigénesis.....	14
5. Reprogramación de la funcionalidad pancreática.....	16
5.1 Programación de alteraciones pancreáticas.....	16
5.2 Reprogramación en las células $\beta$ pancreáticas.....	17

6. Reprogramación de la sensibilidad a la insulina debido a la exposición prenatal a un exceso de andrógenos en ovinos.....	20
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>22</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
1. Animales de experimentación.....	27
1.1 Grupos experimentales.....	27
1.2 Protocolo de androgenización.....	28
2. Procedimientos quirúrgicos.....	29
2.1 Cesárea.....	29
2.2 Ooforectomía.....	31
2.3 Cateterización.....	32
3. Test de tolerancia a la glucosa endovenosa (TTGEV).....	33
4. Sensibilidad a la insulina.....	34
5. Ensayos endocrinos y bioquímicos.....	36
6. Estudios morfológicos.....	37
6.1 Preparación de la muestra.....	37
6.2 Análisis morfológico.....	37
7. Ensayos de expresión génica.....	38
7.1 Microdissección láser.....	41
7.2 Extracción de ARN total.....	42
7.3 Reacción de transcripción inversa.....	42
7.4 PCR.....	43
7.5 PCR tiempo real (qPCR).....	43
8. Aislamiento de proteínas.....	44
8.1 Extracción de proteínas.....	44
8.2 Cuantificación de proteínas totales.....	44



8.3 Determinación de la integridad de las proteínas.....	44
9. Western-blot.....	45
9.1 Electroforesis de proteínas.....	45
9.2 Transferencia a membrana.....	45
9.3 Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado.....	45
9.4 Cuantificación de la intensidad de bandas.....	46
10. Inmunohistoquímica.....	46
11. Análisis estadístico.....	47
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
Alteraciones endocrinas y metabólicas en ovejas gestantes tratadas con testosterona.....	49
Efectos de la administración de testosterona en ovejas preñadas y fetos hembra a los 120 días de gestación.....	58
Efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en ovejas peripuberales de 26 semanas de edad.....	64
Efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la sensibilidad a insulina en ovejas a las 30 semanas de edad.....	72
Sensibilidad a la insulina en hembras ooforectomizadas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 30 semanas de edad.....	80
Efecto de la administración crónica de testosterona sobre la sensibilidad a insulina en ovejas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona de 38 semanas de edad.....	88
Efecto de la administración aguda de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en hembras ooforectomizadas de 38 semanas de edad expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.....	96
Efecto de la administración crónica de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en hembras ooforectomizadas adultas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.....	108
Efecto de la administración crónica de testosterona sobre la estructura del páncreas y la secreción y producción de insulina estimulada por glucosa.....	117

<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>137</b>
Efectos sobre la madre y consecuencias en el feto.....	137
Efectos sobre la sensibilidad a la insulina en la vida postnatal.....	144
Efectos sobre la estructura y funcionalidad del páncreas endocrino.....	154
Perspectivas futuras.....	169
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>174</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>176</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>206</b>
<b>9. LISTA DE PUBLICACIONES.....</b>	<b>210</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Esquema secuencial de la diferenciación progresiva de las distintas células que forman parte del páncreas endocrino relacionados con la expresión/represión de factores de transcripción (Ben-Othman <i>et al.</i> , 2013).....	5
<b>Figura 2</b> Secreción de insulina, por parte de las células $\beta$ pancreáticas, estimulada por glucosa.....	8
<b>Figura 3</b> Imágenes representativas de un corte histológico pancreático en hembras control (izquierda) y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (derecha) de 38 semanas de edad con inmunotinción contra insulina (barra=100 $\mu$ m).....	119
<b>Figura 4</b> Imágenes representativas de inmunohistoquímica en secciones pancreáticas (40x) con inmunorreactividad a insulina (superior) y glucagón (inferior) en hembras ovinas de 38 semanas control (izquierda) y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (derecha) barra =100 $\mu$ m.....	127
<b>Figura 5</b> Imágenes representativas de islotes de Langerhans en hembras-C. Inmunorreactividad de las distintas poblaciones celulares en distintas secciones del tejido pancreático (rojo: insulina; verde: glucagón; lila: somatostatina; azul: DAPPI), las flechas lilas indican células $\delta$ en el interior de los islotes. Panel A, C y D 10x, panel B: imagen aumentada del islote presente en el panel A (20x).....	128
<b>Figura 6</b> Imágenes representativas de islotes pancreáticos en hembras-T. Inmunorreactividad de las distintas poblaciones celulares	

en secciones del tejido pancreático (rojo: insulina; verde: glucagón; lila: somatostatina; azul: DAPPI), las flechas lilas indican células  $\delta$  en el interior de los islotes, flechas blancas indican grupos de células que no presentan inmunorreactividad a insulina, glucagón o somatostatina; flechas rojas indican pequeñas agrupaciones de células  $\beta$  libres o cercanas a los vasos sanguíneos..... 129

**Figura 7** Secciones histológicas pancreáticas representativas de islotes de Langerhans teñidos con inmunotinción fluorescente anti-Pdx1 en células  $\beta$  (verde) en hembras ovinas adultas control (A) y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (B). Cuantificación relativa del contenido de Pdx1 en células  $\beta$  (C)..... 135

**Figura 8** Secciones histológicas pancreáticas representativas de los islotes de Langerhans con inmunotinción fluorescente anti-insulina en células  $\beta$  (rojo) en hembras ovinas adultas control (A) y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (B). Cuantificación relativa del contenido de insulina en células  $\beta$  (C)..... 136

**Figura 9** Resumen de los efectos endocrinos de la administración de testosterona en ovejas preñadas y en fetos ovinos hembra de 120 días de gestación debido a la exposición prenatal a un exceso de testosterona..... 144

**Figura 10** Modelo de los efectos de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa y la síntesis de insulina estimulada por glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas de ovejas adultas..... 159

**Figura 11** Modelo propuesto del efecto de exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la estructura de los islotes pancreáticos y las alteraciones que se producen sobre las células  $\beta$  pancreáticas en ovejas adultas..... 165

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b> Secuencia de partidores y temperaturas de alineamiento para la amplificación de los genes mediante PCR tiempo real.....	38
<b>Tabla 2</b> Comparación de las variables endocrinas y bioquímicas de las madres-C y madres-T a los 120 días de gestación.....	59
<b>Tabla 3</b> Comparación de las variables endocrinas y bioquímicas entre fetos ovinos, fetos-C y fetos-T, a los 120 días de gestación.....	60
<b>Tabla 4</b> Comparación de registros zoométricos y peso de órganos en fetos-C y fetos-T hembra ovinos a los 120 días de gestación....	62
<b>Tabla 5</b> Correlación entre registros zoométricos en fetos-C y fetos-T de 120 días de gestación.....	63
<b>Tabla 6</b> Peso y variables endocrinas plasmáticas en hembras-C y hembras-T peripuberales (26 semanas de edad).....	65
<b>Tabla 7</b> Peso corporal y variables endocrinas seleccionadas en hembras-C y hembras-T a las 30 semanas de edad.....	73
<b>Tabla 8</b> Peso y concentración plasmática de esteroides sexuales en hembras-C y hembras-T de 30 semanas de edad ooforectomizadas.....	81
<b>Tabla 9</b> Peso y variables bioquímicas, metabólicas y endocrinas plasmáticas en hembras-C y hembras-T a las 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.....	88
<b>Tabla 10</b> Peso corporal y concentración plasmática de testosterona previo y 48 horas tras la administración de testosterona en hembras ovinas ooforectomizadas adultas de 38 semanas de edad control y expuestas prenatalmente a un exceso de	

	testosterona.....	97
<b>Tabla 11</b>	Concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV en hembras ovinas adultas ooforectomizadas previo y 48 horas tras la administración de testosterona.....	98
<b>Tabla 12</b>	Concentración plasmática de insulina basal, máxima y promedio durante el TTGEV en hembras ovinas adultas ooforectomizadas previo y 48 horas tras la administración de testosterona.....	101
<b>Tabla 13</b>	Promedio $\pm$ EEM del área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa previo y 48 horas después de la administración de una dosis de testosterona en hembras-C y hembras-T.....	104
<b>Tabla 14</b>	Promedio $\pm$ EEM del área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV previo y 48 horas después de la administración de una dosis de testosterona en hembras-C y hembras-T a las 38 semanas de edad.....	105
<b>Tabla 15</b>	Peso corporal, variables bioquímico-metabólicas, endocrinas y transaminasas hepáticas en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas adultas tras la administración crónica de testosterona.....	109

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	<b>Página</b>
<b>Gráfico 1</b> Progresión del peso corporal de las madres-T y madres-C desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación.....	49
<b>Gráfico 2</b> Concentración plasmática de testosterona en madres-C y madres-T desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación (***: diferencia estadísticamente significativa entre los grupos $P < 0,001$ ).....	50
<b>Gráfico 3</b> Concentración plasmática de progesterona en madres-T y madres-C desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación (*: Diferencia estadísticamente significativa al comparar la concentración plasmática de progesterona en ambos grupos con respecto a la cuarta semana de gestación).	51
<b>Gráfico 4</b> Concentración plasmática de cortisol en madres-T y madres-C desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación....	52
<b>Gráfico 5</b> Concentración plasmática de insulina durante el periodo experimental en madres-T y madres-C.....	53
<b>Gráfico 6</b> Concentración plasmática de glucosa en madres-C y madres-T desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación. ....	54
<b>Gráfico 7</b> Relación insulina/glucosa basal en madres-C y madres-T desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación.....	55
<b>Gráfico 8</b> Concentración de proteínas plasmáticas totales en madres-C y madres-T desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación.....	56
<b>Gráfico 9</b> Concentración plasmática de triglicéridos en madres-C y madres-T desde la cuarta a la decimoséptima semana de	

	gestación.....	57
<b>Gráfico 10</b>	Concentración plasmática de colesterol total en madres-C y madres-T desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación (*: Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos).....	58
<b>Gráfico 11</b>	Dinámica y promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el primer TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 26 semanas de edad.....	66
<b>Gráfico 12</b>	Dinámica de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV y promedio de la concentración de insulina tras la administración de glucosa en hembras-C y hembras-T a las 26 semanas de edad.....	67
<b>Gráfico 13</b>	Relación insulina/glucosa basal durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T de 26 semanas de edad.....	68
<b>Gráfico 14</b>	Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 26 semanas de edad.....	69
<b>Gráfico 15</b>	Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina durante el primer TTGEV.....	70
<b>Gráfico 16</b>	ISI-Composite durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 26 semanas de edad.....	70
<b>Gráfico 17</b>	ISI-Grulet o constante de utilización de la glucosa durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 26 semanas de edad.....	71
<b>Gráfico 18</b>	Tasa de desaparición de la glucosa durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 26 semanas de edad.....	72
<b>Gráfico 19</b>	Dinámica de la concentración plasmática de glucosa y promedio de la concentración de glucosa durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 30 semanas de edad.....	74
<b>Gráfico 20</b>	Dinámica de la concentración plasmática de insulina y	



	promedio de la concentración plasmática de insulina durante el segundo TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 30 semanas de edad.....	75
<b>Gráfico 21</b>	Relación insulina/glucosa basal durante el segundo TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 30 semanas de edad.....	76
<b>Gráfico 22</b>	Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa durante el segundo TTGEV en hembras-C y hembras-T.....	77
<b>Gráfico 23</b>	Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina durante el segundo TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 30 semanas de edad.....	78
<b>Gráfico 24</b>	ISI-Composite durante el segundo TTGEV en hembras-T y hembras-C a las 30 semanas de edad.....	79
<b>Gráfico 25</b>	ISI-Grulet o constante de utilización de la glucosa durante el segundo TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 30 semanas de edad.....	79
<b>Gráfico 26</b>	Tasa de desaparición de la glucosa durante el segundo TTGEV realizado en la etapa post-puberal temprana en borregas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.....	80
<b>Gráfico 27</b>	Dinámica y promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 30 semanas de edad.....	82
<b>Gráfico 28</b>	Dinámica y promedio de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 30 semanas de edad.....	83
<b>Gráfico 29</b>	Relación insulina/glucosa basal en hembras ovinas ooforectomizadas de 30 semanas de edad expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona y control.....	83
<b>Gráfico 30</b>	Área bajo la curva basal, estimulada e incremental en	

	hembras ovinas ooforectomizadas de 30 semanas de edad control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.....	84
<b>Gráfico 31</b>	Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina en hembras ovinas ooforectomizadas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 30 semanas de edad.....	85
<b>Gráfico 32</b>	ISI-Composite en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 30 semanas de edad.....	86
<b>Gráfico 33</b>	ISI-Grulet en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 30 semanas de edad.....	87
<b>Gráfico 34</b>	Tasa de desaparición de glucosa en hembras-C y hembras-T ovariectomizadas de 30 semanas de edad.....	87
<b>Gráfico 35</b>	Dinámica y promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.....	90
<b>Gráfico 36</b>	Dinámica y promedio de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV en hembras ovinas control y EPT tras la administración crónica de testosterona.....	91
<b>Gráfico 37</b>	Relación insulina/glucosa basal durante el TTGEV en hembras ovinas de 38 semanas de edad control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona tras la administración crónica de testosterona.....	92
<b>Gráfico 38</b>	Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa durante el tercer TTGEV en hembras-C y hembras-T de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.....	93
<b>Gráfico 39</b>	Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina en hembras C y hembras-T enteras a las 38 semanas de edad tras 8 semanas	

	de la administración crónica de testosterona.....	94
<b>Gráfico 40</b>	ISI-Composite en hembras-C y Hembras-T de 38 semanas de edad tras 8 semanas de administración de testosterona.....	95
<b>Gráfico 41</b>	ISI-Grulet en hembras-C y hembras-T de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.....	95
<b>Gráfico 42</b>	Tasa de desaparición de la glucosa en hembras-C y hembras-T enteras de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.....	96
<b>Gráfico 43</b>	Dinámica y promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV previo (superior) y 48h tras la administración de testosterona (inferior) en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad.....	99
<b>Gráfico 44</b>	Dinámica y promedio de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV en hembras ovinas adultas ooforectomizadas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona previo y 48 horas tras la administración de testosterona.....	101
<b>Gráfico 45</b>	Relación insulina/glucosa basal en hembras adultas ooforectomizadas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona y control previo y 48 horas tras la administración de testosterona.....	102
<b>Gráfico 46</b>	Área bajo la curva de la concentración plasmática de glucosa durante los TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad previo y 48 horas tras la administración de testosterona.....	104
<b>Gráfico 47</b>	Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina en hembras-C y hembras-T de 38 semanas de edad antes y 48 horas después de la administración de una dosis de testosterona.....	105
<b>Gráfico 48</b>	ISI-Composite durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad previo y 48	

	horas tras la administración de testosterona.....	106
<b>Gráfico 49</b>	ISI-Grulet en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas adultas previo y 48 horas tras la administración de testosterona.....	107
<b>Gráfico 50</b>	Tasa de desaparición de la glucosa previo y tras la administración de glucosa en hembras-C y hembras-T ovariectomizadas de 38 semanas de edad.....	108
<b>Gráfico 51</b>	Dinámica y promedio de la concentración plasmática de glucosa durante TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.....	111
<b>Gráfico 52</b>	Dinámica y promedio de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.....	112
<b>Gráfico 53</b>	Relación insulina/glucosa basal en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.....	113
<b>Gráfico 54</b>	Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV tras la administración crónica de testosterona en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad.....	114
<b>Gráfico 55</b>	Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.....	115
<b>Gráfico 56</b>	ISI-Composite durante el TTGEV en ovejas adultas ooforectomizadas de 38 semanas de edad control y EPT tras la administración crónica de testosterona.....	116
<b>Gráfico 57</b>	ISI-Grulet en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad tras la administración crónica de	

	testosterona.....	116
<b>Gráfico 58</b>	Tasa de desaparición de la glucosa en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas tras la administración crónica de testosterona.....	117
<b>Gráfico 59</b>	Peso absoluto (izquierda) y relativo (derecha) del páncreas en hembras ovinas adultas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 38 semanas de edad.....	118
<b>Gráfico 60</b>	Área fraccional (panel A), número los islotes (panel B), densidad numérica (panel C) y tamaño promedio de los islotes pancreáticos (panel D) en hembras ovinas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 38 semanas de edad.....	120
<b>Gráfico 61</b>	Área (izquierda) y perímetro (derecha) de los islotes de Langerhans en hembras-C y hembras-T de 38 semanas de edad.....	121
<b>Gráfico 62</b>	Frecuencia numérica (izquierda) y porcentual (panel pequeño) del área de los islotes de Langerhans en hembras ovinas de 38 semanas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.....	121
<b>Gráfico 63</b>	Frecuencia numérica (izquierda) y porcentual (panel pequeño) del perímetro de los islotes en hembras ovinas de 38 semanas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.....	122
<b>Gráfico 64</b>	Índices morfológicos de los islotes pancreáticos en hembras ovinas de 38 semanas control y EPT.....	124
<b>Gráfico 65</b>	Área inmunorreactiva a insulina (panel superior), glucagón (panel inferior-izquierda) y somatostatina (panel inferior-derecha) en islotes pancreáticos de ovejas a las 38 semanas de edad control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.....	126

<b>Gráfico 66</b>	Correlación entre el área de los islotes y área inmunorreactiva a insulina en hembras adultas control (izquierda) y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (derecha).....	130
<b>Gráfico 67</b>	Expresión relativa del ARNm de insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina en tejido pancreático total en hembras ovinas adultas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.....	131
<b>Gráfico 68</b>	Expresión de ARNm de GLUT2, glucoquinasa (GCK), KCNJ11, SUR1 y CACNA1D en hembras ovinas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 38 semanas de edad.....	132
<b>Gráfico 69</b>	Expresión del ARNm de los factores de transcripción involucrados en la diferenciación endocrina (FOXO1, NGN3) y en la mantención del fenotipo funcional $\alpha$ (ARX, MAFB) y $\beta$ (PAX4, MAFA, NKX6.1) en tejido pancreático total en hembras adultas de 38 semanas de edad control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.....	133
<b>Gráfico 70</b>	Expresión de ARNm del receptor de insulina (IR), substratos del receptor de insulina (IRS1 y 2), fosfatidilinositol-3 kinasa, proteína kinasa C, AKT, transportador de glucosa tipo 4 en hembras ovinas a las 38 semanas de edad control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.....	134

## ÍNDICE DE ANEXOS

		<b>Página</b>
<b>Anexo 1</b>	Carta de aprobación de los manejos animales y procedimientos experimentales del Comité de Bioética.....	206
<b>Anexo 2</b>	Hoja de registro del protocolo de supervisión ovino.....	207
<b>Anexo 3</b>	Esquema de los experimentos durante las diferentes etapas de desarrollo somático.....	208
<b>Anexo 4</b>	Esquema de los experimentos durante las diferentes etapas de desarrollo somático y objetivos específicos asociados.....	209



## **RESUMEN**

### **EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A UN EXCESO DE TESTOSTERONA SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DEL PÁNCREAS ENDOCRINO EN OVEJAS**

El feto es un individuo con un potencial genético determinado durante la fecundación. Sin embargo, el fenotipo que adquirirá este individuo depende de la forma en que se exprese su patrimonio genético en función del cómo el ambiente module este proceso. Por ello, las características morfológicas y fisiológicas que tendrá un individuo pueden ser modificadas de acuerdo a las condiciones y las exigencias del ambiente, en función del genoma que este alberga para asegurar la sobrevivencia, proceso conocido como plasticidad. Varias sustancias son capaces de modificar el entorno en el que un individuo vive, incluso durante la vida embrionaria y fetal, provocando una desviación en el desarrollo denominada reprogramación. Entre estas sustancias, la exposición fetal a un exceso de testosterona es un fenómeno que provocaría una reprogramación del desarrollo de este individuo incrementando el riesgo a que padezca diabetes mellitus tipo 2 durante la vida adulta. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la administración de testosterona, en ovejas gestantes, sobre la fisiología de la madre, las variables morfológicas y endocrino-metabólicas de los fetos hembra, la sensibilidad de los tejidos a la insulina en distintas etapas de desarrollo somático (26, 30 y 38 semanas de edad) y el efecto de la administración de testosterona en hembras adultas enteras y ooforectomizadas sobre la sensibilidad a la insulina y la estructura y funcionalidad del páncreas endocrino. Para esto, un rebaño de ovejas adultas de 2-3 años de edad fueron cruzadas con machos de fertilidad probada. El día 28 tras la cruce se confirmó la gestación por ultrasonografía y las hembras preñadas fueron separadas en dos grupos considerando las variables peso y edad como criterios de selección. Un grupo de estas hembras fue sometido a un protocolo de



androgenización, que consistió en la administración por vía intramuscular de una solución de propionato de testosterona disuelta en aceite de maravilla, dos veces por semana, en dosis de 30 mg/oveja desde el día 30 al 90 de gestación y 40 mg/oveja desde el día 91 al 120 de gestación (Madres-T). Otro grupo de hembras gestantes (Madres-C) sólo recibió el vehículo en el que se diluyó la testosterona durante el periodo experimental. Desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación las hembras gestantes fueron pesadas y se colectaron muestras de sangre yugular desde las que se determinaron distintas variables endocrino-metabólicas. A los 120 días de gestación en un grupo de hembras preñadas se realizó una cesárea en la que se extrajeron los fetos hembra, éstos fueron pesados y se registraron las medidas zoométricas, se colectó una muestra de sangre yugular para realizar análisis endocrinos y metabólicos. Otro grupo de hembras preñadas parieron y las crías hembra fueron empleadas en los siguientes experimentos. En estas crías, a las 26 semanas de edad (periodo considerado peripuberal), se realizó un test de tolerancia a la glucosa endovenosa (TTGEV) durante la fase folicular del ciclo estral. Tras este estudio la mitad de las hembras de cada grupo fueron ooforectomizadas. A las 30 semanas de edad (periodo considerado como postpuberal temprano) se realizó un segundo TTGEV en las hembras enteras y ooforectomizadas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (EPT) para evaluar el efecto de los esteroides endógenos de origen ovárico sobre la sensibilidad a la insulina. Desde las 30 a las 38 semanas de edad, a las hembras se les inyectó testosterona, en dosis de 40 mg/oveja dos veces por semana y, una vez finalizado este protocolo, se les realizó un tercer TTGEV para evaluar el efecto de la hiperandrogenemia crónica sobre la sensibilidad a la insulina. Adicionalmente, durante esta etapa (38 semanas de edad, periodo considerado postpuberal tardío) un grupo de hembras ooforectomizadas sólo recibió una dosis de testosterona (40 mg/oveja) y se realizó un TTGEV, previo y 48 horas tras la administración de testosterona, para evaluar el efecto agudo de la administración de este andrógeno sobre la sensibilidad a la insulina. Dos días tras este ensayo las hembras fueron eutanasiadas y muestras de tejido pancreático fueron obtenidas para estudios histológicos y moleculares (qPCR y Western-blot) con el objetivo de evaluar la secreción y producción de insulina estimulada por glucosa y la mantención del fenotipo funcional de las células endocrinas pancreáticas. Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  EEM. Se realizó un análisis de normalidad y la comparación entre los

grupos se llevó a cabo por medio de pruebas paramétricas o no paramétricas de acuerdo a la distribución determinada (comparación de medias, correlaciones zoométricas y diferencias en la dinámica de la concentración plasmática de las variables endocrinas y metabólicas, entre otras). Los análisis fueron realizados con el programa GraphPad Prism 8 considerando un valor de  $P < 0,05$  como una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. La administración de testosterona en las madres gestantes provocó un aumento sostenido en la concentración plasmática de testosterona por el periodo en que se inyectó este andrógeno, sin afectar otras variables endocrinas y metabólicas. A los 120 días de gestación, la concentración plasmática de colesterol total, testosterona total y libre fue significativamente mayor en las madres tratadas y la concentración plasmática de progesterona fue menor en este grupo (Madres-T). En los fetos hembra del grupo tratado (fetos-T) la concentración plasmática de testosterona y estradiol fue mayor y la de insulina, IGF-II y adiponectina fue menor respecto a los fetos control. Además, la distancia ano-apertura genital y apertura genital-ombiligo fue mayor y menor en los fetos-T, respectivamente, y el peso de la glándula adrenal derecha y el ovario izquierdo fue menor en este grupo de fetos. A las 26 semanas de edad, no hubo diferencias entre los grupos de hembras en las variables endocrinas y metabólicas, ni en los índices de sensibilidad a la insulina estimados a partir de los resultados del TTGEV. En las hembras-T enteras, a las 30 semanas de edad, durante el TTGEV secretaron más insulina que las hembras-C, sin presentar diferencias en esto, en la relación insulina/glucosa o en el ISI-C. Sin embargo, el ISI-Grulet fue menor y la tasa de desaparición de la glucosa (TDG) fue mayor en las hembras-T. A las 38 semanas de edad, tras la administración crónica de testosterona, el promedio de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV fue mayor en las hembras-T, provocando un aumento en el área bajo la curva estimulada (ABC-E), sin cambios en los otros índices de sensibilidad a la insulina. En las hembras ooforectomizadas a las 30 semanas, el promedio de la concentración plasmática de glucosa y la dinámica de esta, durante el TTGEV, fue menor en las hembras-Tovx. No se evidenciaron diferencias en la insulina secretada o en los índices de sensibilidad a la insulina estimados. Tras la administración aguda de testosterona, el promedio de la secreción de insulina fue significativamente mayor en las hembras-C previo y 48 horas tras la administración de testosterona, y el ISI-Composite fue menor en este grupo de hembras tras la administración

de testosterona. En cambio, la administración crónica de testosterona, no generó cambios en la dinámica de la concentración plasmática de insulina y glucosa, pero la TDG fue mayor en las hembras-Tovx. Respecto a los análisis morfológicos y moleculares pancreáticos, el peso absoluto y relativo del páncreas fue similar entre los grupos, el número de islotes de Langerhans fue mayor en las hembras-T y el área y perímetro de los islotes no presentó diferencias, pero las hembras EPT presentaron una mayor frecuencia relativa de islotes pequeños. El área inmunorreactiva a insulina en los islotes fue significativamente menor en las hembras-T, y no hubo cambios en la inmunoreactividad para glucagón o somatostatina entre los grupos. Adicionalmente la distribución de los islotes de Langerhans en las hembras-T se alteró, evidenciándose numerosas células  $\beta$  en la periferia de los islotes y, en aquellos de mayor área, se presentaron células sin inmunoreactividad a insulina, glucagón o somatostatina. A nivel molecular, la expresión del ARNm de insulina presentó una tendencia a ser menor en las hembras-T, la expresión de GLUT2 fue mayor y la de KCNJ11 menor en estas hembras. Además, la expresión de NKX6.1 tuvo una tendencia a ser mayor y la de PDX1 menor en este grupo. La expresión de AKT y GLUT4 fue menor en las hembras EPT. La cuantificación del contenido proteico de insulina y PDX1 no presentó diferencias entre los grupos, pero se evidenció que PDX1 se localiza mayormente en el núcleo en las hembras-T. Estos hallazgos indican que la administración de testosterona en ovejas gestantes, altera el medio en el que se desarrolla el feto, debido a que la hiperandrogenemia inducida en la madre es capaz de alcanzar a este, provocando una desviación en el desarrollo del feto que incrementa su predisposición a padecer resistencia a la insulina durante su vida adulta. Así, tras la exposición a un segundo evento durante la vida postnatal, hiperandrogenemia crónica, se activarían los efectos establecidos previamente durante la vida prenatal. A pesar de esto, el páncreas alberga varios mecanismos morfológicos y moleculares que pueden compensar inicialmente estas alteraciones, pero finalmente se agotan provocando una disfuncionalidad de las células  $\beta$ , lo que desencadena una alteración en la homeostasis de la glucosa y diabetes mellitus tipo 2.

Palabras claves: reprogramación fetal, testosterona, resistencia a la insulina, disfunción células  $\beta$ , test de tolerancia a la glucosa endovenosa.

## **ABSTRACT**

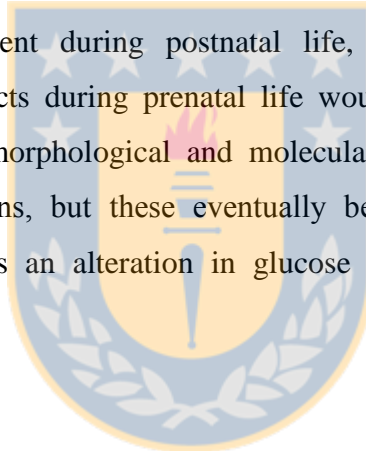
### **EVALUATION OF THE IMPACT OF PRENATAL EXPOSURE TO A TESTOSTERONE EXCESS ON THE STRUCTURE AND FUNCTIONALITY OF THE ENDOCRINE PANCREAS IN SHEEP**

The fetus is an individual with a determined genetic potential during fertilization. However, the phenotype that this will acquire depends on the way in which this genetic heritage is expressed, depending on how the environment modulates this process. Therefore, the morphological and physiological characteristics that it will have can be modified according to the conditions and demands of the environment, depending on the genome it houses, a process known as plasticity to ensure survival. Several substances are capable of modifying the environment in which an individual lives, even during embryonic and fetal life, causing a deviation called developmental reprogramming. Among these substances, fetal exposure to an excess of testosterone is a factor that would cause a reprogramming of the development of this individual increasing the risk of type 2 diabetes mellitus during adulthood. The objective of the study was to evaluate the effect of the administration of testosterone, in pregnant sheep, on the physiology of the mother, the morphological and endocrine-metabolic parameters of female fetuses, the tissular insulin sensitivity at different stages of somatic development (26, 30 and 38 weeks of age) and the effect of testosterone administration, in intact and oophorectomized adult females, on insulin sensitivity and the structure and functionality of endocrine pancreas. For this, a herd of 2-3 year-old adult sheep were mated with males of proved fertility. On the 28th day after the mating, gestation was confirmed by ultrasonography and the pregnant females were separated into two groups, considering the variables weight and age as selection criteria. A group of these females underwent an androgenization protocol that consisted of intramuscular administration of an oil testosterone propionate solution, twice a week, of 30 mg/sheep

from gestational day 30 to 90 and 40 mg/sheep from day 91 to 120 of gestation (T-Mothers). Another group of pregnant females (C-Mothers) only received the vehicle in which testosterone was diluted throughout the experimental period. From 4th to 17th week of gestation, pregnant females were weighed, and jugular blood samples were collected from which different endocrine-metabolic variables were determined. At 120 days of gestation in a group of pregnant females a caesarean section was performed in which the female fetuses were removed, weighed and zoometric measurements were registered; a jugular blood sample was collected for endocrine and metabolic analysis. Another group of pregnant females had full term gestation and female offspring were employed in the following experiments. Female offspring, at 26 weeks old (considered prepuberty period), an intravenous glucose tolerance test (IVGTT) was performed during the follicular phase of the estrous cycle. After this study half of the females of each group were oophorectomized. At 30 weeks of age (period considered as early postpuberty), a second IVGTT was performed in the intact and oophorectomized females, control and exposed prenatally to a testosterone excess (EPT) to assess the effect of endogenous steroids of ovarian origin on insulin sensitivity. From 30 to 38 weeks of age, females were injected with testosterone at a dose of 40 mg/sheep twice a week and, once this protocol was completed, a third IVGTT was performed to evaluate the effect of chronic hyperandrogenemia on insulin sensitivity. Additionally, at this stage (38 weeks old, period considered as late postpuberty) one group of oophorectomized females only received one dose of testosterone (40 mg/sheep) and an IVGTT was performed, before and 48 hours after testosterone administration, to evaluate the acute effect of this androgen administration on insulin sensitivity. Two days after the last IVGTT females were euthanized and pancreatic tissue samples were obtained for histological and molecular studies (qPCR and Western-blot) to evaluate the glucose-gated insulin secretion and production, and maintenance of the functional phenotype of endocrine pancreatic cells. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM. A normality test was performed and the comparison between groups was made by parametric or non-parametric tests according to the determined distribution of the results (means comparison, zoometric register, correlations and differences in the dynamics of plasma endocrine and metabolic variables, among others). Analyzes were performed with the GraphPad Prism 8 program considering a  $P < 0.05$  as a statistically significant difference between groups. Testosterone

administration, to pregnant mothers, caused a sustained increase in plasma testosterone concentration for the period in which this androgen was injected without affecting other endocrine and metabolic variables in them. At 120 gestation days total cholesterol plasma concentration and total and free testosterone were significantly higher in treated mothers and plasma progesterone concentration was lower in this group (T-mothers). In female fetuses of the treated group (T-fetuses) plasma testosterone and estradiol concentration were higher and insulin, IGF-II and adiponectin levels were lower regarding control fetuses. In addition, ano-genital opening and genital opening-navel distances were greater and less in this group, respectively, and right adrenal gland and left ovary weight were less in T-fetuses. At 24 weeks of age, there were no differences between female groups in endocrine and metabolic variables, nor in the insulin sensitivity indexes estimated from results of the IVGTT. In intact T-females, at 30 weeks of age, during the IVGTT they secreted more insulin than C-females, without significantly differences in this parameter, in the insulin/glucose ratio or ISI-Composite. However, ISI-Grulet was lower and the rate of disappearance of glucose (RDG) was higher in T-females. At 38 weeks of age, after chronic testosterone administration, mean plasma insulin concentration, during IVGTT, was higher in T-females causing an increase in stimulated area under the curve (S-AUC), without changes in the other indexes of insulin sensitivity. In 30th week old oophorectomized females, mean plasma glucose concentration and its dynamics, during IVGTT, was lower in Tovx-females. There are no differences in insulin secreted or insulin sensitivity indexes calculated. After acute testosterone administration, mean insulin secretion was significantly higher in control females before and 48 hours after testosterone administration and ISI-Composite was lower in this group of females after testosterone administration. In contrast, after chronic testosterone administration there was not changes in the dynamics of plasma insulin and glucose levels during IVGTT, but RGD was higher in Tovx-females. Regarding the pancreatic morphological and molecular analyzes, pancreas absolute and relative weight was similar between groups, the number of Langerhans islets was higher in T-females and the area and perimeter of the islets did not show differences, but T-females presented a higher proportion in the relative frequency of small islets. The insulin immunoreactive area in the Langerhans islets was significantly lower in T-females, without changes in the glucagon or somatostatin immunoreactivity. Additionally, Langerhans islets distribution in

T-females was altered evidencing numerous  $\beta$  cells in the periphery of the islets and, in those of greater area, there are cells without insulin, glucagon or somatostatin immunoreactivity. At molecular level, the expression of insulin mRNA showed a tendency to be lower in T-females, GLUT2 expression was higher and KCNJ11 was lower in these females. In addition, the expression of NKX6.1 had a tendency to be greater and PDX1 lower in T-females and the expression of AKT and GLUT4 was lower in this group of females. The quantification of protein content of insulin and PDX1 did not show differences between groups, but it was evident that PDX1 is mostly located in the cell nucleus in T-females. These findings indicate that testosterone administration to pregnant sheep, alters the environment in which fetus develops, because induced hyperandrogenemia to the mother is able to reach the fetus, causing a deviation in the development of the fetus that increases its predisposition to suffer insulin resistance during its adult life. Then, after exposure to a second event during postnatal life, chronic hyperandrogenemia, the previously established effects during prenatal life would be activated. Despite this, the pancreas harbors several morphological and molecular mechanisms that initially could compensate these alterations, but these eventually become depleted causing a  $\beta$  cell dysfunction, which triggers an alteration in glucose homeostasis and type 2 diabetes mellitus.



Keywords: fetal reprogramming, testosterone, insulin resistance,  $\beta$  cell dysfunction, intravenous glucose tolerance test.





## INTRODUCCIÓN

En las décadas recientes se ha observado un incremento rápido en la prevalencia de desórdenes metabólicos a nivel mundial (Alfaradhi y Ozanne, 2011). Dados los riesgos para la salud asociados con estos desórdenes y las estimaciones de la progresión de estos, la investigación y el conocimiento acerca de la génesis de estas alteraciones, representa un enorme desafío en salud pública (Frayling, 2007; Musingarimi, 2009; Flegal *et al.*, 2010).

Entre estas alteraciones, la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2, son las enfermedades metabólico-endocrinas cada vez más frecuentes que actualmente han cobrado mayor importancia epidemiológica (Azziz *et al.*, 2004), convirtiéndose en pandemias (Ashroft y Rorsman, 2012). Estas aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular, obstrucción del flujo sanguíneo y complicaciones microvasculares, entre las que se encuentran ceguera, falla renal y neuropatías periféricas (Gispén y Biessels, 2000; Jiang *et al.*, 2014). Si bien se ha evidenciado una base genética en la génesis de estas alteraciones, el aumento en la prevalencia de estas sugiere que otros factores estarían implicados en el desarrollo de estas patologías (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2006; 2009). Por esto, en la actualidad existe evidencia clara de que aquellos individuos que presentan una serie de enfermedades crónicas durante su vida adulta han estado expuestos a condiciones diferentes durante su desarrollo temprano (Barker *et al.*, 2012). Estos hallazgos han dado lugar a un nuevo modelo fisiopatológico del desarrollo de estas alteraciones clínicas, en el cual estas enfermedades son provocadas por variaciones en el ambiente materno-fetal (Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2012).

Ante esto, se ha establecido que el fenotipo de un individuo, o la probabilidad de padecer una enfermedad, puede modificarse por las condiciones ambientales a las que es expuesto durante su desarrollo *in utero* y la vida postnatal temprana (Barker *et al.*, 2002). Esto ha dado origen a la noción de la “programación del desarrollo” o del “origen fetal de las enfermedades adultas”, la que propone que las condiciones que se presentan en periodos o ventanas críticas del desarrollo de un individuo, pueden provocar la reprogramación de sus sistemas fisiológicos lo que genera alteraciones permanentes en sus sistemas homeostáticos (Alfaradhi y Ozanne, 2011; Lillycrop y Burdge, 2011). Así, varias de las disfunciones metabólicas que se manifiestan en la vida adulta, pueden resultar de una

programación anormal de los sistemas que se están desarrollando durante la vida intrauterina (Dumesic *et al.*, 2007; Lillycrop y Burdge, 2011). Por razones éticas esto no es posible estudiarlo en fetos humanos, de tal forma que se han desarrollado varios modelos animales para determinar el impacto sobre la fisiología de un individuo, que provoca la ocurrencia o exposición a fenómenos adversos durante el desarrollo embrio-fetal, sobre la probabilidad de desarrollar patologías reproductivas y/o metabólicas durante la vida adulta (Abbott *et al.*, 2006).

Al respecto, las alteraciones bioquímicas y metabólicas que pueden evidenciarse en modelos animales, se asemejan a aquellas que se presentan en mujeres que padecen resistencia a la insulina. De esta forma, en el modelo ovino, las ovejas que se exponen a concentraciones suprafisiológicas de andrógenos, durante su desarrollo fetal temprano y/o tardío, desarrollan cambios permanentes en los tejidos blanco endocrinos y reproductivos (Abbott *et al.*, 2008; Abbott *et al.*, 2010). Estos modelos animales de reprogramación fetal, generados por la exposición a un exceso de andrógenos durante el desarrollo fetal, relacionan el origen de estos desórdenes endocrinos fuerte y estrechamente con alteraciones durante el desarrollo *in utero* (Abbott *et al.*, 2007). El empleo de modelos animales ha permitido determinar las alteraciones que se producen en la ontogenia del desarrollo de algunos órganos claves para el metabolismo de un individuo, entre ellos el tejido pancreático (Harding y Bloomfield, 2004; Nada *et al.*, 2010; Hogg *et al.*, 2011; Hogg *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015), ya que algunos de los fenotipos generados, por “malprogramación del desarrollo”, convergen hacia la manifestación de resistencia a la insulina, lo que finalmente conduce a diabetes mellitus tipo 2 (Couzin-Frankel, 2013; Royal-Thomas *et al.*, 2015).

## **1. Páncreas**

### **1.1 Estructura y función**

El páncreas maduro es una glándula abdominal, conectada al duodeno, que juega un rol importante en la mantención de la homeostasis energética a través de la secreción de enzimas y hormonas (Ben-Othman *et al.*, 2013). El parénquima de este órgano está

formado por tres subtipos celulares: las células acinares, las células ductales y las células endocrinas. Las células acinares producen y secretan enzimas digestivas como lipasas, proteasas y nucleasas (Green *et al.*, 2010). Las células acinares y ductales componen el compartimiento exocrino del páncreas y representan aproximadamente el 98% del total de la masa pancreática (Ben-Othman *et al.*, 2013). Las células endocrinas, que representan menos del 2% del tejido pancreático, están involucradas en la regulación del metabolismo de los nutrientes y la homeostasis de la glucosa (Kemp *et al.*, 2003; Ben-Othman *et al.*, 2013).

Específicamente, el páncreas endocrino está organizado en pequeñas agrupaciones celulares denominadas islotes de Langerhans, aproximadamente 1 millón de ellos en un páncreas humano (Kemp *et al.*, 2003; Lupi y Del Prato, 2008), los cuales están dispersos a través del tejido pancreático (Green *et al.*, 2010). Cada islote está compuesto por células  $\beta$  (60-80%), células  $\alpha$  (20-30%), células  $\delta$  (5-15%), células  $\epsilon$  y células PP que producen insulina, glucagón, somatostatina, grelina y polipéptido pancreático (PP), respectivamente (Collombat *et al.*, 2006). La insulina y el glucagón actúan coordinadamente manteniendo la homeostasis de la glucosa al regular el metabolismo, depósito y la neogénesis de este azúcar (Ben-Othman *et al.*, 2013). La insulina es liberada en respuesta a un aumento en la concentración plasmática de glucosa y actúa reduciendo la concentración de esta, al promover el depósito y/o el metabolismo de la glucosa en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. Por el contrario, el glucagón provoca el efecto contrario por medio del aumento de la liberación de glucosa y/o la neogénesis de esta en caso de hipoglicemia. La somatostatina y el PP están involucrados en la regulación de la secreción de estas y otras hormonas, junto con la secreción enzimática exocrina (Adrian *et al.*, 1978; Roncoroni *et al.*, 1983; Csaba y Dournaud, 2001).

## **1.2 Desarrollo del páncreas endocrino**

La organogénesis pancreática es un proceso altamente coordinado con aspectos estructurales y citológicos claves; estos eventos morfológicos tempranos están filogenéticamente muy conservados entre los mamíferos (Pictet *et al.*, 1972a). La generación de las células endocrinas y los acinos exocrinos requiere una serie de procesos secuenciales que dictarán el fenotipo celular, entre los que se incluyen: la formación del

endodermo pancreático, la diferenciación de los progenitores endocrinos y la maduración de los distintos tipos celulares productores de hormonas de los islotes (Brolén *et al.*, 2005).

El proceso de desarrollo pancreático comienza cuando el endodermo es especificado hacia un “estado pancreático” y, tras la primera transición, estas células protodiferenciadas se expanden formando un esbozo pancreático (Pictet *et al.*, 1972b). Para esto, un conjunto de eventos de señalización intercelulares permisivos y directivos, junto con un programa de expresión de genes selectivos, define el destino de desarrollo en el interior del epitelio pancreático embrionario. Este programa emplea la activación y represión de ciertos factores de transcripción, el que parece manifestarse en dos etapas: uno que define la proyección inicial de los brotes pancreáticos y, una segunda fase, que regirá el cometido hacia líneas endocrinas o exocrinas (Kemp *et al.*, 2003).

Varios miembros de las vías de señalización común, como el ácido retinoico, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la proteína morfogénica ósea (BMP) y Sonic Hedgehog están involucrados en los mecanismos que gobiernan la génesis pancreática temprana (Pan *et al.*, 2007; Lau y Hebrok, 2010). Los eventos subsiguientes, que provocan la determinación tisular pancreática y la formación de las células diferenciadas, requieren la funcionalidad de otros factores de transcripción adicionales (Ben-Othman *et al.*, 2013, Figura 1). Una vez que el destino pancreático ha sido definido, este es reforzado por la interacción de una red compleja de factores de transcripción y crecimiento (Kawaguchi *et al.*, 2002), entre ellos Pdx-1 (Homeobox pancreático y duodenal 1) es uno de los primeros factores de transcripción, que si bien no participa en la especificación del endodermo, es necesario para el desarrollo pancreático tras la formación de los brotes pancreáticos (Jonsson *et al.*, 1994; Schwitzgebel *et al.*, 2003). Ya trazados los esbozos pancreáticos, el paso inicial hacia el destino endocrino de las células parece depender de la síntesis del factor de transcripción Ngn3 (Neurogenina 3) cuya expresión es dirigida por Pdx1 (Figura 1), induciendo la diferenciación de las células progenitoras de los brotes pancreáticos hacia células endocrinas (Schwitzgebel *et al.*, 2000).

La activación de Ngn3 permite la expresión de otros factores de transcripción adicionales como son Arx, Pax4, NeuroD1, Nkx2.2 y Nkx6.1, los cuales permiten a las células

precursoras endocrinas, diferenciarse en células que finalmente expresan sólo una hormona (Gouzi *et al.*, 2011). Los factores Arx y Pax4 son de gran importancia para la especificación hacia uno de los destinos celulares  $\alpha$ /PP y  $\beta$ / $\delta$ , respectivamente; la aparición de un linaje particular de estos tipos celulares parece depender de la expresión de solo uno de estos factores de transcripción, los cuales se reprimen mutuamente (Collombat *et al.*, 2005).

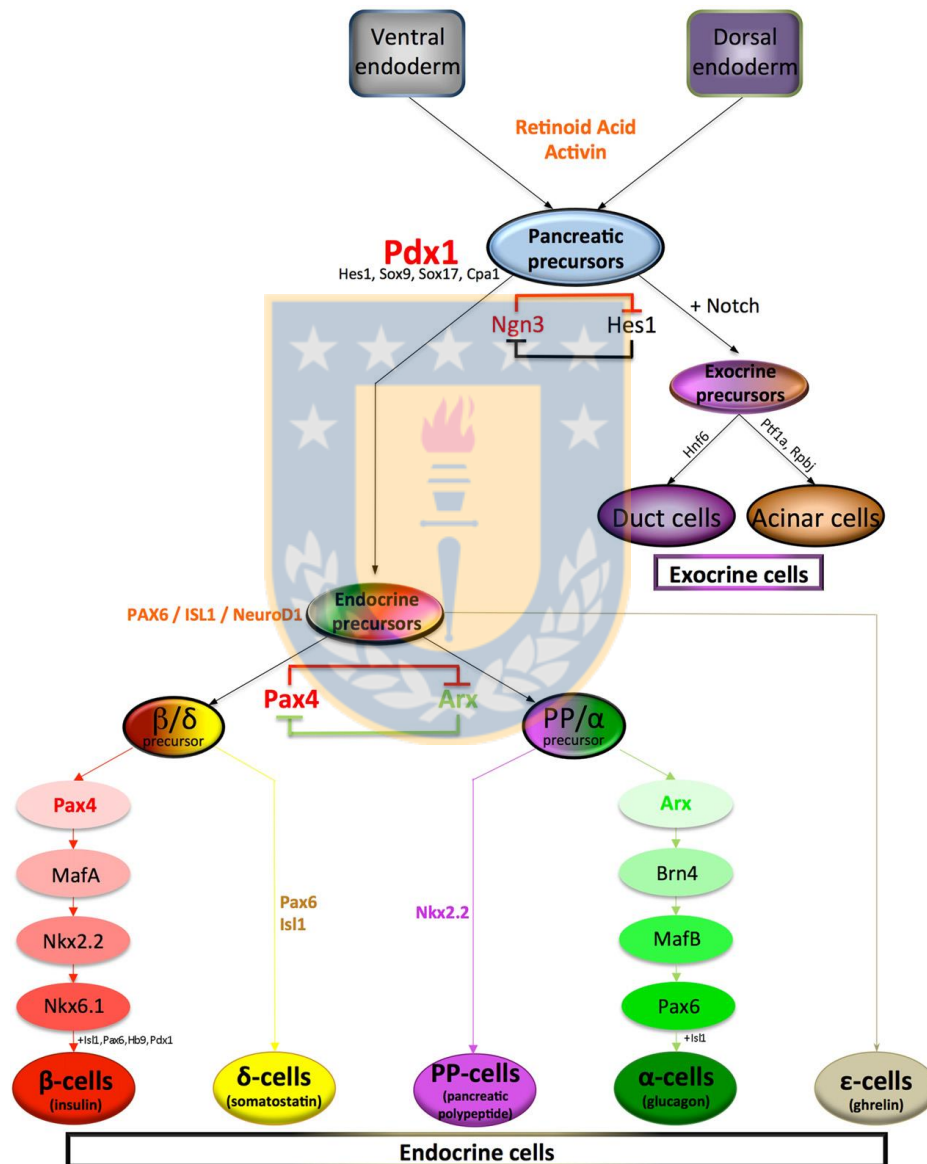


Figura 1: Esquema secuencial de la diferenciación progresiva de las distintas células que forman parte del páncreas endocrino relacionados con la expresión/represión de factores de transcripción (Ben-Othman *et al.*, 2013).

Tras la especificación inicial hacia un determinado linaje endocrino, otros factores adicionales son necesarios para controlar los aspectos posteriores de la diferenciación celular y/o producción hormonal, los cuales son detectables en células más maduras, entre ellos Pax6, MafA, MafB y NeuroD1 (Ben-Othman *et al.*, 2013). Pax6 es expresado en todos los tipos celulares endocrinos y es requerido para el desarrollo de todos los subtipos de células endocrinas, así como también para la estructuración de los islotes (Ahlgren *et al.*, 1997; Sander *et al.*, 1997). Además, MafA y MafB son críticos para la maduración de las células  $\beta$ . MafB se requiere para la maduración/diferenciación de las células  $\alpha$  y  $\beta$ , pero su expresión se restringe posteriormente solo a las células  $\alpha$ ; mientras que MafA permanece siendo específico de las células  $\beta$  (Nishimura *et al.*, 2006; Kroon *et al.*, 2008; Artner *et al.*, 2010). Adicionalmente a esto, NeuroD1 es necesario para la maduración de las células  $\beta$  y la adquisición de la capacidad que tienen estas de secretar insulina en respuesta a la concentración de glucosa plasmática (Gu *et al.*, 2010).

## **2. Insulina**

### **2.1 Estructura y función**

La función principal de las células  $\beta$  pancreáticas es la producción, almacenamiento y secreción de insulina (Alarcón *et al.*, 2002). La insulina es producida por estas células en el interior de los islotes de Langerhans desde un precursor inmaduro e inactivo denominado proinsulina, el cual por proteólisis genera la insulina madura (Chan *et al.*, 1976; Huang y Arvan 1994; Steiner, 1998). La insulina madura es una proteína globular que contiene dos cadenas, una cadena A y una cadena B formadas por 21 y 30 aminoácidos, respectivamente (Weiss, 2009), las cuales se encuentran unidas por dos puentes disulfuro. La biosíntesis de la proinsulina es estimulada por algunos secretagogos de insulina. Entre los estimulantes de la síntesis de proinsulina se encuentran algunos nutrientes, neurotransmisores, hormonas y activadores de protein-quinasas, de los cuales la glucosa es fisiológicamente el más importante.

La insulina es una hormona anabólica altamente potente que es crítica para el desarrollo y la homeostasis de la glucosa (Taniguchi *et al.*, 2006), ya que tiene la función exclusiva de

disminuir la concentración plasmática de glucosa (Komatsu *et al.*, 2014). Una vez que es liberada desde las células  $\beta$  pancreáticas, la insulina genera efectos metabólicos al regular la liberación de glucosa desde el hígado y la captación de glucosa principalmente por el músculo esquelético y el tejido adiposo (Hubbard, 2013), promoviendo la síntesis y el depósito de carbohidratos, lípidos y proteínas en estos tejidos y, adicionalmente a esto, tiene funciones mitóticas ya que interviene en la regulación del crecimiento celular y la diferenciación de células y tejidos (Rosenfeld, 2002; Gallagher y LeRoith, 2011).

Todas estas acciones de la insulina, son mediadas por el receptor de insulina (InsR), que corresponde a una glicoproteína que reside en la membrana plasmática y es miembro de la familia de receptores con actividad intrínseca tirosina kinasa (RTK) (Hubbard, 2013). Este receptor está estructurado por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ , formando un heterotetrámero (Hubbard, 2013). Las dos subunidades  $\alpha$  son extracelulares y es allí donde se encuentra el sitio de unión para la insulina (Chiu y Cline, 2010). Por su parte, las dos subunidades  $\beta$  comienzan en el lado extracelular de la membrana y luego atraviesan totalmente esta, hacia la región citoplasmática, en donde se encuentra el dominio tirosina kinasa. Una vez que la insulina se une a su receptor, se gatilla la activación de este, lo que provoca la autofosforilación del InsR, permitiendo el reclutamiento de varias proteínas que se encuentran cascada abajo de la vía de transducción de señales de esta hormona en los tejidos, incluyendo los sustratos del receptor de insulina (IRS, Hubbard, 2013). Tras la autofosforilación del receptor de insulina dos vías mayores de señalización intracelular, la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K)/Akt y la Ras/MAPK (proteína kinasa activada por mitógenos) llevan a cabo los mecanismos intracelulares que desencadenarán la respuesta. Esta cascada de eventos regula una serie de procesos celulares diversos como son la expresión génica, la síntesis de proteínas y el tráfico vesicular, lo que permite la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) a la membrana plasmática lo que aumenta la velocidad de transporte de este carbohidrato al interior de la célula en los tejidos sensibles a la insulina (Saltiel y Kahn, 2001; Schulingkamp *et al.*, 2000).

## **2.2 Secreción de insulina**

La secreción de insulina es un proceso altamente controlado y muchos factores pueden inhibir o promover activamente la liberación de insulina (Fu *et al.*, 2013). Las células  $\beta$

pancreáticas reconocen la concentración extracelular de glucosa y secretan tanta insulina como la que sea requerida para disminuir la concentración de glucosa a concentraciones plasmáticas fisiológicas (Figura 2). La secreción de insulina, estimulada por glucosa, es modulada por otros factores como los nutrientes (aminoácidos y ácidos grasos), vitaminas, iones, hormonas y señales neurales las cuales intervienen en la cantidad de insulina liberada. Así, la red inter e intracelular, que regula la secreción de insulina en las células  $\beta$ , es compleja y multifacética (Komatsu *et al.*, 2014), ya que múltiples señales originadas en diferentes órganos garantizan la función apropiada de las células  $\beta$  bajo condiciones basales o estimuladas por glucosa (Leibiger *et al.*, 2002).

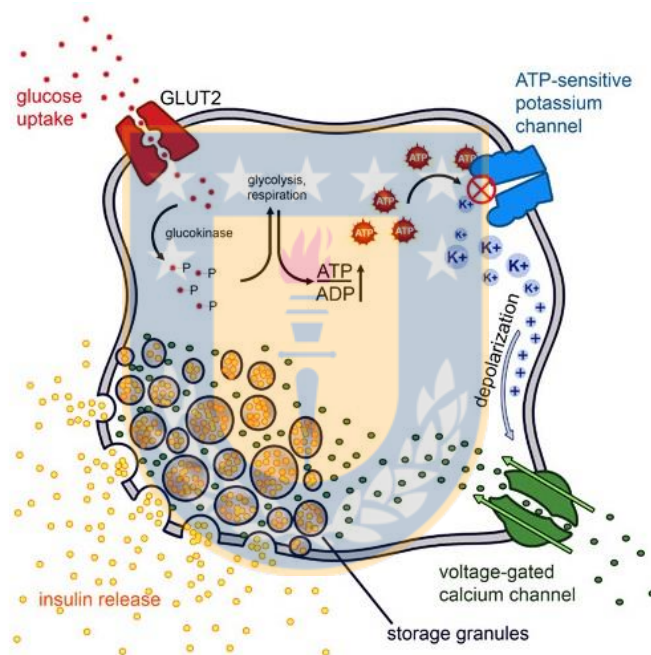


Figura 2: Secreción de insulina, por parte de las células  $\beta$  pancreáticas, estimulada por glucosa.

Varios factores pueden gatillar la secreción de insulina; no obstante, la glucosa al ingresar a la célula  $\beta$  a través del transportador GLUT2 es el más importante de estos (Chandra y Liddle, 2014). La glucosa, ya en el interior de la célula  $\beta$  pancreática, es fosforilada por la glucocinasa y es sujeta a glicólisis, por medio de la cual, se genera piruvato en el citoplasma (Figura 2). El piruvato es metabolizado por la piruvato deshidrogenasa y



carboxilasa en acetato en estas células, el que puede ingresar a la mitocondria. Esta reacción conduce a la generación de ATP en la cadena respiratoria, lo que se acompaña por el eflujo de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Komatsu *et al.*, 2014). Así, la glucosa al elevar el contenido intracelular de ATP en la célula  $\beta$ , provoca el cierre de un canal de potasio sensible al ATP ( $K_{ATP}$ ), lo que produce la despolarización de la membrana (Newsholme y Krause, 2012) generando la apertura de un canal de calcio voltaje-dependiente que provoca un influjo de calcio al interior de la célula, lo que finalmente permite la liberación de insulina (Ashcroft y Rorsman, 2012).

### **3. Resistencia a la insulina y diabetes**

#### **3.1 Resistencia a la insulina**

La sensibilidad a la insulina puede ser definida como la capacidad, de los tejidos que responden a la insulina (células del músculo esquelético, adipocitos y hepatocitos), de extraer la glucosa desde el plasma sanguíneo a una concentración determinada de insulina (Green *et al.*, 2010). La concentración plasmática de la insulina, a su vez, depende de la capacidad que tienen las células  $\beta$  de secretar esta hormona en relación a un estímulo que gatille su secreción.

La resistencia a la insulina se define como la incapacidad de la insulina de aumentar la captación de glucosa por los tejidos periféricos (músculo esquelético, hígado y adipocitos), con la supresión hepática de la síntesis de glucosa y la lipólisis; esto provoca un aumento en los requerimientos de insulina para una acción metabólica determinada (Kahn, 1985). De esta forma, la resistencia a la insulina está asociada con un aumento compensatorio en la secreción de insulina, siempre que se esté en presencia de una función normal de las células  $\beta$  (Goodarzi *et al.*, 2005). La resistencia a la insulina, se caracteriza además, por una reducida respuesta fisiológica de los tejidos a la acción de la insulina, particularmente a nivel del tejido muscular y adiposo, con una consecuente hiperinsulinemia compensatoria que inicialmente mantiene los niveles plasmáticos de glucosa dentro de los rangos normales (Garmendia *et al.*, 2009).

### **3.2 Diabetes mellitus**

La carencia de insulina o de sus acciones biológicas, resulta en diabetes (Radziuk, 2014). Esta patología ocurre cuando la producción de insulina, por las células  $\beta$  pancreáticas, es incapaz de satisfacer la demanda metabólica de los tejidos periféricos como el hígado, grasa y músculo (Oliver-Krasinski y Stoffers, 2008). La reducción en la funcionalidad de las células  $\beta$  y la masa de ellas, junto con la resistencia de los tejidos que responden a la insulina, provoca hiperglicemia (Green *et al.*, 2010). Durante la progresión de la diabetes mellitus, la alteración en la capacidad que tienen las células  $\beta$  de compensar o ajustar la concentración plasmática de glucosa se traduce en una alteración en la acción de la insulina, lo que genera eventualmente falla en las células  $\beta$  y una modesta, pero significativa, reducción en la masa de ellas (Butler *et al.*, 2003). De esta forma, la diabetes mellitus tipo 2 resulta de una combinación entre resistencia a la insulina y disfunción progresiva de las células  $\beta$  pancreáticas (Prentki y Nolan, 2006).

La diabetes mellitus tipo 2 está caracterizada por un metabolismo anormal de la glucosa y las grasas en los tejidos que responden a la insulina. Diferentes estudios han establecido que la diabetes tipo 2 es causada por una combinación de resistencia a la insulina en el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo y una alteración en la secreción de insulina por las células  $\beta$  (Butler *et al.*, 2003).

### **3.3 Alteración en la funcionalidad de las células $\beta$ pancreáticas**

La pérdida de la funcionalidad de las células  $\beta$ , según el modelo Belfast Diabetes, reconoce 2 fases: Una fase A, anterior a la manifestación de la diabetes, caracterizada por una declinación lenta y constante (2% por año) en la funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas y una fase B, que ocurre posteriormente tras el desarrollo de la hiperglicemia, con una aceleración significativa (18% por año) en el deterioro de la secreción de insulina (Lupi y Del Prato, 2008). Mientras que la fase A puede reflejar un defecto intrínseco de la célula  $\beta$ , la aceleración de la fase B es la consecuencia de gluco o lipotoxicidad, sugiriendo que una vez que la diabetes se hace manifiesta, un círculo vicioso puede desarrollarse (Levy *et al.*, 1998).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se caracteriza por déficits en la funcionalidad y la masa de las células  $\beta$  (Butler y Dhawan, 2015). Esta alteración debe ser mayor al 65% de la masa funcional de las células  $\beta$  del páncreas endocrino, al compararlo con individuos que no padecen diabetes, para evidenciar los primeros signos clínicos que caracterizan esta patología. Las causas, a las que se le ha atribuido esta deficiencia funcional, es un aumento en la apoptosis de las células  $\beta$  (Butler *et al.*, 2003), lo que puede deberse a estrés del retículo endoplasmático, mediado por plegamiento incorrecto de las proteínas, lo que se traduce en acumulación de oligómeros tóxicos del polipéptido amiloide de los islotes (Costes *et al.*, 2013), gluco- o lipo-toxicidad (Robertson *et al.*, 2007), desensibilización a la estimulación -mediada por glucosa- de la liberación de insulina y disrupción de la red de mitocondrias (Wikstrom, 2007). Alternativamente, la disminución en la masa de células  $\beta$  podría reflejar una expansión insuficiente (Meier, 2009) o una falla en la capacidad de regeneración adaptativa, en respuesta a la pérdida de células  $\beta$  (Butler y Dhawan, 2015). Estudios recientes han demostrado des-diferenciación de las células  $\beta$ , lo que podría también contribuir al déficit observado en modelos murinos de DM2, caracterizados por alteración en la señalización de la leptina y una alteración en el eje adipo-insular (Westermarck, 1972; Clark *et al.*, 1988; Fernandez-Real *et al.*, 2008; Guardado-Mendoza *et al.*, 2009; Talchai *et al.*, 2012).

Adicionalmente, otros eventos estarían involucrados en la génesis y progresión de la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas que se relacionan posteriormente con el padecimiento de DM2, entre ellos pueden mencionarse: pérdida de la identidad de las células  $\beta$  (Talchai *et al.*, 2012; Butler y Dhawan, 2015), alteración en la capacidad de sensor los nutrientes (Talchai *et al.*, 2012), depósitos de amiloide alrededor de las células  $\beta$  (Costes *et al.*, 2013), acumulación de sustancias tóxicas que pueden inducir inflamación (Westwell-Roper *et al.*, 2014), transdiferenciación endocrina (Arslanian *et al.*, 2001; Butler y Dhawan, 2015), producción y liberación excesiva de varias adipocinas y citoquinas inflamatorias (Rattanaatray *et al.*, 2010), depósitos ectópicos de lípidos en el tejido pancreático (van der Zijl *et al.*, 2011), entre otros.

## 4. Programación fetal, epigénesis y reprogramación fetal

### 4.1 Programación y reprogramación del desarrollo

El desarrollo embrionario depende del control espacial y temporal de la función de los genes (Shestopalov y Chen, 2011). Durante el desarrollo embrionario los patrones genéticos están representados en programas los que dirigen coordinada y precisamente la estructuración de los tejidos y órganos complejos. De esta forma, los genes que dirigen estos patrones somáticos son expresados de manera tejido-específica y en puntos temporales discretos y precisos del desarrollo embrionario (Reusens *et al.*, 2008). Las características morfológicas y funcionales en los mamíferos se desarrollan de acuerdo al genoma individual (Gilloteau *et al.*, 2009). Las células están sujetas a destinos celulares bien definidos y rígidos que permiten la derivación temprana exitosa de estas líneas celulares, cuyo resultado depende de la generación de patrones de expresión genética específicos, que gobiernan y permiten su destino celular, alcanzando su fenotipo funcional definitivo (Bruce, 2013).

A pesar de esta rigidez, el embrión mamífero es capaz de flexibilizar y adaptar su desarrollo en respuesta a perturbaciones (Bruce, 2013). Esta capacidad de generar adaptaciones, que colectivamente son denominadas “plasticidad”, ocurre para maximizar las posibilidades de sobrevivir bajo condiciones adversas para el desarrollo fetal y postnatal (Dumortier *et al.*, 2007). Sin embargo, la generación de estos cambios tiene un requisito fundamental, que el insulto por el cual se genera la divergencia desde los programas normales de desarrollo, ocurra durante los denominados “períodos críticos” en los cuales una célula, tejido, órgano o sistema de órganos aún albergan flexibilidad en su estructuración (Guilloteau *et al.*, 2009). Es durante los periodos críticos del desarrollo en que los cambios pueden generarse, pero si el insulto ocurre previo o después de estas ventanas temporales no pueden llevarse a cabo, ya que un periodo crítico tiene características fundamentales, entre ellas: un tiempo de inicio y término preciso; fuera de esta ventana de oportunidad el disruptor no provoca cambios y, durante el crecimiento rápido de las células de un tejido, aumenta la susceptibilidad a los efectos reprogramatorios de estos insultos (Barker, 1994; Recabarren *et al.*, 2005; Guilloteau *et al.*, 2009). Por lo tanto, la reprogramación está sustentada sobre las observaciones de que

cambios medioambientales pueden reajustar la trayectoria del desarrollo, al ocurrir durante un periodo crítico de la vida, en el que el tejido aún conserva algo de plasticidad y está en una fase de alta proliferación o rápida diferenciación (de Moura *et al.*, 2008), cuyos efectos podrían verse reflejados al nacimiento. Por todo esto, el fenómeno de reprogramación del desarrollo puede ser definido como la inducción, silenciamiento o restricción permanente del desarrollo de una estructura somática o sistema fisiológico, con efectos a largo plazo para su función (Guilloteau *et al.*, 2009). Entre los cambios que pueden generarse por los eventos reprogramatorios, se incluyen alteraciones en la distribución de los tipos celulares, en los patrones de secreción de hormonas, en la actividad metabólica y en la estructura de un órgano (Barker, 1997). De esta forma, el feto en desarrollo genera estrategias compensatorias, en respuesta a cambios que ocurren en el ambiente uterino, para sobrellevar los insultos que experimenta. Estas compensaciones pueden ser adaptativas, si aumentan la sobrevivencia, o disruptivas si comprometen la sobrevivencia postnatal (Padmanabhan, 2009).

Los mecanismos moleculares exactos que causan la reprogramación del desarrollo son desconocidos, pero las interacciones entre el ambiente intrauterino y la genética son los factores que incidirán en el fenotipo resultante. Alteraciones en el ambiente en el que se desarrolla un individuo, las cuales ocurren durante periodos críticos del desarrollo fetal generan cambios metabólicos y vasculares permanentes que impactan sobre el riesgo de padecer posteriormente ciertas enfermedades crónicas (Smith y Ryckman, 2015). A nivel estructural, la exposición intrauterina a disruptores endocrinos puede dañar las células o tejidos en desarrollo; a nivel químico, la exposición puede modificar la respuesta de las células a los estímulos. Así, cuando se combinan estos insultos del desarrollo, pueden resultar en un aumento en el riesgo de padecer síndrome metabólico y otras enfermedades crónicas incluidas obesidad y DM2 (Kajantie *et al.*, 2015; Koleganova *et al.*, 2009).

Todo esto ha dado lugar a un gran número de hipótesis que involucran al ambiente como un modulador de la expresión de los genes, pero estas condiciones ambientales son, la mayor parte de las veces, adversas para el desarrollo embrionario y fetal, provocando alteraciones disruptivas que aumentan el riesgo de padecer patologías metabólicas durante la vida adulta, entre ellas: la “hipótesis de Barker” (Barker, 1994), “set point o punto de

ajuste” de la respuesta metabólica y fisiológica (Lau y Rogers, 2004), la hipótesis de la “respuesta adaptativa predictiva” (Khan *et al.*, 2004), una extensión de la hipótesis de Hales y Barker (2001) del “fenotipo ahorrativo” (Hales y Barker, 1992) o la hipótesis del “origen fetal de las enfermedades adultas”, la hipótesis del “salvamento fetal” (Hoffman *et al.*, 1997), entre las que pueden mencionarse.

Estas modificaciones “programadas”, a las que se les denominan colectivamente “reprogramación del desarrollo”, pueden resultar en cambios estructurales permanentes de los órganos y los tejidos (Gardner *et al.*, 2007; Louey y Thornburg, 2005; Remacle *et al.*, 2007), siendo la manifestación de una respuesta alterada a los estímulos ambientales provocada por cambios epigenéticos en la expresión de los genes (Smith y Ryckman, 2015).

#### 4.2 Epigénesis

La epigenética se refiere a cambios en la estructura bioquímica del ADN que alteran la expresión genética. Estos cambios incluyen, pero no están limitados a, metilación del ADN, modificación de las histonas y procesamiento de los ARN no codificantes (Nistala *et al.*, 2011). El estado epigenético de un ADN individual es heredado y modificable, así que los patrones de expresión de este pueden traspasarse de un padre a su cría o pueden ser modificados en respuesta a gatillantes ambientales (Whitelaw y Whitelaw, 2006). Entonces, los cambios epigenéticos ofrecen evidencia bioquímica de los efectos deletéreos que pueden provocar las condiciones adversas durante el desarrollo manifestándose como enfermedades posteriormente (Smith y Ryckman, 2015).

El mecanismo epigenético de control de la expresión de genes, involucra la modificación del genoma, sin alteraciones en la secuencia de ADN. Estos son típicamente mediados por cambios en el patrón de metilación del ADN y/o variaciones en el empaquetamiento de la cromatina, por medio de modificaciones postraduccionales de las histonas. De esta forma, se altera la habilidad de la maquinaria transcripcional de interactuar con la cromatina (Waterland, 2014; Sohi *et al.*, 2011). Todos estos mecanismos pueden influenciar la expresión de genes por medio del silenciamiento transcripcional del alelo modificado (Rakyan *et al.*, 2001) y, por ello, pueden afectar el fenotipo, sin que en esto estén involucrados cambios en la secuencia de ADN *per se*. Entonces, estos eventos

moleculares pueden contribuir con mecanismos que fijan estable y permanentemente la exposición transitoria a ciertas condiciones adversas durante la vida temprana (prenatal o neonatal). Esto provoca cambios en los programas normales de expresión génica (Xu *et al.*, 2011; Luense *et al.*, 2011), los cuales persisten por mucho tiempo, una vez que la exposición ha finalizado (Nuyt y Szyf, 2007; Jaenisch y Bird, 2003; Waterland, 2006).

Las modificaciones postraduccionales de las histonas corresponden a metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones y ADP-ribosilaciones (Januwein y Allis, 2001), lo que revela un "código de histonas" que, por la naturaleza de las combinaciones de las modificaciones covalentes que pueden llevarse a cabo sobre las histonas, puede servir como un mecanismo adaptativo que puede influenciar la expresión génica en forma tejido y gen-específica en el tiempo durante el cual ocurre un insulto en el desarrollo (Sohi *et al.*, 2011; Marmorstein y Trievel, 2009). Así, un individuo que sufre tempranamente diferentes insultos puede diferir o ser similar a otro debido a estas modificaciones epigenéticas globales, tisulares o sitio dirigidas (Sohi *et al.*, 2011). Junto con esto los microARNs (miARN) también han sido implicados en la reprogramación durante el desarrollo, ya que análisis de la expresión diferencial de estas moléculas en el hígado, han evidenciado cambios en modelos de alteración nutricional en hembras gestantes (Zhang *et al.*, 2009). Los miARNs juegan roles importantes en las actividades celulares incluyendo la diferenciación, proliferación e integración metabólica, por ello alteraciones en su expresión repercuten directamente sobre los procesos que ellos regulan (Walker, 2008; Stefani y Slack, 2008). Así, la epigenética ha emergido como un mecanismo importante que permite el ajuste del patrón de la expresión de genes, en forma sitio y tejido-específica, como una respuesta adaptativa a los insultos que ocurren durante el periodo de desarrollo temprano (Sohi *et al.*, 2011).

La regulación epigenética de una red de genes y sus productos, sumada a los insultos endocrinos, nutricionales y metabólicos que pueden modificar esta, refleja un proceso evolutivo, particularmente cuando estos se relacionan con la heredabilidad de rasgos complejos (West-Eberhard, 2003; Lewontin, 2000). Nuevos rasgos son generados o construidos en la medida que los genes constituyentes y sus productos interactúan en un contexto temporal, espacial y condicional (tejido o ambiente externo) (Kuo, 1967). Así, la

plasticidad, es decir, la habilidad de un genotipo de producir diferentes fenotipos en respuesta a diferentes ambientes, es moldeada en base a las experiencias tempranas que ocurren o pueden ocurrir durante el desarrollo embrio-fetal o el ciclo de vida de un organismo, habilidad que facilita el cambio y que ha sido denominada adaptabilidad (Bateson, 2005). La generación de esta variabilidad de los rasgos o características moleculares, celulares, fisiológicas, morfológicas y conductuales de un organismo, representa un proceso vanguardista de la evolución (Crews y McLachlan, 2006). Sin embargo, no sólo debe considerarse la variabilidad como un éxito evolutivo ya que la flexibilidad de esta depende tanto de los productos de los genes y el medioambiente, seguido de la selección, la cual finalmente rige qué variantes pueden propagarse y perpetuarse (West-Eberhard, 1998). En este sentido, esto puede ser interpretado como que "el genoma aprende en base a su propia experiencia" (Jaenisch y Bird, 2003).

## **5. Reprogramación de la funcionalidad pancreática**

La homeostasis de la glucosa requiere dos componentes: una producción adecuada de insulina por parte de las células  $\beta$  pancreáticas y la capacidad que tienen los tejidos periféricos de responder a la insulina. Estudios recientes sugieren que la resistencia a la insulina podría resultar de una alteración persistente en las moléculas de la vía de transducción de señales de la insulina, en los tejidos sensibles a esta hormona. Además, generalmente la resistencia a la insulina precede a la falla de la célula  $\beta$ , ya que algunos estudios reportan un aumento en la concentración plasmática de insulina y en el contenido pancreático de esta hormona en animales diabéticos, lo que posteriormente es seguido de una declinación en la funcionalidad de las células  $\beta$  que se agrava en la medida que los individuos envejecen (Samuelsson *et al.*, 2008; Srinivasan *et al.*, 2008). De esta forma, la DM2 resulta de una combinación entre resistencia a la insulina y disfunción progresiva de las células  $\beta$  pancreáticas (Prentki y Nolan, 2006).

### **5.1 Programación de alteraciones pancreáticas**

En varios modelos animales de reprogramación durante el desarrollo, se ha observado la declinación en la homeostasis de la glucosa, la que progresivamente se agrava con la



madurez y el envejecimiento (Samuelsson *et al.*, 2008). Se ha observado la programación de alteraciones pancreáticas como fibrosis y depósito ectópico de lípidos en el interior de los islotes, entre las células endocrinas, lo que alteraría el microambiente que rodea a las células  $\beta$  y provoca disfuncionalidad progresivamente (Oben *et al.*, 2010). Además, en otros modelos animales de reprogramación del desarrollo, se ha manifestado una alteración en la funcionalidad de las células  $\beta$  debido a una reducción del peso del páncreas, número de islotes y área relativa de los islotes, lo que se relacionaría con una menor masa de células  $\beta$  y, por ello, una menor reserva funcional capaz de generar una compensación efectiva ante la generación de resistencia a la insulina (Abbott *et al.*, 2010).

Los datos sugieren una alteración en la sensibilidad de los islotes a la glucosa, lo cual podría originarse de la incapacidad sensora de la concentración plasmática de glucosa o en las diferentes vías metabólicas de la glucosa que ocurren en el interior de las células  $\beta$ , lo que depende del tipo de evento o insulto que genere la alteración y el sexo de la cría, siendo generalmente más graves estas modificaciones en hembras (Theys *et al.*, 2011). Asimismo, se ha evidenciado la generación de alteraciones en la angiogénesis y vascularización pancreática lo que estaría implicado posteriormente en la capacidad que tienen los nutrientes que se encuentran en solución en el plasma sanguíneo, de alcanzar las células  $\beta$  pancreáticas y ser sentidos efectivamente promoviendo la secreción de insulina en relación a las variaciones en la concentración sérica de estas sustancias (van Assche *et al.*, 1977; Guilloteau *et al.*, 2009).

## **5.2 Reprogramación en las células $\beta$ pancreáticas**

En modelos de reprogramación se ha evidenciado una alteración en la expresión de los genes que codifican proteínas que forman parte de la vía biosintética de la insulina, lo que indica que se produce la programación de una alteración en la producción, almacenamiento y secreción de los gránulos que contienen insulina (Ng *et al.*, 2010).

Considerando la secuencia de eventos que son necesarios para la secreción de insulina, los factores reprogramadores que inciden sobre cada uno de ellos repercuten inmediatamente en la capacidad que posee, la célula  $\beta$ , de sensor la concentración plasmática de glucosa (De Blasio *et al.*, 2007). El ingreso de glucosa a estas células es mediado por el GLUT2, fenómeno que finalmente permite determinar la concentración de glucosa plasmática, ya

que se ha observado en modelos de reprogramación fetal, que disminuiría la expresión de este transportador (Newgard y McGarry, 1995). Adicionalmente, otros estudios basados en modelos de reprogramación han manifestado que se produciría disfunción en la red mitocondrial (Alfaradhi y Ozanne, 2011) y, considerando la relación que existe entre la cantidad de ATP intracelular y la exocitosis de los gránulos que contienen insulina, una alteración en el metabolismo mitocondrial provocaría una incapacidad en la célula  $\beta$  de secretar insulina en relación a la concentración de glucosa plasmática (Wang *et al.*, 2010). Asimismo, se ha observado la disminución en la expresión de los canales de potasio dependientes de ATP en estas mismas células, lo que generaría modificaciones en la homeostasis de la glucosa, ya que es por medio de este canal que se genera la despolarización de la membrana en las células  $\beta$  y la subsecuente corriente interna de calcio que es clave para la secreción de insulina (Riedel *et al.*, 2013; Henquin, 2009; MacDonald y Rorsman, 2007; Rorsman y Renstrom, 2003); lo que finalmente también sería alterado por fenómenos reprogramatorios, debido a una menor expresión del canal de calcio voltaje-dependiente  $\alpha 1D$ , lo que impactaría negativamente la función de las células  $\beta$ , identificando una red de genes candidatos para la disfunción de las células  $\beta$ , en el acoplamiento estímulo-secreción, observada en los modelos de programación fetal (Gatford *et al.*, 2008).

Adicionalmente se ha observado un aumento en la tasa apoptótica en las células  $\beta$  pancreáticas (Lupi y Del Prato, 2008), lo que produce una disminución progresiva en el número de ellas (Zhang *et al.*, 2011). Este aumento en la tasa apoptótica puede deberse a un aumento en el estrés oxidativo sistémico (Liu *et al.*, 2010), disminución en la proliferación o neogénesis celular, un aumento en la susceptibilidad de las células  $\beta$  a los efectos de las citoquinas inflamatorias o una disminución en la batería antioxidante en estas células (Urakawa *et al.*, 2003; Furukawa *et al.*, 2004; Nishikawa *et al.*, 2007). Todo esto generaría un desequilibrio entre la proliferación y apoptosis en los islotes, provocando una disminución en la cantidad de células que producen insulina, una alteración en la secreción de insulina mediada por glucosa o una modificación en la sensibilidad de los tejidos a la insulina plasmática.

Otros modelos también manifiestan una disminución de la proliferación de las células de los islotes debido a un periodo G1 más largo y un aumento de la apoptosis (Petrik *et al.*, 1999; Boujendar *et al.*, 2002), cambios que están asociados a una menor expresión en los islotes del factor de crecimiento similar a insulina-2 (IGF-2), además de una menor vascularización asociada a una disminución en la expresión de VEGF y el receptor de VEGF tipo 2 en este tejido (Snoeck *et al.*, 1990; Boujendar *et al.*, 2003; Dumortier *et al.*, 2003). También se ha observado que el metabolismo de las células  $\beta$  disminuye, lo que reduciría la respuesta de estas células a los secretagogos de insulina (Sener *et al.*, 1996; Goosse *et al.*, 2009). Adicionalmente, los islotes producen mayor cantidad de óxido nítrico (Goose *et al.*, 2009) y presentan una sensibilidad aumentada al efecto del óxido nítrico e IL-1 $\beta$ , lo que induce apoptosis (Merezak *et al.*, 2001). Además, se produce un aumento en la expresión de proteínas que inducen arresto del crecimiento celular, lo que implicaría una baja tasa de replicación y renovación celular, en la pérdida progresiva de células  $\beta$  en los islotes (Goosse *et al.*, 2009). Asimismo, los islotes desarrollan un desbalance en la expresión de enzimas antioxidantes, lo que aumenta su susceptibilidad al estrés oxidativo sistémico y local (Liu *et al.*, 2010; Theys *et al.*, 2009).

Si bien todos los tejidos son susceptibles a ser reprogramados por insultos que ocurren durante el desarrollo fetal de estas estructuras somáticas, se sugiere que la consecuencia final de los distintos modelos de reprogramación fetal, es un aumento en el riesgo de padecer DM2 durante la vida adulta (Langley-Evans, 2015). Estos fenómenos disruptivos provocan modificaciones morfológicas y funcionales en el tejido pancreático endocrino, específicamente sobre las células  $\beta$ , lo que sumado a la resistencia a la insulina que se genera en los tejidos sensibles a esta hormona, principalmente el músculo esquelético, altera la capacidad de las células  $\beta$  de mantener la homeostasis de la glucosa y la disposición de ella en el organismo (Nada *et al.*, 2010). Adicionalmente, otros fenómenos y/o eventos agravarían las alteraciones producidas previamente, durante el desarrollo fetal, en la estructura y funcionalidad del páncreas endocrino, lo que aumenta el riesgo de padecer DM2 en la vida adulta (Tang *et al.*, 2008).

## **6. Reprogramación de la sensibilidad a la insulina debido a la exposición prenatal a un exceso de andrógenos en ovinos**

Los efectos de la exposición prenatal a un exceso de testosterona dependen de la dosis y el periodo durante el cual se administra este andrógeno (Abbott *et al.*, 2005b). El desarrollo de un individuo en un ambiente intrauterino hiperandrogénico tiene diversas consecuencias morfológicas, reproductivas, conductuales y metabólicas (Nugent *et al.*, 2012; Recabarren *et al.*, 2009).

Entre las consecuencias metabólicas se encuentran alteración en el metabolismo y depósito de lípidos (Puttabyatappa *et al.*, 2020), desbalance de sustancias antioxidantes y la producción de radicales superóxidos (Cardoso y Padmanabhan, 2019), menor peso al nacer y un periodo de crecimiento compensatorio asociado a una alteración en la ruta de desarrollo (Manikkam *et al.*, 2004; Steckler *et al.*, 2005; Crespi *et al.*, 2006), entre otros. La consecuencia de la disrupción y alteración del metabolismo es una resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 (Eisner *et al.*, 2002).

Estudios previos realizados en el laboratorio, en un modelo ovino de exposición prenatal a un exceso de testosterona que consiste en la administración de 60 mg de propionato de testosterona por vía intramuscular 2 veces por semana desde el día 30 al 90 de gestación (Recabarren *et al.*, 2005b), evidenciaron que en hembras ovinas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona la sensibilidad tisular a la insulina fue impactada por la hiperandrogenemia materna inducida. Un biomarcador importante que permite evidenciar que la administración de testosterona a la oveja gestante impacta sobre el desarrollo de la descendencia es la masculinización de los genitales externos en las hembras, caracterizado por un alargamiento de la uretra y la aparición de un saco escrotal vacío (Recabarren *et al.*, 2005). En borregas de 5 semanas de edad se evidenció una concentración plasmática basal de insulina y una relación insulina/glucosa basal mayor que en borregas de la misma edad control (Recabarren *et al.*, 2005). Asimismo, la secreción de insulina estimulada por glucosa fue significativamente mayor en estas borregas lo que se manifestó por una mayor área bajo la curva incremental de la insulina secretada durante un test de tolerancia a glucosa endovenosa con respecto a las borregas control, la consecuencia de esto fue una reducción significativa en el índice de sensibilidad a la insulina ISI-Composite en las

borregas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 5 semanas de edad. Sin embargo, a las 10, 20 y 30 semanas de edad, la sensibilidad a la insulina es comparable entre ambos grupos experimentales (Recabarren *et al.*, 2005).

Contrario a lo encontrado en hembras, en machos ovinos nacidos de madres tratadas con testosterona durante la gestación no hubo evidencia de una alteración en la sensibilidad a la insulina en diferentes etapas de desarrollo somático (5, 10, 20 y 30 semanas de edad), pero si estos machos se castraban previo a la pubertad se encontró una reducción en la sensibilidad a la insulina que se caracterizó por una mayor secreción de insulina ante la misma carga de glucosa y una alteración en la funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas (Cabello, 2006). Por ello, ante las discrepancias evidenciadas entre las hembras y los machos ovinos que se desarrollaron en un ambiente uterino hiperandrogénico es clave comprender los cambios endocrino-metabólicos inducidos por la administración de testosterona a la oveja gestante. De la misma forma, es fundamental determinar si los cambios inducidos en la madre se correlacionan con las alteraciones endocrinas y metabólicas que se generen en el feto por la exposición a una concentración suprafisiológica de testosterona. Adicionalmente, es importante establecer el rol de los esteroides endógenos, principalmente ováricos, sobre la sensibilidad a la insulina y un aumento sostenido en la concentración plasmática de testosterona después de la pubertad (Legro, 1995; Dunaif *et al.*, 2005). Finalmente, es elemental y relevante esclarecer el impacto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la estructura y funcionalidad del páncreas endocrino para relacionar éstos con la gravedad y la progresión de la disfuncionalidad de este órgano que agravaría la resistencia a la insulina conduciendo a una diabetes mellitus tipo 2.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las características morfológicas y funcionales en los organismos se desarrollan de acuerdo al genoma individual (Gilloteau *et al.*, 2009). Durante el desarrollo embrionario, los programas genéticos son coordinados en forma precisa para crear tejidos y órganos complejos (Shestopalov y Chen, 2011) el proceso de especificación y diferenciación, de una gran variedad de tipos celulares, es finamente orquestada en forma espacio-temporalmente por la regulación de complejos programas transcripcionales (Goff *et al.*, 2015). De esta forma, muchos de los genes deben ser expresados en una forma tejido-específica en puntos discretos y precisos del desarrollo embrionario (Fowlkes *et al.*, 2008). Sin embargo, existe creciente evidencia, derivada de estudios epidemiológicos en humanos y modelos animales, que manifiesta que la regulación del genoma es enormemente influenciada por el medio ambiente en el cual se desarrolla un individuo (Symonds *et al.*, 2007). El feto en desarrollo es enormemente vulnerable a cambios en la homeostasis materna, cambios, que a su vez, se deben a alteraciones en el ambiente externo (Padmanabhan, 2009).

Ante estos disturbios en la homeostasis y para evitar cualquier consecuencia nociva de estos, el feto en desarrollo genera mecanismos compensatorios que provocan variabilidad fenotípica. No obstante, estos cambios pueden ser adaptativos o disruptivos, basados en si estos proveen ventajas o desventajas para la sobrevivencia, respectivamente (Bruce, 2013). Las adaptaciones compensatorias desarrolladas ocurren para maximizar las posibilidades del feto de sobrevivir bajo condiciones adversas (Dumortier *et al.*, 2007). Estos cambios, a los que se les denomina colectivamente “reprogramación del desarrollo”, pueden resultar en cambios estructurales y funcionales permanentes de los órganos y los tejidos (Gardner *et al.*, 2007), siendo últimamente la manifestación de una respuesta alterada a los estímulos ambientales provocada por cambios epigenéticos en la expresión de los genes (Sohi *et al.*, 2011; Smith y Ryckman, 2015).

Sin embargo, la mayor parte de las veces, estas adaptaciones alteran o modifican permanentemente la estructura, fisiología y metabolismo de un organismo aumentando su predisposición a ciertas enfermedades durante la vida adulta (Barker, 1995). Se han

empleado varios modelos animales para determinar el efecto de diversos insultos, provocados en períodos críticos del desarrollo de un individuo mientras éste aún conserva parte de su plasticidad, sobre la fisiología de sus sistemas homeostáticos (Abbott *et al.*, 2013) y en su predisposición a padecer ciertas patologías metabólicas (Recabarren *et al.*, 2005). No obstante, sin importar cuál sea el factor reprogramador que actúe sobre el feto, el efecto parece ser similar; esto es un incremento en el riesgo a padecer DM2, obesidad, resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares (Couzin-Frankel, 2013). Lo que sugiere que el feto ha implementado una única respuesta a los diferentes fenómenos estresantes, para asegurar su sobrevivencia (Langley-Evans, 2015).

Ante discrepancias entre el ambiente sentido por el individuo durante su desarrollo fetal y, finalmente, el ambiente en el que se desarrolla postnatalmente, las adaptaciones generadas *in utero* aumentan el riesgo de padecer ciertas enfermedades durante su vida adulta. Asimismo, ya que el feto sacrifica tejidos que requieren bloques de construcción de alta calidad, como el músculo esquelético, riñón y el páncreas y, en su lugar, establece otros tejidos menos exigentes, como el graso o fibroso, priorizando con esto el desarrollo de órganos más importantes, como el cerebro (Fall, 2009). Esto generaría alteraciones en la morfología y funcionalidad de estos órganos, considerados menos prioritarios, como el páncreas y la mayor parte de los órganos que responden a la insulina. Así, aumenta el riesgo de padecer DM2 debido a la alteración en la funcionalidad de las células  $\beta$ , la que se agravaría por la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, ambas programadas por eventos ocurridos durante la vida fetal temprana (Recabarren *et al.*, 2006; Sir-Petermann *et al.*, 2002), pero que posteriormente se agravan por las condiciones en las que se desarrolla el individuo postnatalmente. Esto da sustento de la hipótesis del proceso denominado "dos hits" (Tang *et al.*, 2008), un "primer hit" que involucra la reprogramación epigenética de los sistemas de órganos durante el desarrollo fetal; y un "segundo hit", durante la vida postnatal, que agrava la severidad de las alteraciones generadas por la reprogramación debido a estos eventos disruptivos (Padmanabhan, 2009).

Experimentos previos en un modelo ovino de exposición prenatal a un exceso de testosterona han demostrado que borregas nacidas de madres tratadas con este andrógeno

presentan resistencia a la insulina a las 5 semanas de edad (Recabarren *et al.*, 2005) y a las 40 semanas esta menor sensibilidad de sus tejidos a la insulina es evidente tanto en la fase folicular como en la luteal del ciclo estral (Quitral, 2010).

Adicionalmente, se han demostrado alteraciones en la morfología de los tejidos sensibles a la insulina y cambios profundos en la estructura del tejido adiposo visceral y subcutáneo en distintas etapas del desarrollo somático (periodo fetal y peripuberal) que se asemejan a los publicados en la descendencia de mujeres que padecen síndrome de ovario poliquístico (Sir-Petermann *et al.*, 2002). Sin embargo, no se ha estudiado el efecto de la administración de testosterona sobre la homeostasis metabólica y endocrina de la hembra gestante y las consecuencias de esto sobre la morfología, el metabolismo y la endocrinología fetal. Esto permitiría establecer las alteraciones tempranas que se producen por la exposición fetal a un exceso de testosterona (efectos organizacionales).

Además, en el mismo modelo, si bien se ha estudiado los cambios en la sensibilidad de los tejidos a la insulina en varias etapas del desarrollo somático (5, 10, 20 y 30 semanas de edad), no se ha estudiado la variación en la sensibilidad de los tejidos a la insulina en las distintas etapas del desarrollo puberal (etapa peripuberal, periodo postpuberal temprano y postpuberal tardío), ni el efecto de los esteroides endógenos y exógenos, administrados aguda o crónicamente, sobre la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina y la morfología y funcionalidad del páncreas endocrino. El fin de esto es establecer los efectos activacionales de distintos agentes disruptores naturales o inducidos experimentalmente que simulan diferentes situaciones que caracterizan la fisiopatología del síndrome de ovario poliquístico, para esclarecer los mecanismos sistémicos y pancreáticos involucrados en la resistencia a la insulina que presentan estos individuos.

## **2. HIPÓTESIS**

La exposición fetal a un exceso de testosterona altera la sensibilidad de los tejidos a la insulina en diferentes etapas de desarrollo somático y provoca alteraciones estructurales del páncreas endocrino y una disfuncionalidad en las células  $\beta$  pancreáticas en hembras ovinas.



## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona en hembras ovinas sobre la sensibilidad de los tejidos a la insulina y la morfología y funcionalidad del páncreas endocrino en diferentes etapas de desarrollo somático.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar los efectos de la administración de testosterona sobre algunas variables endocrinas y metabólicas durante la gestación en ovejas.
- Correlacionar los efectos de la administración de testosterona en ovejas gestantes con algunas variables metabólico-endocrinas y registros zoométricos en fetos hembra ovinos de 120 días de gestación.
- Evaluar el efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la sensibilidad a insulina en ovejas peripuberales de 26 semanas de edad.
- Cuantificar el efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en ovejas postpuberales tempranas de 30 semanas de edad.
- Evaluar el efecto de la administración crónica de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en ovejas adultas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona de 38 semanas de edad.
- Evaluar la sensibilidad a la insulina en hembras ovinas ooforectomizadas postpuberales expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 30 semanas de edad.
- Evaluar el efecto de la administración aguda de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en hembras ooforectomizadas adultas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 38 semanas de edad.
- Determinar el efecto de la administración crónica de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en hembras ooforectomizadas adultas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona de 38 semanas de edad.

- Evaluar el efecto de la administración crónica de testosterona sobre la estructura del páncreas endocrino y la expresión del ARNm de las proteínas involucradas en la secreción y producción de insulina estimulada por glucosa y la mantención del fenotipo celular endocrino maduro.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Los procedimientos experimentales y ensayos clínicos que se realizaron en este estudio se enmarcan en el proyecto FONDECYT 1140433, que fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción (Anexo N°1).

#### **1. Animales de experimentación**

##### **1.1 Grupos experimentales**

Un grupo de ovejas de raza Suffolk-Down, durante la estación reproductiva en el campus Chillán de la Universidad de Concepción (36° 36' de latitud sur, 71° 30' de longitud oeste, 144 metros sobre el nivel del mar), se sincronizaron para homogenizar la presentación de sus estros y tras ello fueron fertilizadas por monta natural, con machos de fertilidad probada en estaciones reproductivas anteriores. La sincronización de los celos se realizó por medio de la aplicación intravaginal de un implante de progesterona (Eazy Breed™, CIDR®) el que tras 7 días se retiró administrando una dosis única intramuscular de 52,5 µg/oveja de prostaglandina F2α (Genestren, DragPharma) en el músculo ancóneo. Los machos, con los cuales se cruzaron las hembras, rotaron durante los 2-3 días de cruce para aumentar las posibilidades de montas y preñeces. Las montas se registraron por medio de la observación directa de la cruce o la aparición de una mancha roja, en la zona sacral (grupa) de las hembras, ya que se aplicó una mezcla oleosa rojiza a los machos en la zona esternal la que, al montar los machos a las hembras, manchó la lana de esta zona en la hembra. El día de encaste en que se visualizó la evidencia de una monta efectiva se consideró el día cero (0) de gestación.

Las preñeces se determinaron 28 días tras la confirmación de una monta efectiva, por medio de ultrasonografía, utilizando el ecógrafo HS 2100V (Honda, Japón) y la cuantificación por radioinmunoensayo, en el contador gama Wizard 1470 Automatic Gamma Counter (PerkinElmer, Turku, Finlandia), de la concentración plasmática de progesterona durante la gestación en estas hembras. Este proceso se llevó a cabo durante los meses de marzo, abril y la primera semana de mayo. Una vez que se confirmó la preñez,

las hembras se destinaron a uno de dos grupos, los cuales se distribuyeron homogéneamente, considerando las variables peso y edad de la madre para realizar esta disposición: a) un grupo de madres control (madres-C) y b) madres que se sometieron a un protocolo de androgenización (madres-T) previamente establecido y validado (Recabarren *et al.*, 2005).

El tamaño de la muestra se determinó considerando el análisis de resultados de variable continua en estudios pareados. Según la siguiente ecuación, en donde s (desviación estándar), d (magnitud de la diferencia) y C (constante definida según valores de  $\alpha$  y  $\beta$ ) (Dell *et al.*, 2002).

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

$$n = 2 + 10,51 (4/3)^2$$

$$n = 20,59$$

El n muestral correspondió a 20 ovejas por grupo, las cuales fueron obtenidas a partir de los encastes antes mencionados.

## 1.2 Protocolo de androgenización

Se administró una dosis de propionato de testosterona de 30 mg/oveja (Steraloids Inc. Newport, USA) por vía intramuscular (IM) 2 veces por semana (lunes y jueves) desde el día 30 al 90 de gestación y, posteriormente, una dosis de 40 mg/oveja IM dos veces por semana desde el día 91 al 120 de gestación (n=20). La solución de testosterona se preparó cada día que se administró, se pesó la cantidad de propionato de testosterona (calculada en mg) a inyectar y se diluyó en aceite vegetal (maravilla), lo que generó soluciones de testosterona de 30 mg/ml y 40 mg/ml. El grupo de madres-T recibió estas soluciones de acuerdo al protocolo de androgenización según el tiempo de gestación determinado. En cambio, el grupo de madres-C sólo recibió el vehículo en el cual se realizó la dilución de la testosterona (n=20). Este protocolo de administración de testosterona es importante ya que el feto será expuesto a concentraciones de este andrógeno similares a las estimadas en mujeres gestantes que padecen el síndrome de ovario poliquístico (Sir-Petermann *et al.*, 2002), es decir, un ambiente esteroidal hiperandrogénico patológico para simular un

fenómeno reprogramatorio similar al determinado en madres que padecen el síndrome de ovario poliquístico.

La gestación en ovejas es de  $147 \pm 2$  días, durante ese periodo el peso corporal de las hembras gestantes, de ambos grupos experimentales, se registró semanalmente. Además, en cada ocasión se extrajo una muestra de sangre yugular desde la cual se determinó la concentración plasmática de testosterona, progesterona, cortisol e insulina, junto con la cuantificación de la concentración plasmática de glucosa, proteínas plasmáticas totales, triglicéridos y colesterol total de cada madre. Durante la gestación, las hembras se mantuvieron estabuladas durante la noche y durante el día tuvieron acceso libre a pradera. Se realizó vigilancia veterinaria continua durante todo el periodo experimental y cualquier alteración clínica evidente se registró en una hoja clínica elaborada para cada oveja y, de presentar cualquier alteración patológica, esa hembra fue excluida de los ensayos experimentales (Anexo N°2).

Durante el parto, las madres permanecieron estabuladas, se registró el día y hora del parto y la madre y el recién nacido permanecieron, por un periodo no menor a 8 horas, sin disturbios para permitir el reconocimiento materno, la incorporación de la cría y la ingesta de calostro. Tras esto, el cordón umbilical se desinfectó con una solución de povidona yodada y se registraron las medidas zoométricas: peso de la cría, longitud cabeza-cola, alzada, perímetro torácico, circunferencia abdominal y distancia ano-apertura genital. Este último registro permite, en crías hembras, determinar el grado de androgenización (Recabarren *et al.*, 2006). Se obtuvo una muestra de sangre desde la vena yugular de la cría la que se procesó y almacenó para su posterior análisis.

## **2. Procedimientos quirúrgicos**

### **2.1 Cesárea**

A los 120 días de gestación (término del protocolo de androgenización), se realizó una cesárea que fue previamente programada para extraer los fetos (Anexo N°3). El día de la cirugía las hembras gestantes se premedicaron, 30 minutos previo al procedimiento quirúrgico, con Acepromacina 0,02 mg/kg (Acedan, Holliday-Scott) y Atropina 0,02 mg/kg

(Atropina sulfato, Sanderson). Se administró una dosis de Ketamina 5 mg/kg (Ketamil, Troy laboratories) por vía endovenosa y se instiló tópicamente 2-3 ml de Mepivacaína 2% (Vetacaine, Troy Laboratories) en la faringe-laringe para facilitar la intubación, la que se realizó con un traqueotubo de 8 a 8,5 milímetros de diámetro interno según el peso del animal. La hembra se transportó al pabellón quirúrgico, fue posicionada en decúbito dorsal y se conectó al sistema de anestesia inhalatoria. La inducción anestésica se llevó a cabo con Isoflurano (Forane, Baxter) liberado en oxígeno al sistema de respiración al 3,5-4% y, para la mantención anestésica, se disminuyó el porcentaje del anestésico inhalatorio al 3%. Durante el período de anestesia el flujo de oxígeno fresco fue de 10 ml/kg/min.

El área quirúrgica se depiló, aseó y fue delimitada por paños de campo, se efectuó una incisión a través de la línea media abdominal 1-2 cm craneal a la glándula mamaria. A través de la incisión, se accedió a la cavidad abdominal, una vez que se ingresó a ella, la camilla se inclinó a 60 grados para que el rumen se desplazara cranealmente y así se mejoró la accesibilidad al útero. El útero se expuso a través de la incisión quirúrgica y se visualizó el cuerno uterino gestante, una vez reconocido, sobre la superficie del cuerno gestante se realizó una incisión paralela a la irrigación sanguínea, con el fin de evitar un sangramiento excesivo, a través de la incisión se retiró el feto desde el interior de las membranas fetales, una vez expuesto el feto se colectó un muestra de sangre desde la vena yugular del feto y la arteria y vena umbilical. Se ligó ambos vasos sanguíneos y el feto fue eutanasiado por medio de la administración de una sobredosis de tiopental sódico por vía intracardiaca. Una vez realizada la eutanasia del feto (visualizada por medio del cese del latido cardiaco), se cortaron las venas y arterias umbilicales y se extrajo el feto. En el feto se llevó a cabo la recolección de los datos y registros zoofométricos (peso, largo total, largo parcial, largo del fémur, altura a la cruz, ancho de la grupa, perímetro torácico, espacio interparietal, distancia ano-pseudoescroto, distancia pseudoescroto-apertura vulvar, distancia ano-apertura vulvar y distancia apertura genital-ombligo).

La incisión sobre la pared uterina fue suturada con material monofilamento quirúrgico absorbible (ácido poliglicólico), con un primer plano interno usando patrón de sutura continuo invaginante y penetrante (Smiden modificado) y un segundo plano con un patrón de sutura continuo invaginante no penetrante (Lembert). En la pared muscular abdominal se

utilizó un patrón discontinuo de afrontamiento (punto en cruz) y para el cierre del subcutáneo se utilizó un punto continuo (punto simple). Para el cierre de la piel se utilizó material no absorbible Nylon quirúrgico del 1 con un patrón discontinuo (colchonero horizontal). Una vez finalizada la cirugía se aseó la herida quirúrgica con agua oxigenada, povidona yodada 10% y finalmente se aplicó un larvicida (Larvicida Spray, Drag Pharma) en la zona de la herida.

Una vez concluido el procedimiento quirúrgico el vaporizador fue apagado y sólo se insufló oxígeno a un volumen de 4 l/min hasta que el reflejo deglutorio de la hembra se recuperó procediendo a retirar el tubo endotraqueal. La hembra se posicionó en recumbencia esternal y fue trasladada a una sala de recuperación contigua al pabellón quirúrgico. Una vez recuperada de la anestesia, se mantuvo bajo observación hasta que se reincorporó, se inyectó antibiótico a una dosis de 11000 UI/kg de penicilina G procaína y 12,5 mg/kg de dihidrostreptomicina (Pentril, Laboratorio Chile) por 7 días y antiinflamatorio a una dosis 3 mg/kg (Ketoprofeno 10%, Vetanco) por 5 días posteriores a la cirugía y se observó la correcta eliminación de las membranas fetales.

## **2.2 Ooforectomía**

A las 26 semanas de edad, periodo considerado como etapa peripuberal, se realizó una cirugía para extraer los ovarios evitando el efecto de los andrógenos endógenos sobre la sensibilidad a la insulina. Para la cirugía, las borregas se separaron del rebaño, y se ubicaron en corrales colectivos en donde se realizó un ayuno previo al procedimiento de 12 horas. El día de la cirugía se premedicaron, 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico, con acepromacina 0,02 mg/kg (Acedan, Holliday-Scott) y atropina 0,02 mg/kg (Atropina sulfato, Sanderson). Se administró una dosis de ketamina 5 mg/kg (Ketamil, Troy Laboratories) por vía endovenosa e instiló tópicamente en la faringe y laringe 2 a 3 ml de Mepivacaína 2% (Vetacaine, Troy Laboratories) para facilitar la intubación. La borrega se transportó al pabellón quirúrgico, fue posicionada en decúbito dorsal y conectada al sistema de anestesia inhalatoria. La inducción anestésica se llevó a cabo con Isoflurano (Forane, Baxter) liberado en oxígeno al sistema de respiración al 3,5% y para la mantención anestésica se disminuyó el porcentaje del anestésico inhalatorio al 3%. Durante el período de anestesia el flujo de oxígeno fresco fue de 10 ml/kg/min. El área quirúrgica se depiló y

aseó adecuadamente. Se procedió a la extracción de ambas gónadas, para ello, se realizó una incisión por la línea media ventral y se procedió a la ooforectomía. Una vez concluido el procedimiento quirúrgico el vaporizador se apagó y sólo se insufló oxígeno a un volumen de 4 l/min hasta que el reflejo deglutorio se recuperó, procediendo a retirar el tubo endotraqueal. La borrega se posicionó en recumbencia esternal y fue trasladada a una sala de recuperación contigua al pabellón quirúrgico. Una vez recuperada de la anestesia, se mantuvieron bajo observación hasta que se reincorporaron. Se administró antibiótico (Pentril, Laboratorio Chile) por 7 días y antiinflamatorio (Ketoprofeno 10%, Vetanco) por 5 días posteriores a la cirugía.

### **2.3 Cateterización**

El día previo al test de tolerancia a glucosa endovenosa (TTGEV) las ovejas fueron cateterizadas, por medio de la instauración de un catéter central de 20 cm (Arrow® U.S.A.) a través de la vena yugular; para ello se depiló y aseó con alcohol 70% y povidona yodada la zona en la cual se insertó el catéter, se administró una dosis subcutánea de 3 ml de anestesia local Mepivacaína (Vetacaine, Troy Laboratories) al 1%. Tras 3 a 5 minutos de espera, para que la zona se desensibilice, el catéter fue introducido y fijado por medio de suturas de nylon y, posteriormente, fueron asegurados cubriéndolos con algodón y gasa. Se administró, a través del catéter, una solución de heparina (Laboratorio Biosano, Chile) en suero fisiológico (500 UI/ml) para evitar que el catéter se obstruyera con sangre coagulada. En el extremo proximal del catéter se insertó una tapa para evitar hemorragias o pérdida de sangre. A través del catéter se administró un analgésico (Ketoprofeno 10%, Vetanco) con el fin de minimizar el dolor o las molestias en los animales de experimentación producto de la inserción del catéter. Se prepararon y alistaron los bretes en donde se realizó la sujeción de los animales. Los animales fueron dispuestos en bretes durante la tarde y fueron obtenidas, desde el catéter, muestras de sangre para adaptarlas al procedimiento de muestreo y así reducir el estrés. Las hembras se mantuvieron, desde las 20:00 horas del mismo día, en ayuno en corrales separados junto con otros animales que no participaron en el muestreo hasta el otro día, día en el cual se realizó el TTGEV.



### 3. Test de tolerancia a glucosa endovenosa (TTGEV)

El día del ensayo las ovejas fueron pesadas para determinar la dosis de insulina y de suero glucosado (50%) (Laboratorio Sandeson, Chile) a infundir y se destaparon nuevamente los catéteres infundiendo la solución de heparina señalada con anterioridad. Se realizó la rotulación de las jeringas, se preparó el baño termorregulado en el cual se mantuvo una solución de suero fisiológico con heparina (50 UI/ml), el suero glucosado y la solución de insulina, todos los materiales que se emplearon durante el desarrollo del muestreo. Desde las 09:00 hrs. comenzaron a obtenerse las muestras basales de los animales, las que se colectaron en los tiempos: T-15; T-10; T0 previo a la administración de glucosa. Tras la extracción de la muestra en el T0 se administró lentamente un bolo de glucosa al 50% en dosis de 300 mg por kilo de peso metabólico ( $[P.V.]^{0,75}$ ) durante los 2 primeros minutos del test y se extrajeron muestras en los siguientes tiempos T3; T5; T7; T10; T13; T15; T17; T20 tras el inicio de la administración de glucosa a través del catéter. Tras la extracción de la muestra en el T20 se infundió una solución de insulina (concentración final de 10 UI/ml en suero fisiológico, HUMULIN-R, Elli Lilly) en dosis de 0,1 UI/kg P.V. a través del catéter y se extrajeron muestras en los siguientes minutos: T23; T25; T27; T30; T33; T35; T37; T40; T50; T60; T70; T80; T90; T100; T110; T120; T130; T140; T150; T160; T170; T180.

De los 1,5 ml de sangre que se obtuvieron como muestra, 1 ml fue depositado en un tubo que contenía sólo heparina como anticoagulante (10 µl de una solución 1000 UI/ml) y los 0,5 ml restantes se depositaron en un segundo tubo que contenía una solución evaporada de fluoruro de sodio al 3% (300 µl por tubo) y 10 µl de heparina, cada uno de los cuales estaba rotulado con los datos del tiempo de muestreo. Una vez finalizada la obtención de muestras de estos animales se retiraron los catéteres, se realizó una curación en la zona y se administró una dosis de antibióticos y antiinflamatorios a cada animal.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 2000 rpm (580g) a 4°C por 10 minutos, el plasma se separó y almacenó en tubos eppendorf, que fueron rotulados y almacenados a -20°C para realizar los análisis bioquímicos y endocrinos plasmáticos.

#### 4. Sensibilidad a la Insulina

La sensibilidad a la insulina fue determinada desde las muestras obtenidas durante el TTGEV (Recabarren *et al.*, 2005).

a. ISI-Composite: Desde cada muestra, desde el T-15 al T180, se cuantificó la concentración de glucosa y desde el T-15 al T20 la concentración plasmática de insulina. Los valores obtenidos para estas variables bioquímicas se emplearon para calcular el índice de sensibilidad a la insulina (ISI-C) por medio de la fórmula de Matsuda y DeFronzo (1999):

$$ISI-C = \frac{10000}{\sqrt{[(\bar{X}I_{-15-0} \times \bar{X}G_{-15-0}) \times (\bar{X}I_{3-20} \times \bar{X}G_{3-20})]}}$$

Donde:

$\bar{X}I_{-15-0}$  = Promedio de la concentración de insulina basal (T-15-T0).

$\bar{X}G_{-15-0}$  = Promedio de la concentración de glucosa basal (T-15-T0).

$\bar{X}I_{3-20}$  = Promedio de la concentración de insulina estimulada (T3-T20).

$\bar{X}G_{3-20}$  = Promedio de la concentración de glucosa estimulada (T3-T20).

b. Relación insulina/glucosa basal: Se determinó a partir del cociente entre el promedio de la concentración plasmática basal de insulina (T-15-T0) y el promedio de la concentración plasmática basal de glucosa (T-15-T0).

c. Área bajo la curva: El área bajo la curva (ABC) basal de la concentración plasmática de glucosa e insulina durante el TTGEV se calculó por el método de los trapezoides desde el promedio de la concentración plasmática basal de insulina y glucosa proyectada desde el T0 hasta los 20 minutos de iniciado el test. El ABC estimulada se calculó a partir del área de la gráfica de insulina y glucosa durante los primeros 20 minutos del TTGEV a través del mismo método. El ABC incremental de la concentración plasmática de insulina y glucosa del TTGEV se calculó como la diferencia entre el ABC estimulado y el ABC basal.

d. ISI-Grulet (Grulet *et al.*, 1993): Se calculó a partir de la fórmula:

$$\text{ISI-G} = \frac{G_{40-20}}{G_{20}}$$

Donde:

$G_{20}$  = Concentración plasmática de glucosa durante el T20.

$G_{40-20}$  = Variación concentración plasmática de glucosa entre el T40-T20 calculado a partir de la regresión lineal.

e. Tasa de desaparición de la glucosa: Se calculó como la pendiente, entre el T10-T20, del logaritmo natural de la concentración plasmática de glucosa en mmol/l.

El primer TTGEV se realizó a las 26 semanas de edad en las hembras ovinas (periodo de desarrollo considerado como peripuberal) para determinar el efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina en esta etapa. Tras esto, cada grupo experimental, hembras-C y hembras-T, fue subdividido en 2 grupos, un subgrupo de ovejas fue ooforectomizado y el otro permaneció intacto (n=6 para cada grupo). Transcurridas 4 semanas desde la cirugía, a las 30 semanas de edad (periodo considerado como postpuberal temprano), se realizó un segundo TTGEV para diferenciar el efecto de los esteroides endógenos producidos por los ovarios sobre la sensibilidad a la insulina en esta etapa. Tras ello, por un periodo de 8 semanas, se administró una solución de propionato de testosterona (40 mg/oveja intramuscular 2 veces por semana) a ambos subgrupos de hembras, el ooforectomizado y el intacto, de cada grupo experimental (hembras-C y hembras-T). Posteriormente, se realizó un tercer TTGEV a las 38 semanas de edad (periodo de desarrollo somático considerado como postpuberal tardío) que permitió determinar el efecto de la administración crónica de testosterona, por 8 semanas, sobre la sensibilidad de los tejidos a la insulina en presencia o ausencia de ovarios (Anexo N°3 y N°4).

Tras el tercer TTGEV, las ovejas se eutanasiaron por medio de la administración de una sobredosis (30 mg/kg P.V.) endovenosa de tiopental sódico (Pentovet, Chemie). Desde las ovejas se obtuvo tejido pancreático, el que permitió identificar los cambios morfológicos inducidos en el tejido pancreático por la exposición prenatal a un exceso de testosterona.

Para esto un trozo de páncreas, de aproximadamente 5 mm de espesor, fue depositado en un envase con paraformaldehído 4% por 48 horas y posteriormente se incluyó en parafina. Otra parte del tejido pancreático se dispuso en un molde con OCT (Tissue-Tek®, Finetek) y fue congelado en isopentano, el bloque generado fue almacenado a -80°C y se utilizó posteriormente para los ensayos de inmunohistoquímica y microdissección láser. Para realizar los estudios moleculares, el páncreas restante se trozó en pequeños bloques, los que se dispusieron en bolsas individuales, debidamente rotuladas y se congelaron rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido. Tras ello se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

## **5. Ensayos endocrinos y bioquímicos**

Desde las muestras de sangre obtenidas de ambos grupos de madres control y tratadas con testosterona (madres-C y Madres-T, respectivamente), los fetos a los 120 días de gestación (fetos-C y fetos-T) y las ovejas de ambos grupos experimentales, hembras-C y hembras-T ooforectomizadas y enteras, durante los TTGEV se llevaron a cabo las siguientes cuantificaciones: concentración de glucosa, proteínas plasmáticas totales, triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL y la determinación de la actividad de las transaminasas hepáticas por medio de test colorimétricos enzimáticos (Human Gesellschaft für Biochemica Diagnostica, Germany). La cuantificación de la concentración plasmática de insulina, IGF-I, cortisol, triiodotironina, tiroxina, testosterona, estradiol y progesterona se realizó utilizando kits de radioinmunoensayo (DiaSource, Belgium; Siemens, USA). Para la cuantificación de melatonina se empleó el kit de radioinmunoensayo melatonin-direct RIA (IBL International GMBH, Hamburg, Germany), para la cuantificación de IGF-II y hormona antimülleriana se utilizaron kits de ELISA AnshLabs (Texas, USA) y adiponectina el kit comercial MyBiosource (San Diego, USA). Varios de los kits de radioinmunoensayos y los procedimientos que se llevaron a cabo han sido previamente validados en el Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Animal de la Universidad de Concepción, Chillán. Para aquellos kits que se emplearon por primera vez (AMH, IGF-II y adiponectina), se realizó un procedimiento de validación por medio de dilución y recuperación de una cantidad conocida de la hormona a determinar, los que presentaron

porcentajes de recuperación entre el 96,2 y 102,3% y un coeficiente de variación entre el 3,28 y 4,19% durante el ensayo de dilución. El coeficiente de variación, durante la cuantificación de metabolitos séricos y la actividad de las transaminasas hepáticas, fue menor al 2,47%. El coeficiente de variación intraensayo para los kits de radioinmunoensayo fue menor al 5,01% y el interensayo fue menor al 6,42%. El coeficiente de variación intraensayo de los kit de ELISA empleados fue menor al 4,19%.

## **6. Estudios Morfológicos**

### **6.1 Preparación de la Muestra**

Los fragmentos de páncreas permanecieron por un tiempo no menor a 12 horas y no mayor a 48 horas en paraformaldehído al 4%. Para la deshidratación de la muestra, esta se lavó en alcohol al 50%, y luego se empleó una serie de pasajes seriados por alcohol metílico (70% - 95% - alcohol absoluto) por un tiempo estandarizado según el tamaño de la muestra. Posteriormente, las muestras se depositaron en xilol realizando 3 cambios seriados cada 1 hora y 3 baños de parafina, siendo incluidas finalmente en bloques sólidos de parafina para facilitar el proceso de corte.

Para el estudio morfológico de los islotes de Langerhans, los bloques de parafina en que se encontraba incluida la muestra, se cortaron con un micrótopo (Leica). Se realizaron 2 sets de cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  de espesor con 3 cortes, separados cada uno de ellos por 20  $\mu\text{m}$  de distancia, el corte se depositó en un portaobjeto y se fijó a él mediante la aplicación de una temperatura constante (57°C) en una estufa (Mettmert) por 2 horas y, finalmente, la muestra se tiñó con hematoxilina-eosina bajo protocolos histológicos estándares.

### **6.2 Análisis morfológico**

En cada corte histológico se tomaron fotografías en 10 campos aleatorios con aumento 10x utilizando el microscopio (Leica DM 2000). Desde las imágenes obtenidas de los cortes se determinó el número de islotes de Langerhans, perímetro del islote y área total del islote. Asimismo, se realizaron otros análisis morfológicos de los islotes que permitieron describir la forma de estos, la distribución y el porcentaje que representan los islotes del total del

tejido pancreático, las cuales fueron cuantificadas utilizando el Software ImageJ versión 1.41 (National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

## 7. Ensayos de expresión génica

Se evaluó la expresión del ARNm de los factores de transcripción claves para la mantención del fenotipo funcional de las células  $\alpha$  y  $\beta$ , y la síntesis de glucagón e insulina, respectivamente. Para esto, se empleó el tejido pancreático dispuesto en el bloque de OCT. Los partidores fueron diseñados utilizando el programa PrimerQuestSM (IDT, USA), a partir de las secuencias publicadas para cada gen en NCBI (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de partidores y temperaturas de alineamiento para la amplificación de los genes mediante PCR tiempo real.

Gen	Secuencia de partidores	TA (°C)	Tamaño (pb)	Identificador NCBI
<i>PDX1</i>	F: 5' - TACGAAGGCTCATGCGTGGAAA 3'	60	152	XM_012137274.2
	R: 5' - GCGGCCTGGAGATGTACTTGTT 3'			
<i>NGN3</i>	F: 5' - GAGAACTGCACCGAGACGGAA 3'	60	182	XM_004021632.3
	R: 5' - TCCAGCGCAGAGTTGAGGTTAT 3'			
<i>PAX4</i>	F: 5' - AAGAATTCCAGCGTGGGCAGTA 3'	60	108	XM_015095162.1
	R: 5' - CCCTTCGGTTGGAAAACCAGAT 3'			
<i>PAX6</i>	F: 5' - GAGTAGCGACTCCAGAAGTTGT 3'	60	176	XM_012096163.2
	R: 5' - TTGCTTTTCGCTAGCCAGGTTG 3'			
<i>ARX</i>	F: 5' - CAGAACCGTCGGGCGAAGT 3'	60	148	XM_015104688.1
	R: 5' - CGGCTCCGAGGAAAGTGCTCA 3'			

<b><i>MAFA</i></b>	F: 5' - GCCATCGAGTACGTGAACGATT 3' R: 5' - CGCAGAAGCTGGGCGAAGA 3'	60	160	XM_015097639.1
<b><i>MAFB</i></b>	F: 5' - AAGACGCAGCTCATTTCAGCA 3' R: 5' - AAGCCGGAGTTGGCGAGTT 3'	60	110	XM_012189206.2
<b><i>NKX6.1</i></b>	F: 5' - AGAAGCACGCAGCCGAGAT 3' R: 5' - TGCCGGTCTGACTTGTGCTT 3'	60	174	XM_012180507.2
<b><i>NKX2.2</i></b>	F: 5' - AGAACCCCTTCTACGACAGCA 3' R: 5' - TTGTCATTGTCCGGTGACTCGT 3'	60	163	XM_015099673.1
<b><i>LMX1A</i></b>	F: 5' - ATGAGCAGTGCGTGCAATGT 3' R: 5' - TTCTGGGCCCCGCATAACAAACT 3'	60	169	XM_004002718.3
<b><i>NEUROD1</i></b>	F: 5' - AGCATCACCAACTCGGCTAT 3' R: 5' - ATCAGCCCACTCTCGCTGTA 3'	60	181	XM_012132137.2
<b><i>FOXO1</i></b>	F: 5' - CAGTGACTTGGACGGCATGTTT 3' R: 5' - TTTGGTTGGGCAACACGTTGTC 3'	60	122	XM_012184536.2
<b><i>INS</i></b>	F: 5' - ATTGGGCCCTCATTAAGACTC 3' R: 5' - AGGCTGCAGTTTCCGGATCATT 3'	60	122	XM_012167536.2
<b><i>GCG</i></b>	F: 5' - AGGGCACATTCACCAGTGA 3' R: 5' - TGGCAGCTTGGCCTTCCAAATA 3'	60	186	XM_012166332.1
<b><i>SST</i></b>	F: 5' - ATGCCCTGGAGCCTGAAGATTT 3' R: 5' - AATTCTTGCAGCCAGCTTTGCG 3'	60	126	NM_001009196.1
<b><i>GHRL</i></b>	F: 5' - TGAGCCCTGAACATCAGAAACT 3' R: 5' - ACTGAGCCCCTGACAGCTTGAT 3'	60	186	NM_001009721.3
<b><i>PPP</i></b>	F: 5' - CTGAGGCAGGCACTGATTTTGT 3' R: 5' - TTGCTCTGGCGTGGCATTGTC 3'	60	184	XM_004012972.3

<i>SLC2A2</i>	F: 5' - GTGGGCTAATTCAGGCTTGGT 3' R: 5' - ATGTGCCATAGCTCGTGATTGC 3'	60	166	XM_004003162.3
<i>GCK</i>	F: 5' - TCAACTGGACCAAGGGCTTCAA 3' R: 5' - TGCCCACAATCATGCCAACCTC 3'	60	189	NM_001287471.1
<i>KCNJ8</i>	F: 5' - AGCGGGATGGAGAAAAGTGG 3' R: 5' - ACTGTGATAGCCAGAGGGCATT 3'	60	152	XM_004006791.3
<i>KCNJ11</i>	F: 5' - AGGTCCAGGTGACCATTGGTTT 3' R: 5' - ATGAAGATGCAGCCCAGCATGA 3'	60	130	XM_015100987.1
<i>SURI</i>	F: 5' - TGGACATGTTCGAAGGGCGAAT 3' R: 5' - AATCGGATGGTGCCGCTAAAGA 3'	60	127	XM_015100983.1
<i>CACNA1D</i>	F: 5' - AAGAAATGGTGCCCTGCTTGGA 3' R: 5' - TTGAAGGCCTTTGGACATGCAG 3'	60	113	XM_012099909.2
<i>AKT</i>	F: 5' - GACCACGCCAGCCCCCACCAGT 3' R: 5' - GGACAAGGACGGCCACATCAAGA 3'	60	168	NM_173986.2
<i>IR</i>	F: 5' - GACGCAGGCCGGAGATGACCA 3' R: 5' - GCTCCTGCCC GAAGACCGACTC 3'	60	275	XM_590552.4
<i>IRS1</i>	F: 5' - TGGCACTGGGCGTAGAGGAGAAGG 3' R: 5' - CGCCCATCAGCTACGCCGACAT 3'	60	293	XM_581382.3
<i>IRS2</i>	F: 5' - CCCGAGAAGGTGGCCCGCATCA 3' R: 5' - AGCAACACGCCCGAGTCCATC 3'	60	268	NM_003749.2
<i>PKCζ</i>	F: 5' - CCTCCCACGTGTTGAAAGGA 3' R: 5' - GCGGAAGAAGGCATGAGACT 3'	60	431	NC_040263.1
<i>GLUT2</i>	F: 5' - CATCCATCTTCTCTTTGTCTG 3' R: 5' - GATTTTCCTTTGGTTTCTGG 3'	60	268	NM_001103222.1



<b>GLUT4</b>	F: 5' - GCTTGGCTTCTTCATCTTCACCTT 3' R: 5' - TGCTCAGACCACCCTTCCCTCCAG 3'	60	324	NM_174604.1
<b>PI3K</b>	F: 5' - TATATGGCGTAGCTGTGGAGA 3' R: 5' - AGGGCAAATAAATAGTGGTGAT 3'	60	391	M_93252.1
<b>ACTβ</b>	F: 5' - CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT 3' R: 5' - GGGCAGTGATCTCTTTCTGC 3'	60	267	NC_040275.1
<b>RPL13A</b>	F: 5' - AGGCTATGGAAGCAGGCTGAAA 3' R: 5' - GCCAGGCCAAGCATGAAGAATA 3'	60	122	XM_015104839.1
<b>YWHAZ</b>	F: 5' - TGCTTGTGAAGCGTTTGGGA 3' R: 5' - GAGCCCGTAGGTCATCTTGG 3'	60	179	NM_001267887.1
<b>HPRT1</b>	F: 5' - ACTGAACGACTGGCTCGAGAT 3' R: 5' - TCCAACAGGTCGGCAAAGAACT 3'	60	104	XM_015105023.1
<b>GAPDH</b>	F: 5' - AACATCAAGTGGGGTGATGCTG 3' R: 5' - TGGTTCACGCCCATCACAAACA 3'	60	161	NM_001190390.1

TA: temperatura de alineamiento. Fuente: Elaboración propia.

## 7.1 Microdissección láser

Para realizar una estimación específica de la expresión de genes involucrados en la vía de señalización de la secreción de insulina estimulada por glucosa y evitar la contaminación con ARNm proveniente del páncreas exocrino, los islotes de Langerhans fueron microdisectados empleando un microdisector láser (LMD7000 Leica Microsystems, Germany) en el Centro de Microscopía Avanzada Bío-Bío (CMA) de la Universidad de Concepción. El tejido pancreático congelado en el bloque de OCT fue cortado en láminas de 20 μm de espesor en el criostato Microm HM550 (Thermo Scientific, Germany), las cuales se montaron sobre portaobjetos recubiertos con membranas de tereftalato de polietileno (#11505151 Leica Microsystems, Germany). Posteriormente y para facilitar el reconocimiento de los islotes de Langerhans entre el tejido pancreático, las láminas de

tejido fueron teñidas con hematoxilina por 15 segundos y lavadas en agua libre de nucleasas estéril para remover el exceso de colorante. Los islotes fueron identificados por su estructura histológica y microdisectados. Los pequeños trozos de tejido fueron recibidos en un tubo eppendorf con 20  $\mu$ l RNA later (Ambion®, Austin-Texas, EE.UU.) y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento posterior.

## **7.2 Extracción de ARN total**

Para el aislamiento de ARN total, los trozos microdisectados fueron procesados utilizando RNAqueous® MicroKit (Ambion, EE.UU.). El rendimiento de ARN total se cuantificó fotométricamente a 260 nm, usando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Schweter, Alemania).

La calidad de las muestras de ARN fue verificada por medio de electroforesis, en condiciones denaturantes para ARN, en un gel de agarosa al 1%, formaldehído y bromuro de etidio. Para descartar la contaminación con ADN genómico, se realizó una digestión del ADN previo a la transcripción inversa. El tratamiento con DNAsa se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 12  $\mu$ l, que contenía 3  $\mu$ g de ARN total y 3 U de DNAsa (Invitrogen). La mezcla de la reacción fue incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, deteniendo la reacción al adicionar 3  $\mu$ l de EDTA 25 mM. Luego se incubó durante 5 minutos a  $75^{\circ}\text{C}$  y posteriormente los tubos se dispusieron en una cubeta con hielo durante 5 minutos.

## **7.3 Reacción de transcripción reversa**

Para la obtención del ADNc, se utilizó el kit SuperScript® III First-Strand. La elusión se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ l. Para esto, se usaron 4  $\mu$ l de ARN de cada muestra, 1  $\mu$ l de Random Hexámeros y 1  $\mu$ l de Buffer annealing, los cuales fueron incubados durante 5 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ , posteriormente, se adicionaron 10  $\mu$ l de 2x First-Strand Reaction Mix y 2  $\mu$ l de Enzima SuperScript® III/RNaseOUT™, y se incubaron nuevamente a  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, luego  $50^{\circ}\text{C}$  por 50 minutos y finalmente,  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Los ADNc obtenidos a partir del protocolo realizado anteriormente, se mantuvieron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## 7.4 PCR

Los partidores que se utilizaron para la reacción de PCR fueron elaborados a partir de la información presente en GenBank para los genes PDX1, NGN3, PAX4, PAX6, ARX, MAFA, MAFB, NKX6.1, NKX2.2, LMX1A, NEUROD1, FOXO1, INS, SST, GHRL, PPP, GCG, SLC2A2, GCK, KCNJ8, KCNJ11, SUR1, CACNA1D, IR, IRS1, IRS2, AKT, PKC $\zeta$ , GLUT2, GLUT4, PI3K, ACT $\beta$ , RPL13A, YWHAZ, HPRT1 y GAPDH. La temperatura óptima de alineamiento de los partidores se determinó utilizando un termociclador con gradiente de temperatura.

Desde el producto de PCR se realizó diluciones seriadas que sirvieron para cuantificar en el qPCR. Se utilizaron 2  $\mu$ l de ADNc como templado, además de 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0,1% Triton® X-100, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada primer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,5 U Taq ADN polimerasa (Invitrogen) en un volumen total de 25  $\mu$ l. La reacción de PCR consistió en una denaturación inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; un anillamiento, cuya temperatura se determinó a partir del PCR realizado en el termociclador de gradiente de temperatura, por 60 segundos y una extensión final a 72°C por 2 minutos. Se analizaron alícuotas de 10  $\mu$ l de los productos de la reacción de PCR por electroforesis, en un gel agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio. El gel fue documentado usando una cámara digital. La densidad de las bandas, medidas en pixeles, se analizó con el software ImageJ.

## 7.5 PCR tiempo real (qPCR)

La determinación de la expresión del ARN mensajero se realizó mediante PCR en tiempo real. Se utilizó el termociclador Rotor-Gene RG-6000 (Corbett Research, Mortlake Australia). Se utilizó 1  $\mu$ l de cDNA como templado para la reacción de qPCR. La reacción consistió en 5  $\mu$ l of 50x SYBR Green, 3,4  $\mu$ l de 2x SensiMix solution (Quantace Ltd, London, UK) y 0,4  $\mu$ M de cada partidador en una solución final de 10  $\mu$ l. El programa para el PCR consistió en: una denaturación inicial a 95°C por 10 min, seguido de una amplificación de tres pasos por 45 ciclos que incluyó: una denaturación a 95°C por 15 segundos, un alineamiento por 20 segundos y una extensión a 72°C por 30 segundos. Luego se obtuvo la curva de disociación (melting curve) que permitió detectar los fragmentos específicos de ADN amplificados.

La cuantificación se realizó usando el método  $\Delta\Delta C_t$  y para cada qRT-PCR, las muestras fueron analizadas en duplicado (réplicas técnicas). Los valores de  $C_t$  de todos los genes analizados fueron normalizados utilizando como genes constitutivos RPL13A, YWHAZ y HPRT1. La adquisición de resultados se llevó a cabo al final de cada ciclo de anillamiento y la etapa de extensión. El número de ciclos para todos los genes fue de 45.

## **8. Aislamiento de proteínas**

### **8.1 Extracción de proteínas**

Las proteínas totales desde el tejido pancreático se extrajeron por homogenización por ultrasonido con 5 pulsos de 10 segundos cada uno a 70% de potencia en el sonicador (Ultrasonic homogenizer 150 V/T. Biologicals), en una solución de sacarosa 0,3 M que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas (80  $\mu$ M aprotinina, 1.5 M peptatina A, 2 M leupeptina, 104 mM AEBSF, 4 mM bestatina, 1.4 mM E-64, Sigma, St. Luis, MO, EE.UU.). El homogenizado fue centrifugado a 8000g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante que se obtuvo correspondió al extracto de proteínas totales.

### **8.2 Cuantificación de proteínas totales**

Para determinar la concentración de proteínas totales se cuantificó el sobrenadante fotométricamente a 595 nm usando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Schweter, Alemania).

### **8.3 Determinación de la integridad de las proteínas**

Se realizó mediante un análisis del patrón de migración electroforético de las proteínas totales en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). Se cargaron 30  $\mu$ g de proteínas totales de cada muestra (controles y tratados) en un gel de acrilamida preparado al 10%. Las muestras fueron incubadas con buffer de carga (50 mM Tris-HCl; 5% p/v  $\beta$ -mercaptoetanol; 2% p/v SDS; 10% p/v glicerol; 0,1% p/v azul de bromofenol) y calentadas a 95°C durante 5 minutos. Se cargaron en el gel y se corrió la electroforesis a 100 volts durante 2 horas. Luego, se tiñó con azul Coomassie y se observó el perfil de proteínas distribuidas en el gel una vez finalizada la electroforesis.

## **9. Western-blot**

### **9.1 Electroforesis de proteínas**

Para separar las proteínas de cada muestra, entre 30 y 60  $\mu\text{g}$  de proteínas totales fueron diluidas en buffer de carga 1x y denaturadas a 95°C por 5 minutos. Las muestras se sembraron en geles de acrilamida/bisacrilamida 30%, compuesto por un gel separador de proteínas en la parte inferior (acrilamida/bisacrilamida al 10% p/v) y un gel concentrador (acrilamida/bisacrilamida al 5%) en la parte superior. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara con buffer de electroforesis aplicando 100 volts durante 2 horas.

### **9.2 Transferencia a membrana**

Las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Para la transferencia, el gel se dispuso sobre las membranas y, estos dos, entre láminas de papel filtro, los cuales fueron fijados por medio de una abrazadera y se introdujeron dentro de una cámara con buffer de transferencia. Para permitir el traspaso de las proteínas desde el gel a la membrana, se aplicó una corriente eléctrica constante de 350 mA por 90 minutos. Posteriormente el éxito del proceso de transferencia se evaluó tiñendo la membrana con Rojo Ponceau S, colorante que se une rápida y reversiblemente a las proteínas y el gel de poliacrilamida con Azul de Coomassie para evaluar la presencia de proteínas residuales en este. De esta forma pudo determinarse la eficiencia del proceso de transferencia.

### **9.3 Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado**

Las membranas fueron bloqueadas con tampón TBS Tween 20 (72,3 mM NaCl; 20,7 mM Tris pH 7,4; 0,1% v/v Tween 20) y 5% leche descremada por 1 hora con agitación constante y, posteriormente, fueron incubada con el anticuerpo primario diluido en buffer de bloqueo por 12 a 16 horas a 4°C. Después de 8 lavados de 5 minutos con tampón TBS Tween 20, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario diluido en buffer de bloqueo por 2 horas a temperatura ambiente. La actividad de la enzima peroxidasa de rábano (HRP) conjugada al anticuerpo secundario fue revelada por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer). La película radiográfica (Kodak) fue expuesta por 3-10 minutos a la

reacción. La señal en la película radiográfica fue revelada en solución de revelado y posteriormente se fijó en solución fijadora.

#### **9.4 Cuantificación de la intensidad de bandas**

Para cuantificar la cantidad de proteínas traducidas, se normalizó el valor relativo según la intensidad de la banda, en relación a la expresión de su control. Las imágenes fueron obtenidas por digitalización y convertidas a escala de grises. Con el programa ImageJ (NIH), se seleccionó las zonas que contenían las bandas y se cuantificó el área de los máximos de intensidad. Los valores fueron expresados como la relación de la intensidad de las bandas de la proteína en cuestión y una proteína de expresión constitutiva (GADPH o  $\beta$ -actina).

#### **10. Inmunohistoquímica**

Se evaluó la expresión de insulina y PDX1 en las células  $\beta$  pancreáticas, a través de inmunofluorescencia. Las muestras de tejido pancreático fueron crioseccionadas (20  $\mu$ m) y se hidrataron, la recuperación antigénica para PDX1 se realizó con EDTA pH 8,0 (biosistema de diagnóstico) a 96°C en microondas durante 20 minutos. Los portaobjetos se lavaron en PBS 1x, y se bloquearon las proteínas con suero de caballo normal al 3% v/v. La inmunodetección se realizó por medio de la incubación con un anticuerpo primario por 16 horas a 4°C, al segundo día fueron lavadas con PBS 1x e incubadas con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo (Alexa 594) junto a ToPro-3 (1:200) por 2 horas en Tris fosfato-BSA 1%. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con PBS, los cubreobjetos se montaron sobre los portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia (Dako) y se secaron a 4°C, almacenándose a -20°C. Los anticuerpos empleados para la inmunofluorescencia fueron: anti-insulina (abx100105, abbexa; K36aC10 ab6995, Abcam), anti-PDX1 (B-11, sc-390792, Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-glucagón (abx009229, abbexa) y anti-somatostatin (abx008682, abbexa), isotipos de IgG fueron usados como controles negativos. Las inmunotinciones se realizaron usando Alexa Fluor 594 marcado a insulina, alexa 488 a glucagón y alexa 634 a somatostatina (Thermofisher) 1:200 durante una hora a temperatura ambiente, luego se lavaron tres veces en PBS 1x durante 10 minutos

y se montaron con medio de montaje acuoso (Faramount DAKO). La cuantificación se realizó midiendo la intensidad promedio de la fluorescencia por campo visual de los canales de interés usando el programa ImageJ. La adquisición se llevó a cabo con el objetivo Plan-Apochromat 40x 1,3 en aceite, empleando el láser 555 nm para insulina y 488 nm para PDX1 con el Microscopio confocal LSM700 Zeiss en el Centro de Microscopía Avanzada Bío-Bío (CMA) de la Universidad de Concepción.

La determinación del área inmunorreactiva y la distribución de las células que forman parte de los islotes pancreáticos se realizó a través de inmunomarcaje por inmunoperoxidasa. Para ello las muestras de 4  $\mu\text{m}$ , fueron desparafinadas e hidratadas, tras ello se incubaron durante toda la noche con cada anticuerpo (insulina 1:500, PDX1 1:200, somatostatina 1:200 y glucagón 1:200) en Diamod Diluent Antibody. Al segundo día las muestras se incubaron con el anticuerpo conjugado a peroxidasa Anti-goat (ImmunoResearch, Jackson) o horse anti-mouse/rabbit IgG (ImmPRESS, Vector) por 1 hora a temperatura ambiente. Tras ello, las muestras se lavaron tres veces en PBS 1x por 10 minutos. El revelado se realizó con el substrato cromógeno Dab (ImmPACT, Vector) por 1 minuto y la reacción se detuvo agregando agua, las muestras fueron contrateñidas con hematoxicilina, se deshidrataron y montaron con medio entellán.

## **11. Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  error estándar de la media. Los registros morfométricos de los fetos, la concentración plasmática de metabolitos y hormonas determinadas desde las muestras extraídas en los fetos a los 120 días de gestación fueron comparadas por medio de un test de Mann-Withney o t de Student de acuerdo a la distribución de los resultados. La dinámica de la concentración plasmática de insulina y glucosa obtenida a partir de los TTGEV junto con la concentración de hormonas y metabolitos plasmáticos de las muestras de sangre yugulares semanales de las madres se realizó por medio de un análisis de varianza de muestreos repetidos con un posthoc test de Tukey. La comparación de los índices de sensibilidad a la insulina, análisis endocrinos y bioquímicos sanguíneos y los análisis histológicos del tejido pancreático se realizaron por medio de test de Mann-Whitney o t-Student no pareada según la distribución de los

resultados. Adicionalmente se realizaron análisis de correlación a partir de los resultados obtenidos por medio del test de Pearson o Spearman de acuerdo a la distribución de los resultados obtenidos de las muestras. La comparación de la cuantificación de la expresión del ARNm (qPCR) y de la expresión de proteínas (inmunofluorescencia) se realizó por medio de análisis paramétricos o no paramétricos dependiendo de la distribución de los datos. La evaluación del efecto de la ooforectomía y la administración crónica de testosterona se realizó por medio de un análisis de varianza de muestreos repetidos y los índices de sensibilidad a la insulina a través de t-Student pareada o el test de Wilcoxon si la distribución de los resultados era paramétrica o no paramétrica, respectivamente. Estos análisis se realizaron utilizando el programa GraphPad Prisma v8.0, considerando un valor de  $P < 0,05$  como una diferencia estadísticamente significativa en la determinación de la diferencia al comparar entre o dentro de los grupos según el estudio.





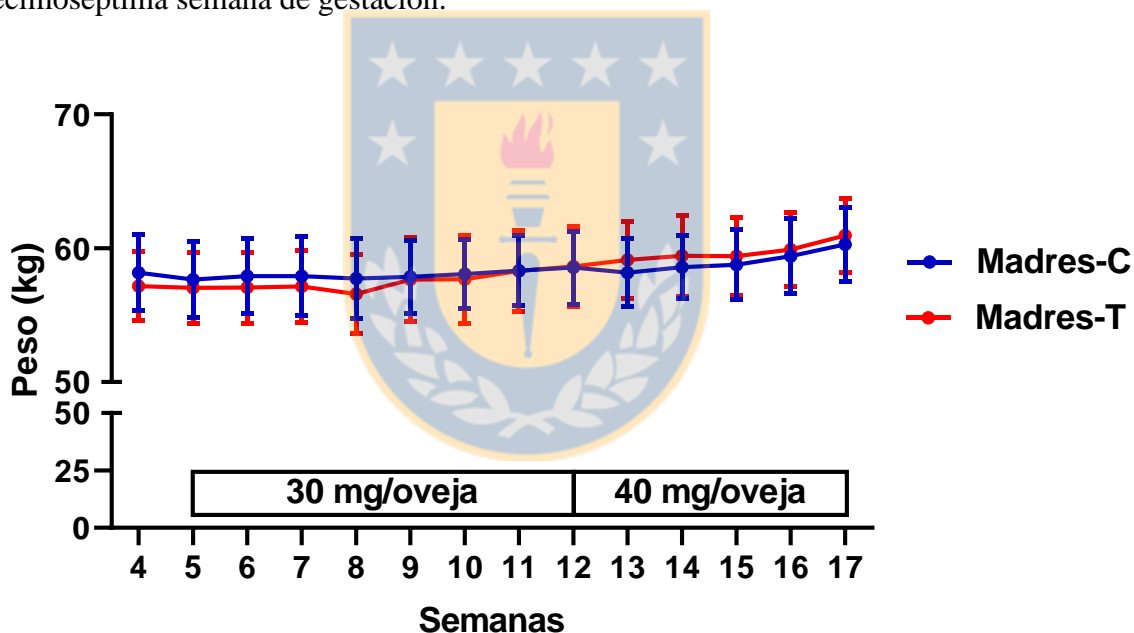
## 4. RESULTADOS

### Alteraciones endocrinas y metabólicas en ovejas gestantes tratadas con testosterona

#### Peso de las madres

El peso promedio de las madres-T fue  $58,37 \pm 0,37$  kg, en cambio en el grupo de madres-C el promedio fue  $58,40 \pm 0,21$  kg, siendo similares al comparar ambos grupos experimentales (Gráfico 1). Al comparar la variación en el peso corporal en la medida que avanzó la gestación en ambos grupos de hembras no hubo diferencias significativas.

Gráfico 1: Progresión del peso corporal de las madres-T y madres-C desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación.



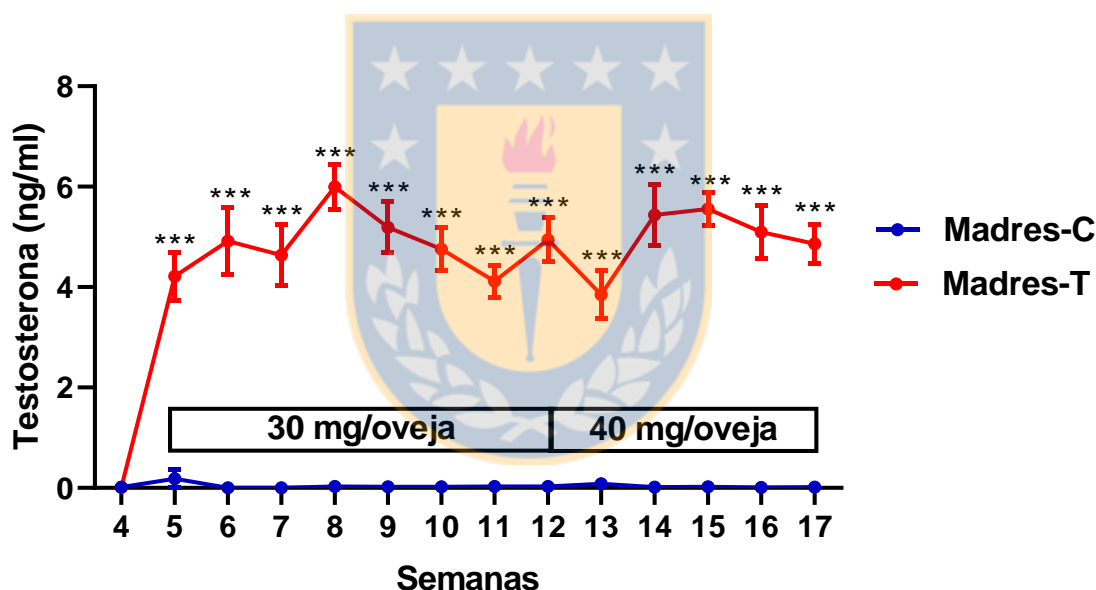
#### Variables endocrinas

##### Testosterona

La concentración plasmática de testosterona el día 28 de gestación (4 semanas) fue similar entre ambos grupos de hembras gestantes. Sin embargo, en la quinta semana hubo un aumento significativo de la concentración plasmática de testosterona en el grupo de hembras a las que se les administró este andrógeno, que se mantuvo hasta el fin del experimento. El promedio de la concentración plasmática de testosterona en el grupo de

madres-C fue  $0,02 \pm 0,01$  ng/ml, en cambio en el grupo de madres-T la concentración promedio fue  $4,89 \pm 0,17$  ng/ml (Gráfico 2) siendo significativamente mayor en el grupo de hembras tratadas ( $P < 0,001$ ). Al comparar la concentración plasmática de testosterona durante el periodo en que se administraron 30 mg y 40 mg no se evidenció un cambio significativo en la concentración plasmática de esta hormona, la media en cada periodo fue  $4,8 \pm 0,38$  ng/ml y  $4,9 \pm 0,25$  ng/ml, respectivamente.

Gráfico 2: Concentración plasmática de testosterona en madres-C y madres-T desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación (\*\*\*: diferencia estadísticamente significativa entre los grupos  $P < 0,001$ ).



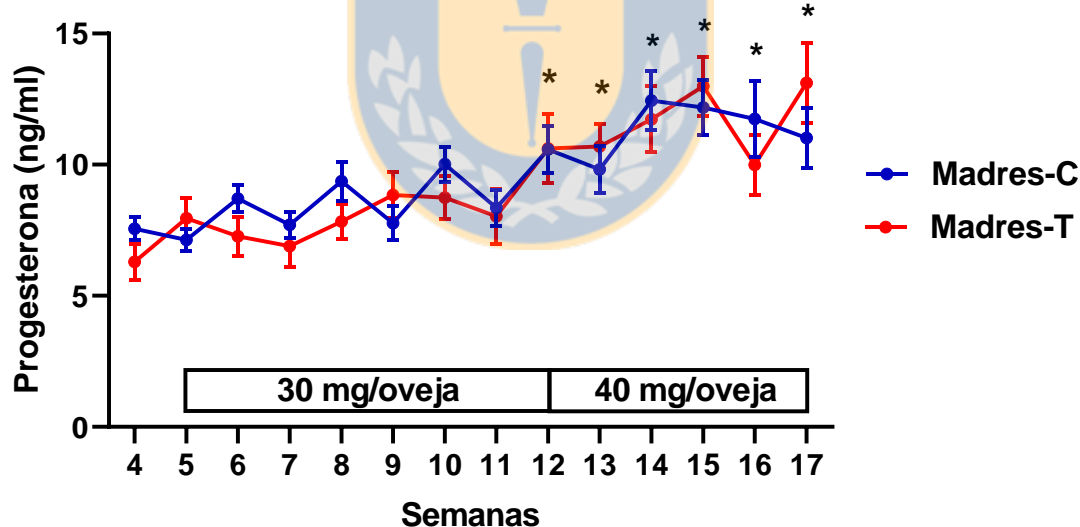
### Progesterona

La concentración plasmática de progesterona aumentó progresivamente en ambos grupos de hembras en la medida que avanzó la gestación. Este incremento se hizo significativo desde la semana 12 de gestación con respecto a la semana 4 ( $P < 0,05$ ). El promedio de la concentración plasmática de progesterona en el grupo de hembras control fue  $9,76 \pm 0,28$  ng/ml, en cambio en el grupo de hembras EPT el promedio fue  $9,59 \pm 0,58$  ng/ml siendo similar al comparar ambos grupos. El promedio de la concentración plasmática de progesterona fue  $8,22 \pm 0,80$  ng/ml durante el periodo en que se administraron 30 mg de

testosterona a las madres-T y  $8,65 \pm 0,50$  ng/ml durante el mismo periodo en las madres-C. Durante el periodo en que se administraron 40 mg/oveja de testosterona la concentración plasmática de progesterona fue  $11,68 \pm 1,10$  ng/ml en el grupo de madres-T y  $11,41 \pm 1,10$  ng/ml en las madres-C. Durante todo el periodo de gestación estudiado la concentración plasmática de progesterona fue similar entre los grupos de ovejas gestantes (Gráfico 3).

Al realizar una correlación entre la concentración plasmática de testosterona y progesterona en el grupo de hembras tratadas se observó una correlación negativa entre ellas ( $r=-0,7866$ ;  $P<0,05$ ).

Gráfico 3: Concentración plasmática de progesterona en madres-T y madres-C desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación (\*: Diferencia estadísticamente significativa al comparar la concentración plasmática de progesterona en ambos grupos con respecto a la cuarta semana de gestación).

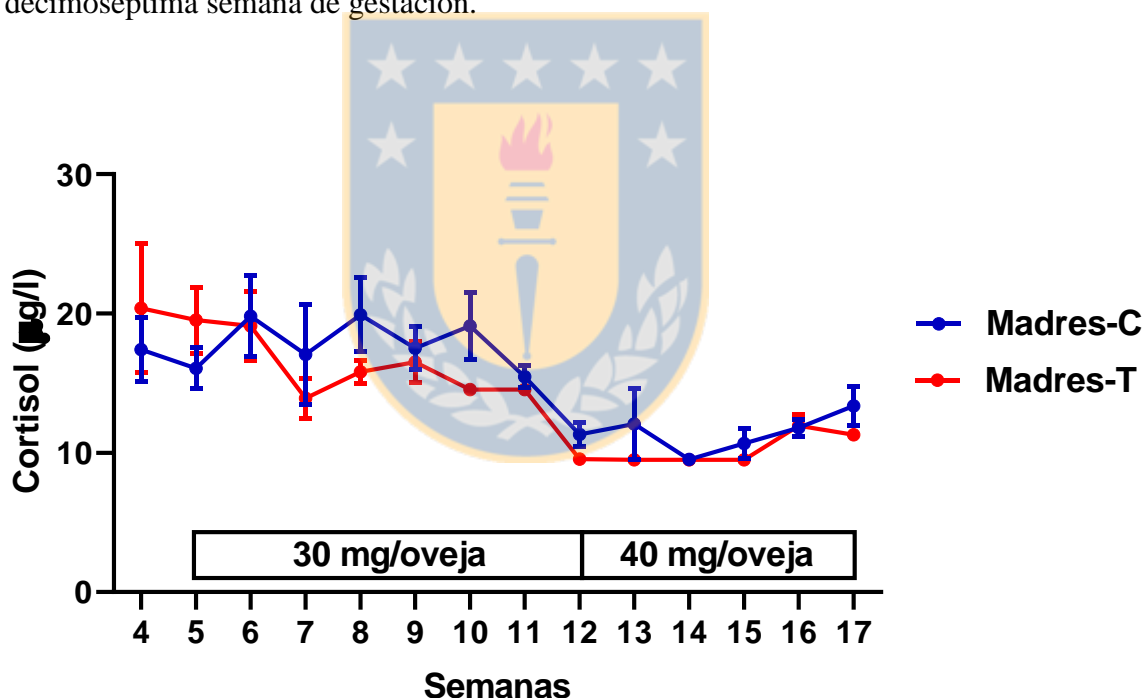


### Cortisol

La concentración plasmática de cortisol disminuyó progresivamente en la medida que avanzó la gestación, al comparar entre grupos no hubo diferencias estadísticamente significativas en esta variable.

El promedio de la concentración plasmática de cortisol durante el periodo experimental fue  $14,90 \pm 0,96 \mu\text{g/l}$  en las madres-C y  $13,48 \pm 1,00 \mu\text{g/l}$  en el grupo de madres-T. La concentración plasmática de cortisol en el grupo de hembras tratadas fue  $15,44 \pm 1,12 \mu\text{g/l}$  en el periodo en que se administraron 30 mg de propionato de testosterona y  $10,34 \pm 0,53 \mu\text{g/l}$  cuando se administraron 40 mg, en cambio en el grupo de ovejas gestantes control durante los mismos periodos la concentración plasmática de cortisol fue  $17,03 \pm 1,00$  y  $11,48 \pm 0,65 \mu\text{g/l}$ , respectivamente (Gráfico 4). Al comparar entre grupos no hubo diferencias significativas durante ambos periodos en esta variable.

Gráfico 4: Concentración plasmática de cortisol en madres-T y madres-C desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación.

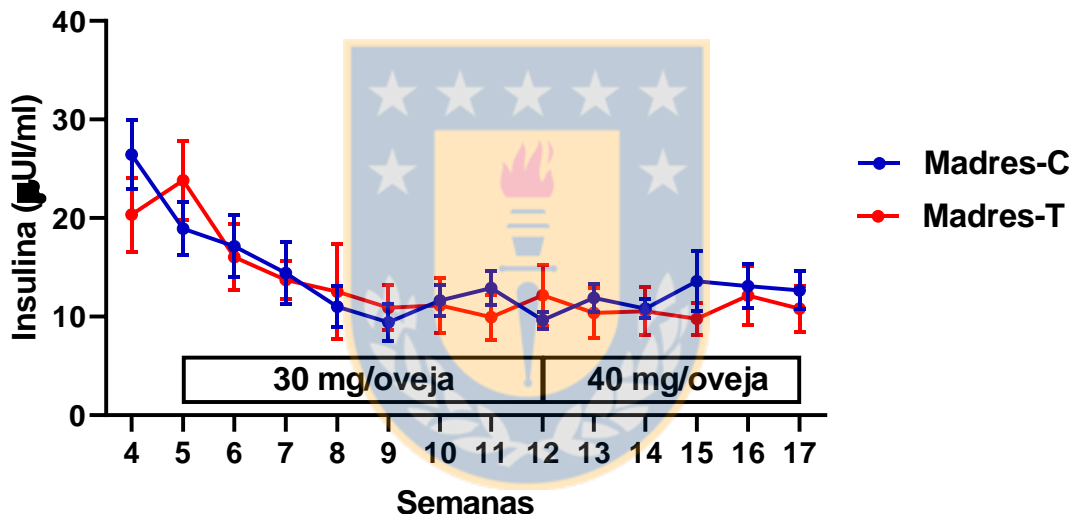


### Insulina

El promedio de la concentración plasmática de insulina durante el periodo experimental, en el grupo de hembras tratadas fue  $12,61 \pm 1,05 \mu\text{UI/ml}$ , en cambio en el grupo de hembras control fue  $12,86 \pm 0,76 \mu\text{UI/ml}$  siendo similar la concentración de esta hormona entre los grupos al comparar el promedio de todo el periodo y cada semana. La concentración

promedio de insulina en las madres-T en el periodo en que se administraron 30 mg de testosterona fue  $13,78 \pm 1,58 \mu\text{UI/ml}$  y  $10,74 \pm 0,39 \mu\text{UI/ml}$  cuando se administraron 40 mg. En cambio, la concentración plasmática de insulina en el grupo de madres-C fue  $13,14 \pm 0,39$  y  $12,41 \pm 0,49 \mu\text{UI/ml}$  en los periodos comparables, respectivamente. No hubo correlación entre la concentración plasmática de insulina y la de testosterona en el grupo tratado (Gráfico 5).

Gráfico 5: Concentración plasmática de insulina durante el periodo experimental en madres-T y madres-C.

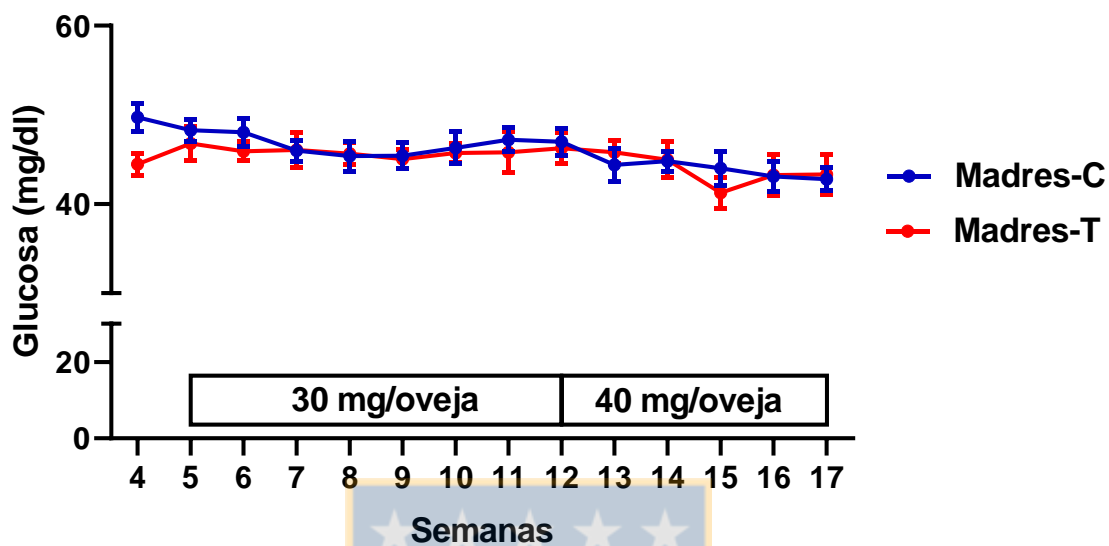


## Variables bioquímicas sanguíneas

### Glucosa

La concentración plasmática de glucosa se mantuvo estable a lo largo del periodo experimental en ambos grupos (Gráfico 6). El promedio de la concentración plasmática de glucosa en el grupo de madres-C fue  $45,59 \pm 0,49 \text{ mg/dl}$  y en las madres-T fue  $45,07 \pm 0,43 \text{ mg/dl}$  siendo similar entre ambos grupos.

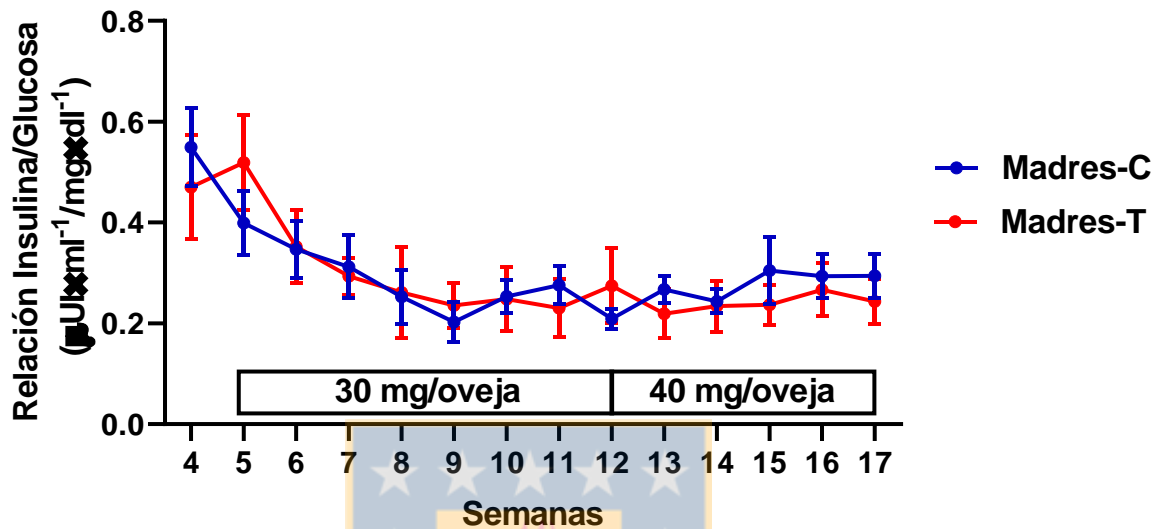
Gráfico 6: Concentración plasmática de glucosa en madres-C y madres-T desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación.



### Relación Insulina/Glucosa

La relación insulina/glucosa disminuyó durante las primeras semanas del ensayo lo que coincidió con la disminución en la concentración plasmática de insulina durante ese mismo periodo. Posteriormente, este índice permaneció estable desde la octava semana de gestación hasta la última semana registrada (Gráfico 7). El promedio de la relación insulina/glucosa durante todo el periodo en el grupo de madres-C fue  $0,28 \pm 0,01 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} / \text{mg} \times \text{dl}^{-1}$  y en las madres-T fue  $0,28 \pm 0,02 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} / \text{mg} \times \text{dl}^{-1}$ , esta variable fue similar entre ambos grupos.

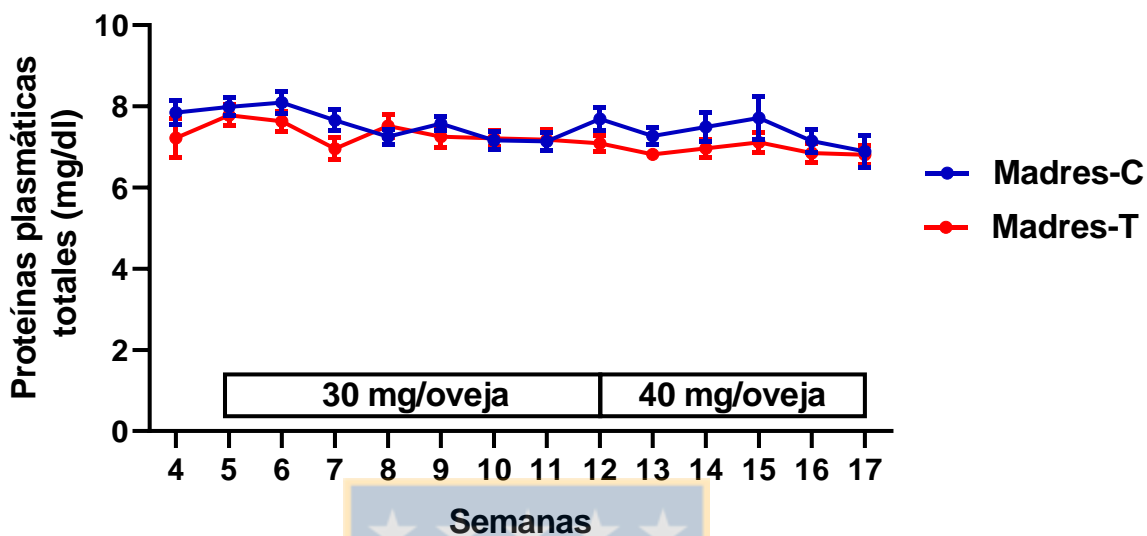
Gráfico 7: Relación insulina/glucosa basal en madres-C y madres-T desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación.



### Proteínas plasmáticas totales

La concentración de proteínas plasmáticas se mantuvo estable durante todo el periodo de estudio en forma muy similar a lo que ocurre con la concentración plasmática de glucosa, presentando escasa variación entre las hembras que componen cada grupo (Gráfico 8). Al comparar la concentración de estas entre ambos grupos, semana a semana, no hubo diferencias entre ellos. En cambio, al comparar la concentración promedio durante todo el experimento esta fue significativamente menor ( $P=0,0425$ ) en el grupo de madres-T ( $7,17 \pm 0,09$  ng/dl) con respecto a las madres-C ( $7,47 \pm 0,10$  ng/dl).

Gráfico 8: Concentración de proteínas plasmáticas totales en madres-C y madres-T desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación.

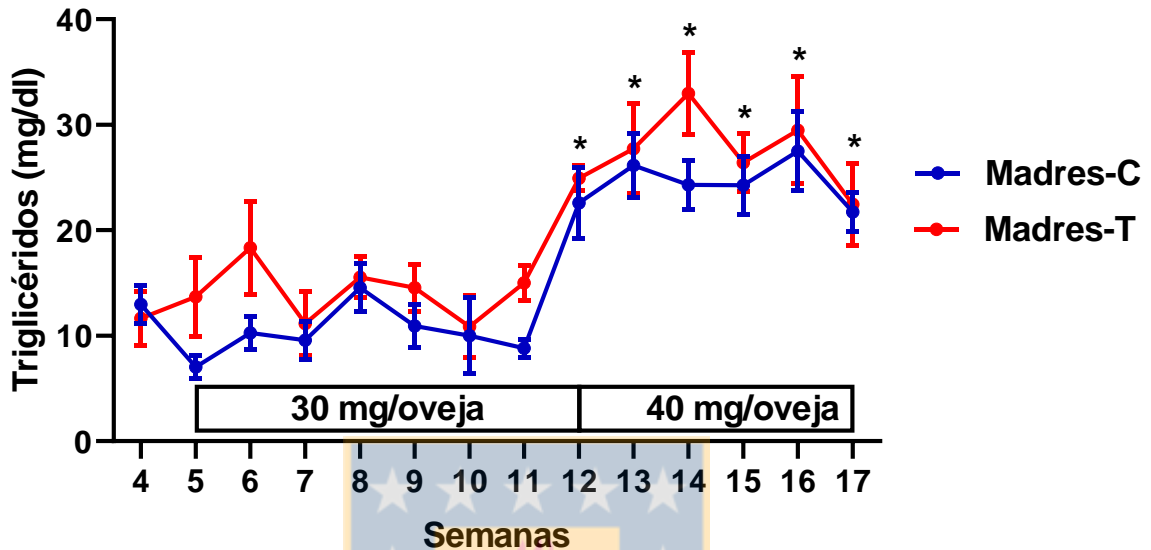


### Triglicéridos

La concentración plasmática de triglicéridos presentó un aumento significativo alrededor de la semana 12-13 de gestación, respecto a la semana 4, en ambos grupos ( $P < 0,05$ ). El promedio durante todo el periodo experimental fue similar al comparar ambos grupos siendo  $20,24 \pm 2,01$  mg/dl para el grupo de madres-T y  $16,74 \pm 2,14$  mg/dl en el grupo de madres-C (Gráfico 9). En las madres-T el promedio de la concentración de triglicéridos cuando se administraron 30 mg de testosterona fue  $15,51 \pm 1,59$  mg/dl y  $27,81 \pm 1,73$  mg/dl en el periodo que se administraron 40 mg de propionato de testosterona. En cambio, en el grupo de madres-C en los periodos comparables a los indicados para las madres-T, el promedio de la concentración plasmática de triglicéridos fue  $11,72 \pm 1,73$  y  $24,79 \pm 0,98$  mg/dl, respectivamente, lo que fue similar entre los dos grupos experimentales.



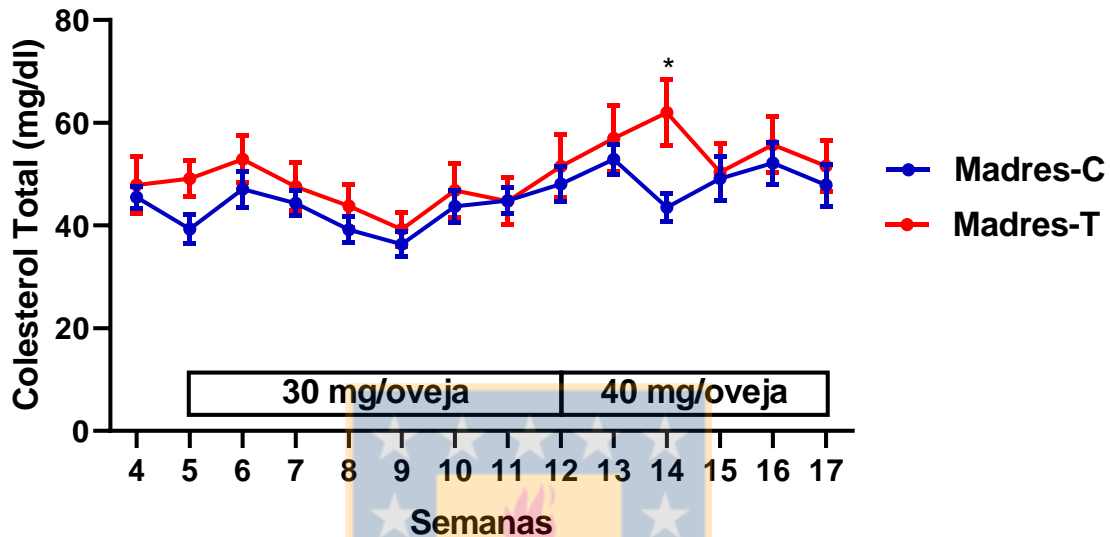
Gráfico 9: Concentración plasmática de triglicéridos en madres-C y madres-T desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación.



### Colesterol Total

Al comparar la concentración plasmática de colesterol total en las ovejas gestantes durante el periodo de estudio hubo un aumento significativo ( $P=0,0226$ ) durante la semana 14 de gestación en el grupo de madres-T con respecto a las madres-C (Gráfico 10). El promedio de la concentración plasmática de esta variable en el grupo de madres-T fue  $50,18 \pm 0,83$  mg/dl siendo significativamente mayor ( $P<0,0001$ ) al compararlo con el promedio del grupo de madres-C el que fue  $45,26 \pm 0,61$  mg/dl.

Gráfico 10: Concentración plasmática de colesterol total en madres-C y madres-T desde la cuarta a la decimoséptima semana de gestación (\*: Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos).



### Efectos de la administración de testosterona en ovejas preñadas y fetos hembra a los 120 días de gestación

Durante la semana 17 de gestación y 48 horas tras la administración de la última dosis de testosterona se realizó una cesárea para determinar los cambios en la concentración plasmática de algunas variables endocrinas y metabólicas producidas por la administración de testosterona en las madres y si estos se relacionan con cambios en las mismas variables fetales. Al comparar ambos grupos de madres el peso corporal fue similar el día de la cirugía (Tabla 2). Sólo se presentó una disminución en la concentración plasmática de colesterol total, progesterona y en la relación insulina/IGF-I en las madres-T. En cambio, hubo un aumento fuertemente significativo en la concentración plasmática de testosterona total en el grupo de madres-T al compararlas con las madres-C.

Tabla 2: Comparación de las variables endocrinas y bioquímicas de las madres-C y madres-T a los 120 días de gestación.

<b>Variable</b>	<b>Madres-C</b>	<b>Madres-T</b>	<b>Valor de P</b>
Peso (kg)	71,43 ± 1,98	68,20 ± 2,17	0,2894
<b>Variabes bioquímicas</b>			
Glucosa (mg/dl)	46,53 ± 3,52	46,83 ± 1,58	0,6038
PPT (mg/dl)	6,97 ± 0,22	7,26 ± 0,16	0,2996
Triglicéridos (mg/dl)	25,34 ± 1,69	28,47 ± 3,16	0,5722
Colesterol total (mg/dl)	58,35 ± 3,51	47,48 ± 2,23	0,0160*
Colesterol HDL (mg/dl)	10,30 ± 1,57	9,53 ± 1,69	0,5354
Colesterol LDL (mg/dl)	42,79 ± 3,54	32,26 ± 3,18	0,2428
<b>Variabes endocrinas</b>			
Testosterona total (ng/ml)	0,01 ± 0,002	2,75 ± 0,26	<0,0001***
Testosterona libre (pg/ml)	ND	11,65 ± 0,81	-
Relación TL/TT	ND	0,0044 ± 0,0004	-
Estradiol (pg/ml)	13,97 ± 1,92	22,34 ± 3,33	0,1512
Progesterona (ng/ml)	17,89 ± 1,71	11,62 ± 1,34	0,0095**
Hormona Antimülleriana (ng/ml)	2,45 ± 0,42	3,56 ± 1,00	0,5490
Insulina (µUI/ml)	12,58 ± 1,48	10,00 ± 1,72	0,2762
IGF-I (ng/ml)	48,57 ± 7,18	64,36 ± 8,79	0,2428
IGF-II (ng/ml)	234,50 ± 27,94	190,90 ± 11,76	0,1542
Adiponectina (pg/ml)	43,03 ± 9,32	36,43 ± 12,32	0,3562
Cortisol (µg/l)	18,37 ± 4,84	15,45 ± 2,92	0,6971
Triiodotironina (T3) (nmol/l)	1,32 ± 0,11	1,65 ± 0,19	0,1645
Tiroxina (T4) (nmol/l)	78,36 ± 8,19	80,16 ± 8,35	0,8804
Relación T3/T4	1,74 ± 0,15	2,07 ± 0,12	0,0506
Relación Insulina/Glucosa	0,28 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,1170
Relación Insulina /IGF-I	0,29 ± 0,04	0,20 ± 0,06	0,0456*
Relación IGF-I/Cortisol	3,42 ± 0,59	5,36 ± 1,16	0,2428
Relación IGF-II/Cortisol	18,19 ± 4,53	15,40 ± 2,18	1,0000

ND: No detectable. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3: Comparación de las variables endocrinas y bioquímicas entre fetos ovinos, fetos-C y fetos-T, a los 120 días de gestación.

<b>Variables</b>	<b>Fetos-C</b>	<b>Fetos-T</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Variables bioquímicas</b>			
Glucosa (mg/dl)	33,26 ± 4,87	26,17 ± 4,29	0,2859
PPT (mg/dl)	3,56 ± 0,12	3,56 ± 0,006	0,4446
Triglicéridos (mg/dl)	18,80 ± 1,35	21,99 ± 1,95	0,2089
Colesterol total (mg/dl)	27,63 ± 1,08	26,45 ± 1,32	0,5068
Colesterol HDL (mg/dl)	17,35 ± 1,70	16,15 ± 1,34	0,5820
Colesterol LDL (mg/dl)	6,53 ± 1,21	5,91 ± 1,66	0,5387
<b>Transaminasas Hepáticas</b>			
GOT(AST) (U/l)	20,10 ± 2,66	29,00 ± 3,07	0,0447*
GPT (ALT) (U/l)	20,23 ± 3,02	19,02 ± 2,32	0,7489
LDH (U/l)	220,83 ± 37,88	311,21 ± 54,67	0,2069
GGT (U/l)	21,28 ± 1,90	19,25 ± 1,44	0,3962
FA (U/l)	350,32 ± 62,10	275,09 ± 44,78	0,1802
<b>Variables endocrinas</b>			
Testosterona (ng/ml)	0,00 ± 0,001	0,04 ± 0,01	<0,0001***
Estradiol (pg/ml)	21,63 ± 2,70	51,30 ± 6,79	0,0012**
Insulina (µUI/ml)	11,69 ± 1,56	7,70 ± 1,04	0,0405*
IGF-I (ng/ml)	46,70 ± 4,10	35,65 ± 6,08	0,1643
IGF-II (ng/ml)	587,65 ± 10,79	521,64 ± 20,97	0,0071**
Adiponectina (pg/ml)	110,79 ± 2,69	97,09 ± 5,64	0,0172*
Cortisol (µg/l)	26,18 ± 2,73	18,26 ± 2,30	0,0501
Triiodotironina (T3) (nmol/l)	0,49 ± 0,06	0,49 ± 0,07	0,9870
Tiroxina (T4) (nmol/l)	105,32 ± 2,95	91,68 ± 6,54	0,0905
Relación T3/T4	0,46 ± 0,05	0,51 ± 0,05	0,4403
Relación Insulina/Glucosa	0,45 ± 0,13	0,40 ± 0,08	0,8845
Relación Insulina /IGF-I	0,29 ± 0,07	0,35 ± 0,09	0,8846
Relación IGF-I/Cortisol	1,92 ± 0,26	2,02 ± 0,33	0,8228
Relación IGF-II/Cortisol	24,07 ± 1,82	32,92 ± 3,68	0,0565

\*: Diferencia estadísticamente significativa al comparar entre grupos ( $0,05 > P > 0,01$ ), \*\*: Diferencia muy significativa al comparar las medias entre los grupos ( $0,01 > P > 0,001$ ), \*\*\*: Diferencia fuertemente significativa al comparar las medias entre grupos ( $0,001 > P$ ). Fuente: Elaboración propia.

Al comparar la concentración plasmática de algunas variables metabólicas no hubo diferencias entre los fetos-C y los fetos-T. Sin embargo, hubo un aumento en la transaminasa hepática aspartato-aminotransferasa en el grupo de fetos-T. De la misma forma, la administración de testosterona a las ovejas gestantes se tradujo en un aumento significativo en la concentración plasmática de esta hormona en los fetos-T, como así también en la concentración plasmática de estradiol. Además, en los fetos-T hubo una disminución en la concentración plasmática de insulina, IGF-II y adiponectina, y la concentración plasmática de cortisol y tiroxina tendió a disminuir en este grupo (Tabla 3).

La concentración plasmática de testosterona en la madre tendió a correlacionarse con la concentración de testosterona ( $r=0,2535$ ;  $P=0,095$ ) e insulina ( $r=0,5097$ ;  $P=0,0931$ ) plasmática en los fetos-T. De la misma forma, hubo una correlación significativa entre la concentración plasmática de testosterona en la madre-T con la concentración plasmática de glucosa ( $r=0,7944$ ;  $P=0,0030$ ), IGF-I ( $r=0,6784$ ;  $P=0,0183$ ) y cortisol ( $r=0,7611$ ;  $P=0,0058$ ) en el feto-T. En cambio, la concentración plasmática de testosterona en el feto-T presentó una tendencia a correlacionarse con la concentración plasmática de insulina ( $r=0,5390$ ;  $P=0,0706$ ), IGF-I ( $r=0,5419$ ;  $P=0,0687$ ) y cortisol ( $r=0,5498$ ;  $P=0,0671$ ).

Al comparar el efecto de la exposición prenatal a testosterona en fetos hembra sobre algunas medidas zométricas, se observó una masculinización del genital debido a los efectos androgénicos de la testosterona, ya que se presentó una estructura similar a un escroto (pseudoescroto) y un aumento en la longitud de la uretra (apertura genital). Así, la distancia entre el ano y la apertura genital fue significativamente mayor en los fetos-T y disminuyó la distancia entre la apertura genital y el ombligo debido al alargamiento de la uretra (Tabla 4).

Tabla 4: Comparación de registros zoométricos y peso de órganos en fetos-C y fetos-T hembra ovinos a los 120 días de gestación.

<b>Variab</b> les	<b>Fetos-C</b>	<b>Fetos-T</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Zoometría</b>			
Largo total (cm)	52,22 ± 1,20	48,90 ± 1,52	0,1180
Largo parcial (cm)	38,34 ± 0,77	36,43 ± 1,03	0,1656
Largo del fémur (cm)	8,18 ± 0,32	7,70 ± 0,34	0,3187
Altura de la cruz (cm)	31,23 ± 0,54	29,70 ± 1,15	0,2717
Ancho de la grupa (cm)	8,90 ± 0,25	8,68 ± 0,36	0,6420
Perímetro torácico (cm)	27,22 ± 0,51	27,00 ± 0,96	0,8503
Espacio interparietal (cm)	9,79 ± 0,28	9,28 ± 0,29	0,2277
Distancia ano-pseudoescroto (cm)	-	6,55 ± 0,34	-
Distancia escroto-apertura vulvar (cm)	-	3,67 ± 0,63	-
Distancia ano-apertura vulvar (cm)	1,15 ± 0,05	10,22 ± 0,92	<0,0001***
Distancia apertura genital-ombli	13,03 ± 0,42	6,47 ± 0,75	<0,0001***
Peso feto (kg)	2,16 ± 0,10	2,08 ± 0,22	0,7413
<b>Peso órganos</b>			
Corazón (g)	14,92 ± 1,09	14,33 ± 1,38	0,7458
Pulmón (g)	65,68 ± 3,67	63,43 ± 5,33	0,7420
Páncreas (g)	1,93 ± 0,10	1,86 ± 0,14	0,6846
Hígado (g)	70,77 ± 3,55	73,51 ± 7,32	0,7555
Riñón derecho (g)	7,02 ± 0,39	6,95 ± 0,55	0,9210
Riñón izquierdo (g)	7,10 ± 0,36	6,96 ± 0,60	0,8401
Glándula adrenal derecha (g)	0,16 ± 0,009	0,13 ± 0,007	0,0287*
Glándula adrenal izquierda (g)	0,15 ± 0,013	0,13 ± 0,010	0,2288
Glándula pineal (g)	0,006 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,2851
Hipófisis (g)	0,077 ± 0,003	0,076 ± 0,007	0,9267
Encéfalo (g)	35,16 ± 0,99	30,86 ± 2,12	0,0986
Ovario derecho (g)	0,025 ± 0,002	0,022 ± 0,001	0,1823
Ovario izquierdo (g)	0,026 ± 0,002	0,021 ± 0,002	0,0483*

\*: Diferencia estadísticamente significativa al comparar entre grupos (0,05>P>0,01), \*\*: Diferencia muy significativa al comparar las medias entre los grupos (0,01>P>0,001), \*\*\*: Diferencia

fuertemente significativa al comparar las medias entre grupos ( $0,001 > P$ ). Fuente: Elaboración propia.

Al correlacionar los distintos registros zoométricos en los fetos hembras se evidenció que la exposición prenatal a un exceso de testosterona provocó que varias de estas medidas se correlacionaran lo que generó una mayor proporcionalidad entre las distintas variables registradas. En cambio en los fetos-C hubo una menor correlación entre estos registros, entre ellos: Largo total/largo del fémur, largo total/ancho de la grupa y ancho de la grupa/alzada (Tabla 5).

Tabla 5: Correlación entre registros zoométricos en fetos-C y fetos-T de 120 días de gestación.

	P	LT	LP	LF	A	AG	PT	EP	DAPE	DAAG	DAGO
P		**	***	***	***	0,08	***	-	*	-	-
LT	**		***	0,07	*	-	*	-	0,053	-	-
LP	***	***		*	*	0,06	*	*	0,088	0,088	-
LF	***	-	*		***	0,058	*	-	-	-	0,054
A	***	*	*	***		-	***	0,054	0,054	-	-
AG	***	-	0,06	0,057	***		***	***	***	-	*
PT	-	*	**	*	***	-		-	*	-	-
EP	***	**	0,053	0,080	-	0,054	***	*	*	-	-
DAPE	**	*	**	***	**	***	*	*	*	**	-
DAAG	-	-	-	0,054	-	-	-	-	**		**
DAGO	-	-	-	-	-	**	-	-	-	**	

P: peso corporal; LT: largo total (extremo anterior del cartílago nasal hasta la base de la cola); PT: largo parcial (tuberosita occipital hasta la base de la cola); LF: largo del fémur (borde superior del trocánter mayor hasta porción distal del cóndilo lateral del fémur); A: Alzada (extremo distal de la pezuña del miembro anterior hasta el borde superior de la escápula), AG: ancho de la grupa (espacio comprendido entre ambos tuber coxal de la pelvis); PT: Perímetro torácico (perímetro del tórax registrado a nivel de la quinta-sexta vértebra torácica); EP: espacio parietal (distancia registrada entre ambos parietales a nivel

de los procesos cigomáticos); DAPE: distancia ano pseudoescroto (distancia comprendida entre el centro de la apertura anal y la parte media del pseudoescroto presente en las hembras-T); DAAG: distancia ano apertura genital (longitud comprendida entre el centro de la apertura del ano y el borde posterior de la apertura genital) y DAGO: distancia apertura genital-ombiligo (longitud determinada desde el borde anterior de la apertura genital y el borde posterior del cordón umbilical desde su emergencia a través de la piel). Borde superior izquierdo (azul) de las casillas correlación entre variables en fetos-C, borde inferior derecho (rojo) correlación entre las variables en fetos-T. (-): No hay correlación entre las variables, \*: Diferencia estadísticamente significativa al comparar entre grupos ( $0,05 > P > 0,01$ ); \*\*: Diferencia muy significativa al comparar las medias entre los grupos ( $0,01 > P > 0,001$ ), \*\*\*: Diferencia fuertemente significativa al comparar las medias entre grupos ( $0,001 > P$ ). Fuente: Elaboración propia.

## **Efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la sensibilidad a insulina en ovejas peripuberales de 26 semanas de edad**

### **Peso y variables endocrino-metabólicas**

En la tabla 6 se presentan los resultados de las variables endocrinas y metabólicas determinadas en esta etapa.

Al comparar el peso corporal entre los grupos experimentales de hembras estos fueron similares, de la misma forma que las variables metabólicas y endocrinas. Sin embargo, la concentración plasmática de progesterona fue significativamente mayor en el grupo de hembras-C durante el primer TTGEV en comparación a las hembras-T. En cambio sólo hubo una tendencia, en el grupo de hembras-T, a presentar una concentración plasmática menor de IGF-I en relación a las hembras-C (Tabla 6).



Tabla 6: Peso y variables endocrinas plasmáticas en hembras-C y hembras-T peripuberales (26 semanas de edad).

Variable	Hembras-C	Hembras-T	Valor de P
Peso (kg)	27,18 ± 1,08	25,14 ± 1,57	0,3118
Glucosa (mg/dl)	65,64 ± 2,78	61,20 ± 2,87	0,2778
PPT (mg/dl)	7,12 ± 0,29	7,19 ± 0,39	0,8885
Triglicéridos (mg/dl)	15,38 ± 1,54	18,98 ± 1,48	0,1008
Colesterol total (mg/dl)	51,99 ± 2,03	54,43 ± 2,11	0,4113
Colesterol HDL (mg/dl)	35,00 ± 1,39	33,53 ± 0,99	0,3909
Colesterol LDL (mg/dl)	14,22 ± 1,27	17,11 ± 1,63	0,1750
Estradiol (pg/ml)	9,33 ± 0,97	7,23 ± 0,45	0,1296
Progesterona (ng/ml)	0,95 ± 0,08	0,71 ± 0,03	0,0021**
Testosterona (ng/ml)	0,023 ± 0,0004	0,024 ± 0,0006	0,9252
Cortisol (µg/l)	29,92 ± 3,33	28,54 ± 3,43	0,7773
Insulina (µUI/ml)	14,36 ± 1,55	15,49 ± 1,97	0,7553
Triiodotironina (nmol/l)	1,11 ± 0,10	1,27 ± 0,12	0,3113
Tiroxina (nmol/l)	59,99 ± 3,19	50,51 ± 3,99	0,2175
IGF-I (ng/ml)	79,23 ± 14,89	45,20 ± 6,47	0,0930
IGF-II (ng/ml)	168,9 ± 16,57	150,5 ± 25,87	0,5926
Adiponectina (pg/ml)	112,9 ± 1,71	112,0 ± 1,42	0,5442
Melatonina (pg/ml)	4,25 ± 0,88	4,43 ± 0,77	0,8364

\*\* : Diferencia muy significativa al comparar las medias entre los grupos (0,01>P>0,001).

Fuente: Elaboración propia.

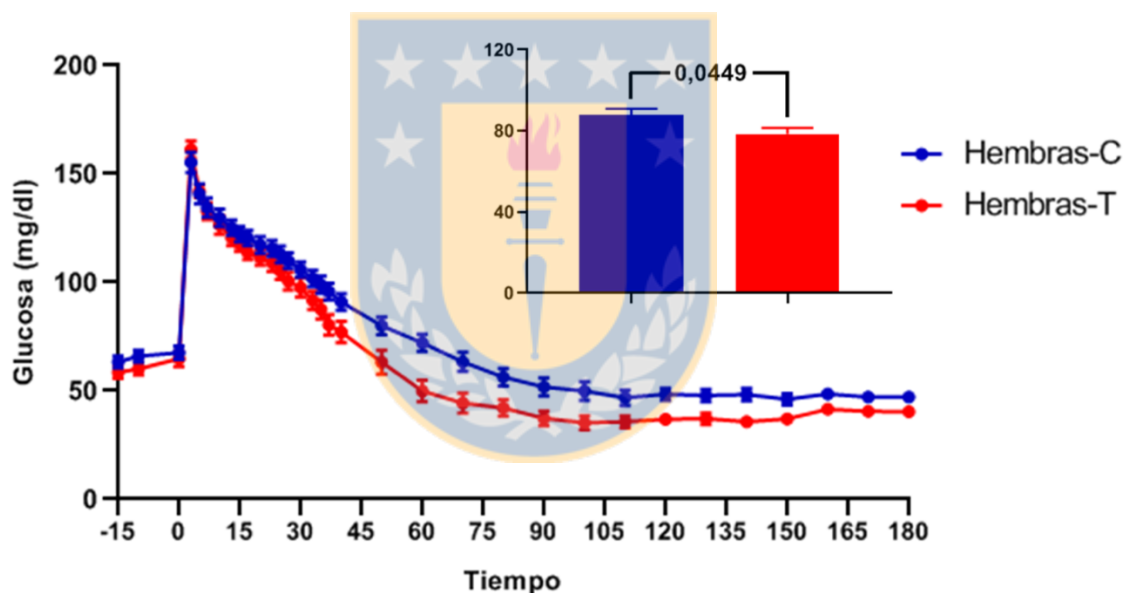
### **Dinámica de la concentración plasmática de glucosa durante el primer TTGEV (26 semanas de edad).**

La concentración plasmática de glucosa se incrementó agudamente tras el término de la infusión de esta (primeros dos minutos) alcanzando una concentración máxima de 155,4 ±

4,8 mg/dl en el grupo de hembras-C y  $161,3 \pm 4,0$  mg/dl en el grupo de hembras-T ( $P=0,1277$ ; Gráfico 11).

El comportamiento de la concentración plasmática de glucosa TTGEV fue semejante entre los grupos experimentales presentando una dinámica, concentración máxima y tiempo máximo similares. Sin embargo, el promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el test (T3-T180) fue mayor en el grupo de hembras-C respecto al grupo de hembras-T ( $87,76 \pm 3,20$  mg/dl versus  $78,45 \pm 2,98$  mg/dl, respectivamente).

Gráfico 11: Dinámica y promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el primer TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 26 semanas de edad.

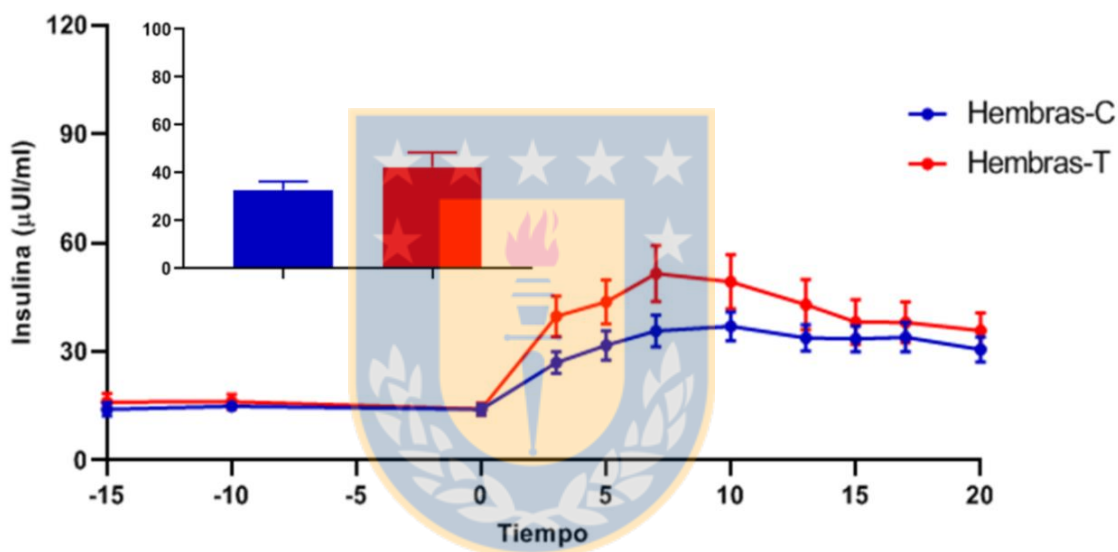


### **Dinámica de la concentración plasmática de insulina durante el primer TTGEV.**

El promedio de la concentración plasmática de insulina durante el test a la glucosa endovenosa no presentó diferencias entre los grupos de estudio durante los tiempos evaluados (Gráfico 12). La concentración promedio de insulina en las hembras-C fue  $32,89 \pm 3,50$   $\mu$ UI/ml y  $42,41 \pm 6,14$   $\mu$ UI/ml en las hembras-T ( $P=0,1918$ ). Asimismo, el promedio de la concentración máxima de insulina durante el TTGEV fue  $53,26 \pm 7,74$

$\mu\text{UI/ml}$  en las hembras-T y  $38,62 \pm 4,16 \mu\text{UI/ml}$  en las hembras-C, siendo similar al comparar entre grupos ( $P=0,1100$ ). El tiempo en el que se presentó esta concentración máxima de insulina fue entre los minutos 7 (T7) y 10 (T10), tras el inicio de la administración de la glucosa, en ambos grupos durante el TTGEV.

Gráfico 12: Dinámica de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV y promedio de la concentración de insulina tras la administración de glucosa en hembras-C y hembras-T a las 26 semanas de edad.

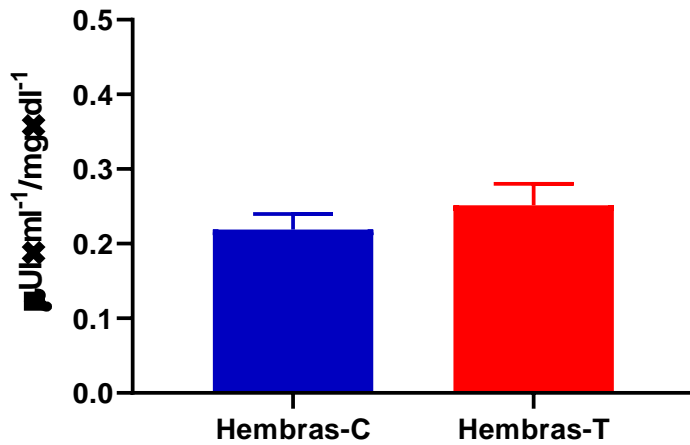


## Índices de Sensibilidad a la Insulina

### Relación Insulina/Glucosa Basal

La relación insulina/glucosa basal fue similar al comparar entre grupos experimentales ( $P=0,2913$ ), siendo  $0,22 \pm 0,02 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} / \text{mg} \times \text{dl}^{-1}$  para las hembras-C y  $0,25 \pm 0,03 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} / \text{mg} \times \text{dl}^{-1}$  para el grupo de hembras-T (Gráfico 13).

Gráfico 13: Relación insulina/glucosa basal durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T de 26 semanas de edad.

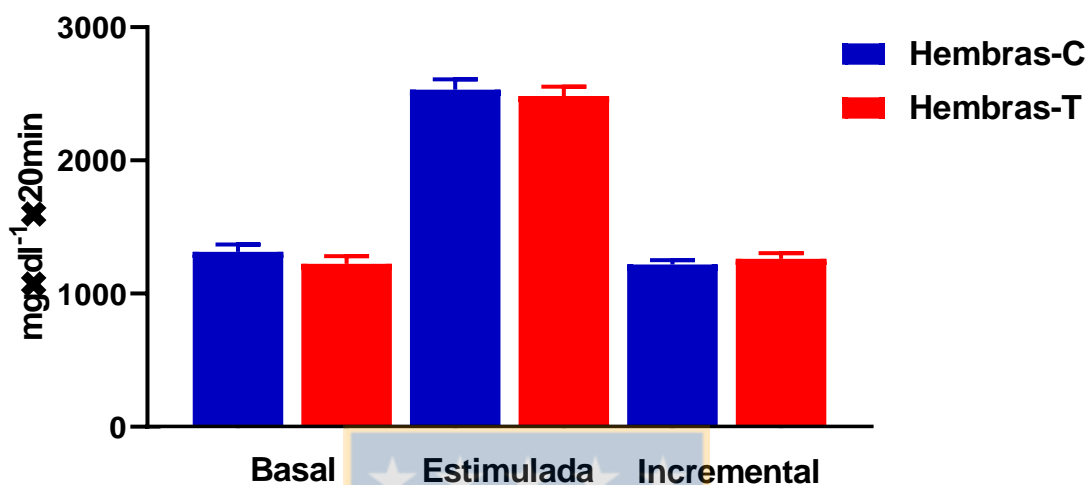


**Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración de glucosa durante el TTGEV.**

El ABC basal de la concentración plasmática de glucosa fue similar entre los grupos, siendo  $1312,87 \pm 55,65 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20 \text{ min}$  en las hembras-C y  $1223,94 \pm 57,34 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20 \text{ min}$  en las hembras-T ( $P=0,2778$ ; Gráfico 14).

Cuando se administró la glucosa en el tiempo 0 del TTGEV, el ABC estimulada aumentó en ambos grupos alcanzando un valor de  $2532,24 \pm 77,69 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20 \text{ min}$  en el grupo control y  $2484,59 \pm 68,25 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20 \text{ min}$  en las hembras EPT. Esta diferencia no fue significativa al comparar ambos grupos ( $P=0,7553$ ). El ABC incremental, que considera la diferencia entre el área bajo la curva estimulada y basal, no presentó diferencias al comparar el grupo de hembras-C con el grupo de hembras-T,  $1219,36 \pm 32,44 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20 \text{ min}$  versus  $1260,64 \pm 41,88 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20 \text{ min}$ , respectivamente ( $P=0,4441$ ).

Gráfico 14: Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 26 semanas de edad.

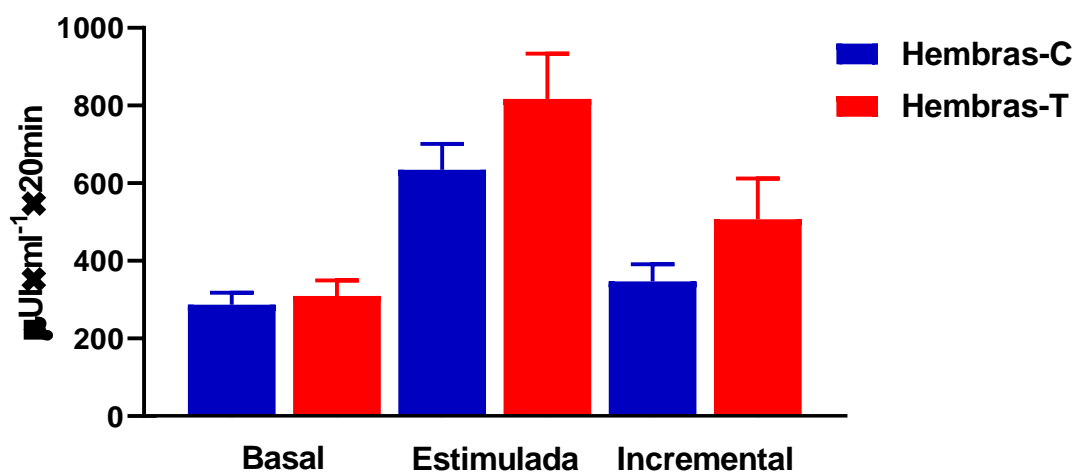


#### Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV

El ABC basal de la concentración de insulina fue  $287,14 \pm 30,93 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  en el grupo de hembras-C, en cambio en el grupo de hembras-T fue  $309,79 \pm 39,41 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$ , lo que fue similar al comparar ambos grupos ( $P=0,7553$ ). La administración de glucosa estimuló la secreción de insulina provocando un incremento en la secreción de esta hormona alcanzando un ABC estimulada en las hembras-C de  $634,23 \pm 67,17 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  y en el grupo de hembras-T de  $817,19 \pm 116,80 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  (Gráfico 15); no obstante, no hubo diferencia al comparar esta variable entre los grupos de estudio ( $P=0,1882$ ).

El ABC incremental fue similar entre los grupos durante el primer TTGEV ( $P=0,1715$ ) al comparar las hembras-C con las hembras-T, siendo  $347,09 \pm 44,27$  y  $507,40 \pm 104,40 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$ , respectivamente.

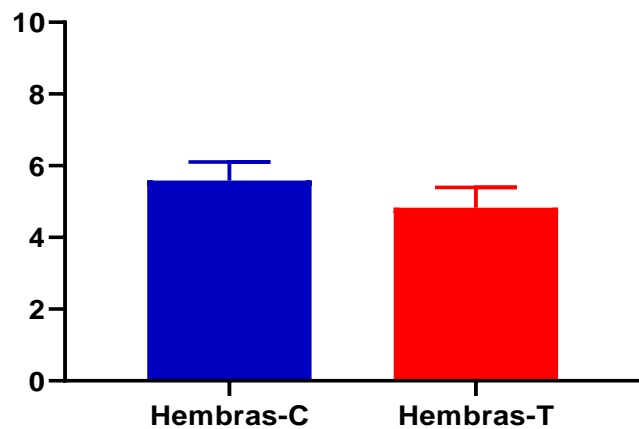
Gráfico 15: Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina durante el primer TTGEV.



### ISI-Composite

El ISI-Composite fue similar entre los grupos de hembras experimentales ( $P=0,3318$ ). En el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona fue  $4,83 \pm 0,56$  y en el grupo de hembras control fue  $5,59 \pm 0,52$  (Gráfico 16).

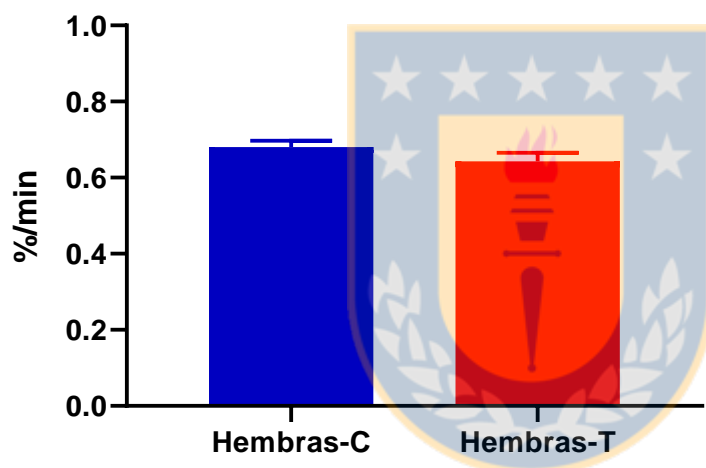
Gráfico 16: ISI-Composite durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 26 semanas de edad.



## ISI-Grulet

La administración de glucosa provocó una liberación de insulina que generó una disminución de la concentración de glucosa, reflejando la eficacia de la insulina al realizar su efecto (Gráfico 17). El ISI-Grulet en el grupo de hembras-C fue  $0,68 \pm 0,02$  %/min, en cambio en el grupo de hembras-T fue  $0,64 \pm 0,02$  %/min, lo que no presentó diferencias al comparar entre grupos ( $P=0,2020$ ).

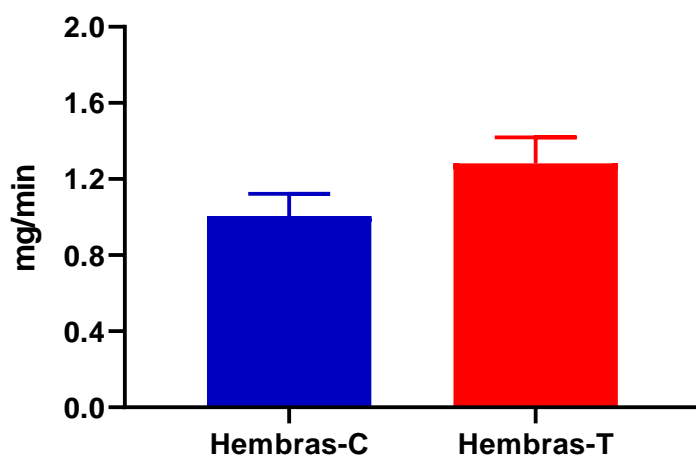
Gráfico 17: ISI-Grulet o constante de utilización de la glucosa durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 26 semanas de edad.



## Tasa de Desaparición de la glucosa

Tras la administración de insulina, a los 20 minutos del inicio de la infusión de glucosa a través del catéter, se presentó una disminución en la concentración plasmática de glucosa, esta tendió a ser mayor en el grupo de hembras-T ( $P=0,0780$ ) al compararlas con las hembras-C, siendo respectivamente para cada grupo  $1,28 \pm 0,14$  mg/min y  $1,01 \pm 0,12$  mg/min (Gráfico 18).

Gráfico 18: Tasa de desaparición de la glucosa durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 26 semanas de edad.



Al correlacionar los distintos índices de sensibilidad a la insulina con la variable índice de androgenización, valor resultante del cociente entre la longitud de la uretra (distancia ano-apertura genital) y el largo parcial de las hembras, no se determinaron correlaciones significativas entre los distintos registros e índices evaluados.

### **Efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la sensibilidad a insulina en ovejas a las 30 semanas de edad**

#### **Peso y variables endocrinas**

A las 30 semanas de edad el peso de las hembras-C y de las hembras-T fue similar. Asimismo, un día antes se realizó a cada hembra una ecografía para evaluar la morfología ovárica y llevar a cabo los test de tolerancia a la glucosa endovenosa durante la fase folicular, esta fase del ciclo ovárico se confirmó por una concentración plasmática de progesterona menor a 1,0 ng/ml en ambos grupos (Tabla 7). De la misma forma, la concentración plasmática de testosterona y estradiol fue similar en el grupo de hembras-T al compararlas con las hembras-C.



Tabla 7: Peso corporal y variables endocrinas seleccionadas en hembras-C y hembras-T a las 30 semanas de edad.

<b>Variables</b>	<b>Hembras-C</b>	<b>Hembras-T</b>	<b>Valor de P</b>
Peso (kg)	28,01 ± 1,68	32,01 ± 1,71	0,1190
<b>Variables endocrinas</b>			
Testosterona (ng/ml)	0,015 ± 0,001	0,019 ± 0,004	0,8485
Estradiol (pg/ml)	12,27 ± 2,36	7,81 ± 0,90	0,1088
Melatonina (pg/ml)	4,12 ± 0,77	2,89 ± 0,50	0,1905
Progesterona (ng/ml)	0,90 ± 0,06	0,84 ± 0,12	0,6657

Fuente: Elaboración propia.

### **Dinámica de la concentración plasmática de glucosa durante el segundo TTGEV**

Durante el segundo TTGEV la dinámica de la concentración plasmática de glucosa fue similar entre los grupos experimentales. El promedio de la concentración plasmática de glucosa en las hembras-C fue  $84,10 \pm 4,05$  mg/dl y en las hembras-T fue  $78,35 \pm 3,64$  mg/dl, sin diferencias entre los grupos ( $P=0,1320$ ). Tras la administración de glucosa, desde la extracción de la muestra basal (T0) hasta los primeros 2 minutos del TTGEV, se presentó un aumento agudo en la concentración de este azúcar en el plasma alcanzándose en los dos grupos la concentración máxima a los 3 minutos (T3), esta concentración alcanzó los  $173,81 \pm 10,56$  mg/dl en las hembras-C y  $153,32 \pm 5,12$  mg/dl en las hembras-T (Gráfico 19), siendo igual esta variable al comparar entre los grupos experimentales ( $P=0,1114$ ).

### **Dinámica de la concentración plasmática de insulina durante el segundo TTGEV**

La dinámica de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV presentó un incremento mayor en el grupo de hembras-T en comparación a las hembras-C (Gráfico 20). La variabilidad que se presentó en el grupo expuesto prenatalmente a un exceso de testosterona produce que, al realizar la comparación estadística, no se evidencien diferencias entre los grupos en cada uno de los tiempos en los que se llevó a cabo la comparación ( $P>0,05$ ). La administración de glucosa produjo un incremento en la secreción de insulina que se evidenció por una mayor concentración plasmática de insulina desde el

T3 al T20 en ambos grupos, al compararlas con las condiciones basales. Al comparar el promedio de la concentración de insulina durante el TTGEV tras la administración de glucosa, esta variable no presentó diferencias entre los grupos siendo  $35,14 \pm 7,38 \mu\text{UI/ml}$  en las hembras-C y  $61,16 \pm 15,69 \mu\text{UI/ml}$  en las hembras-T ( $P=0,1643$ ). La concentración máxima de insulina en las hembras control fue  $41,20 \pm 8,72 \mu\text{UI/ml}$  y en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona fue  $61,16 \pm 15,69 \mu\text{UI/ml}$  que fue semejante entre los grupos ( $P=0,1175$ ) y se alcanzó, en promedio, entre los 7 y 10 minutos de iniciada la infusión de glucosa (T0) en ambos grupos experimentales ( $P=0,8701$ ).

Gráfico 19: Dinámica de la concentración plasmática de glucosa y promedio de la concentración de glucosa durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 30 semanas de edad.

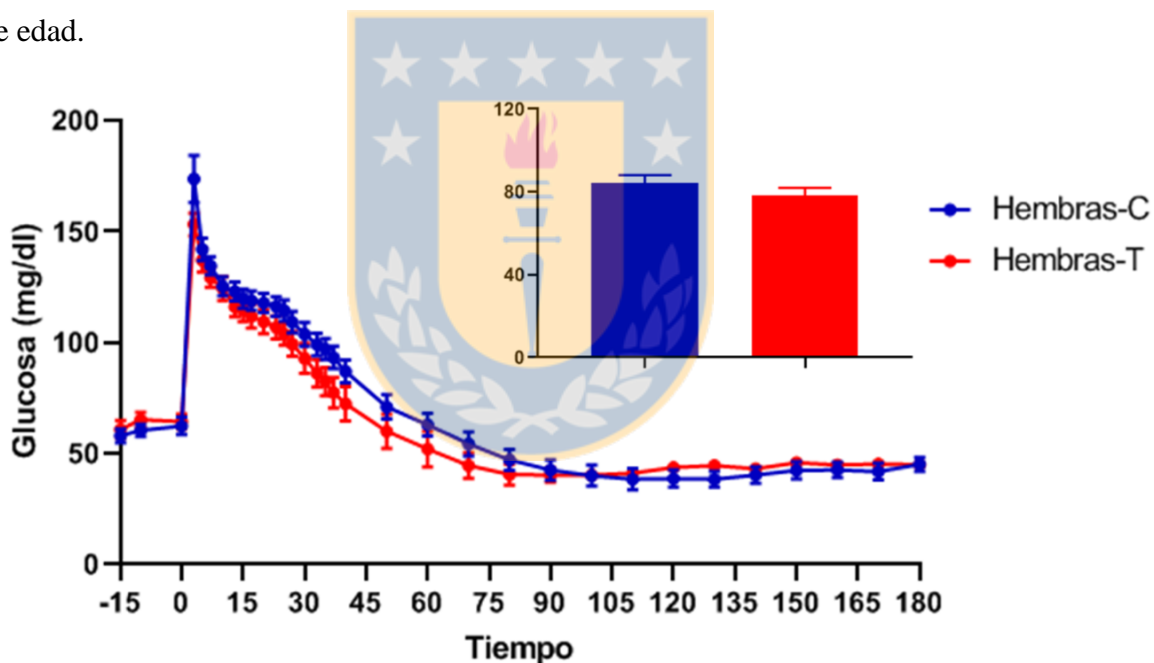
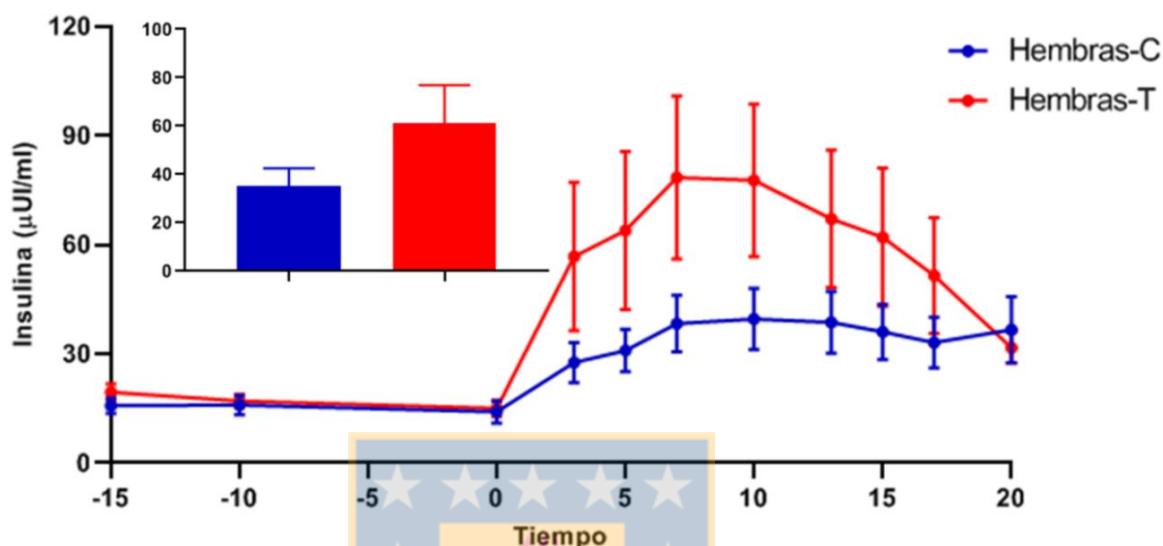


Gráfico 20: Dinámica de la concentración plasmática de insulina y promedio de la concentración plasmática de insulina durante el segundo TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 30 semanas de edad.

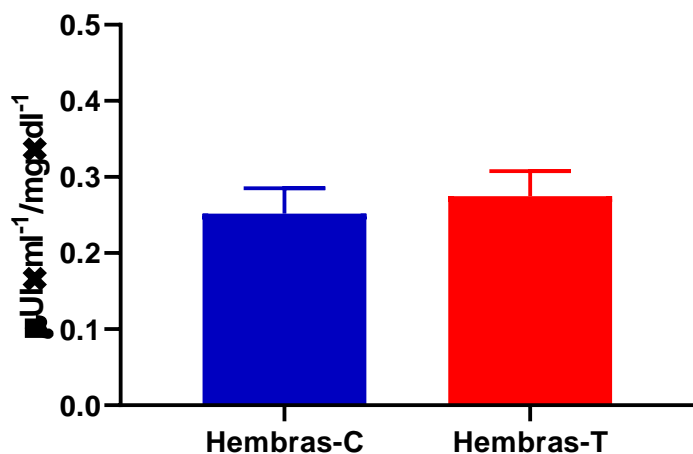


### Índices de Sensibilidad a la Insulina

#### Relación Insulina/Glucosa Basal

La relación insulina/glucosa basal no presentó diferencias entre los grupos experimentales ( $P=0,6365$ ) siendo  $0,25 \pm 0,03 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} / \text{mg} \times \text{dl}^{-1}$  en el grupo de hembras control y  $0,27 \pm 0,03 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} / \text{mg} \times \text{dl}^{-1}$  en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 30 semanas de edad, periodo de desarrollo somático considerado como post-puberal temprano (Gráfico 21).

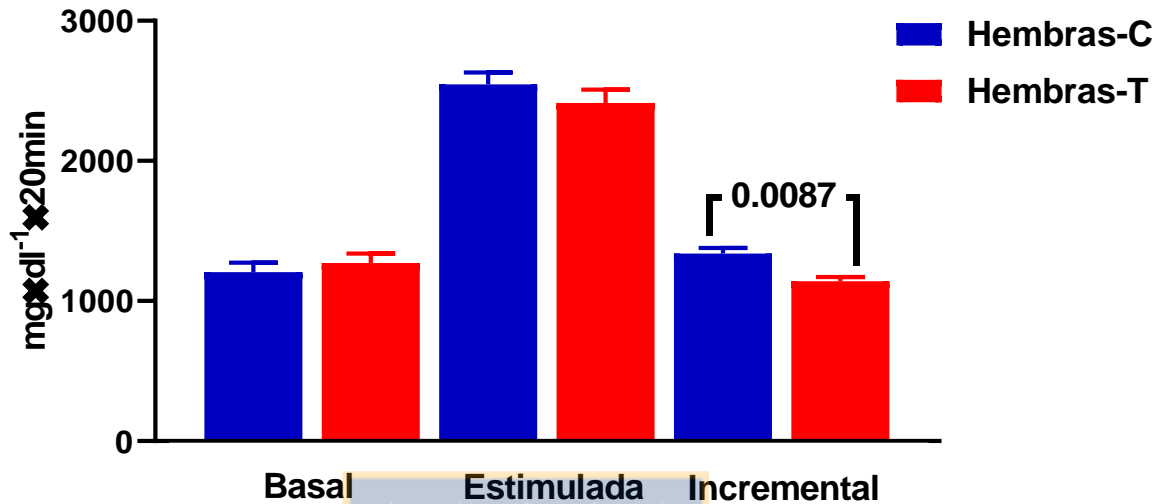
Gráfico 21: Relación insulina/glucosa basal durante el segundo TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 30 semanas de edad.



#### Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa durante el segundo TTGEV

El ABC basal de la concentración plasmática de glucosa fue similar entre los grupos, siendo  $1206,92 \pm 65,98 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20 \text{ min}$  en las hembras-C y  $1272,31 \pm 662,9 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20 \text{ min}$  en las hembras-T ( $P=0,3939$ ). Tras la administración de glucosa la concentración plasmática de ésta aumentó, por lo que el ABC estimulada se incrementó en ambos grupos alcanzando un valor de  $2546,56 \pm 84,30 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20 \text{ min}$  en las hembras-C y  $2414,65 \pm 92,95 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20 \text{ min}$  en las hembras-T (Gráfico 22), esta diferencia no fue significativa al realizar la comparación entre los grupos ( $P=0,2403$ ). Sin embargo, el ABC incremental de la glucosa fue significativamente menor en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona al compararlas con las hembras del grupo control, siendo  $1142,35 \pm 28,75 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20 \text{ min}$  y  $1339,64 \pm 39,47 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20 \text{ min}$ , respectivamente ( $P=0,0087$ ).

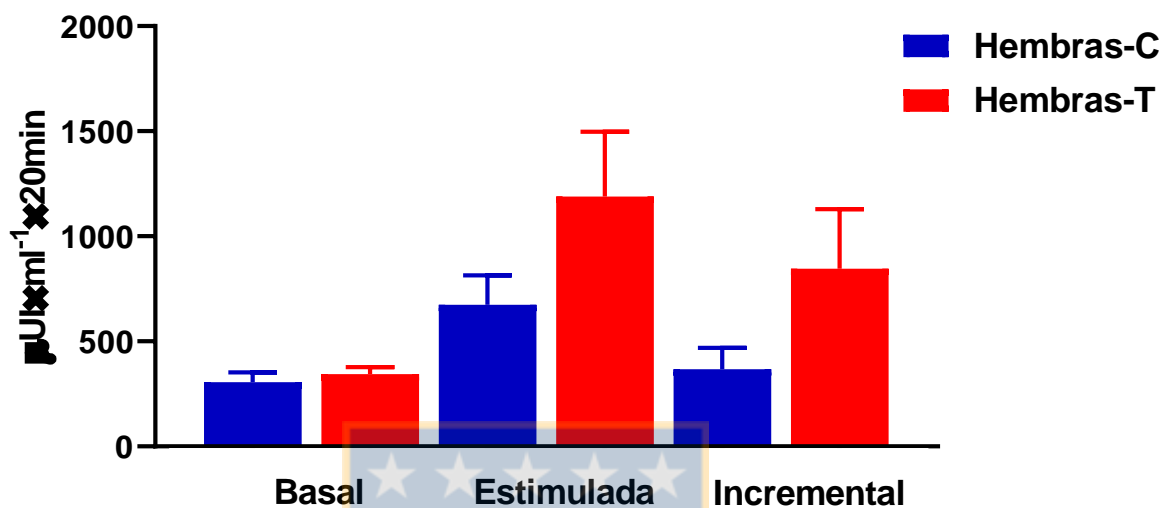
Gráfico 22: Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa durante el segundo TTGEV en hembras-C y hembras-T.



**Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina durante el segundo TTGEV en el periodo post-puberal temprano**

El ABC basal de la concentración plasmática de insulina fue  $305,46 \pm 46,51 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  en el grupo de hembras-C y en las hembras-T fue  $343,45 \pm 33,44 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$ , lo que fue similar al comparar ambos grupos ( $P=0,5223$ ). El ABC estimulado de la concentración plasmática de insulina, tras la administración de glucosa, aumentó alcanzando un valor de  $673,50 \pm 139,80 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  en las hembras-C y, en el grupo de hembras-T, los  $1189,92 \pm 307,90 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  (Gráfico 23). Sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa al comparar esta variable entre los grupos de estudio ( $P=0,1578$ ). El ABC incremental fue comparable entre los grupos durante el segundo TTGEV ( $P=0,1411$ ), siendo  $368,04 \pm 100,80 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  en las hembras-C y  $846,47 \pm 281,90 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  en las hembras-T.

Gráfico 23: Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina durante el segundo TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 30 semanas de edad.



#### ISI-Composite

El ISI-Composite fue  $5,81 \pm 1,08$  en el grupo de hembras-C y  $4,07 \pm 0,63$  en las hembras-T (Gráfico 24). Al comparar este valor entre los grupos experimentales no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $P=0,1918$ ).

#### ISI-Grulet

Esta variable fue significativamente menor en el grupo de hembras-T ( $0,60 \pm 0,02$  %/min) al compararlas con el grupo de hembras-C ( $0,69 \pm 0,02$  %/min) durante el TTGEV ( $P=0,0260$ , Gráfico 25).

Gráfico 24: ISI-Composite durante el segundo TTGEV en hembras-T y hembras-C a las 30 semanas de edad.

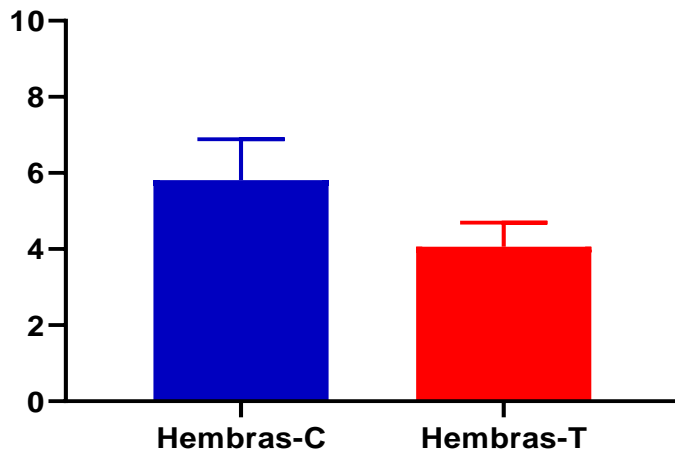
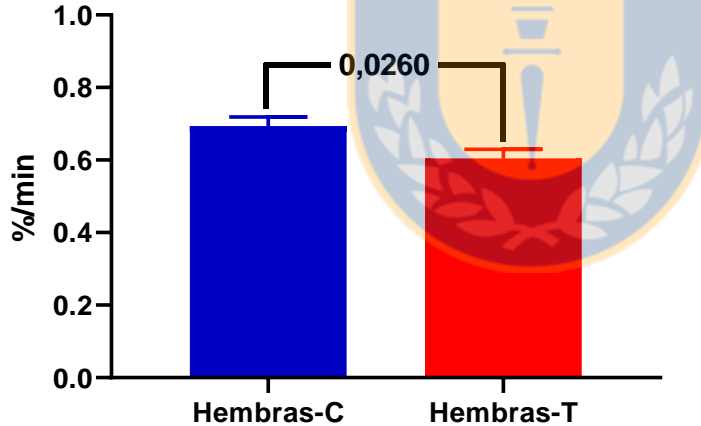


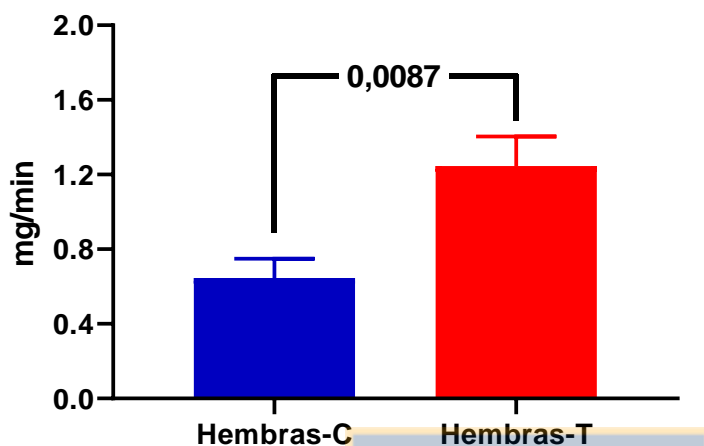
Gráfico 25: ISI-Grulet o constante de utilización de la glucosa durante el segundo TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 30 semanas de edad.



### Tasa de Desaparición de la glucosa

Las hembras-T presentaron una tasa de desaparición de la glucosa significativamente mayor que las hembras-C ( $P=0,0087$ ). En las hembras control este índice fue  $0,65 \pm 0,10$  mg/min, en cambio en las hembras EPT fue  $1,25 \pm 0,16$  mg/min (Gráfico 26).

Gráfico 26: Tasa de desaparición de la glucosa durante el segundo TTGEV realizado en la etapa post-puberal temprana en borregas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.



**Sensibilidad a la insulina en hembras ooforectomizadas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 30 semanas de edad**

### **Peso y variables endocrinas**

Durante el segundo estudio, es decir, la evaluación de la sensibilidad a la insulina en hembras ovinas postpuberales tempranas de 30 semanas de edad, ooforectomizadas a las 26 semanas de edad, con el objeto de estudiar el efecto de los esteroides endógenos de origen ovárico sobre la sensibilidad a la insulina, no se evidenciaron diferencias en el peso corporal como así también en la concentración plasmática de estradiol, progesterona y testosterona durante esta etapa (Tabla 8).



Tabla 8: Peso y concentración plasmática de esteroides sexuales en hembras-C y hembras-T de 30 semanas de edad ooforectomizadas.

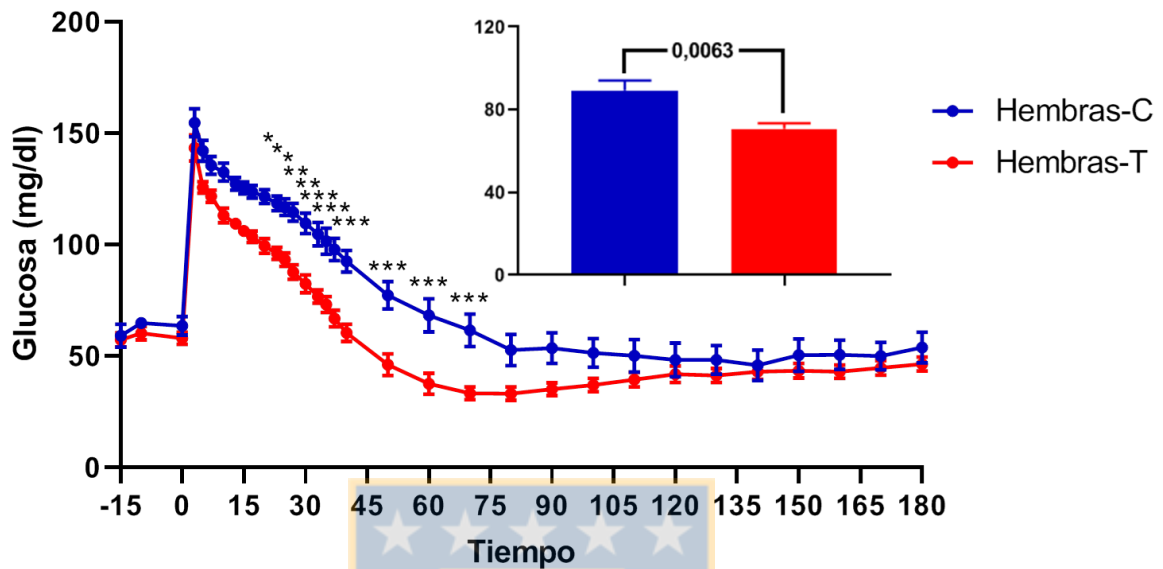
<b>Variables</b>	<b>Hembras-C</b>	<b>Hembras-T</b>	<b>Valor de P</b>
Peso (kg)	27,33 ± 1,14	26,29 ± 1,05	0,5156
<b>Variables endocrinas</b>			
Testosterona (ng/ml)	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,003	>0,9999
Estradiol (pg/ml)	3,96 ± 0,82	3,93 ± 0,48	0,6061
Progesterona (ng/ml)	0,74 ± 0,14	0,69 ± 0,07	0,7557

Fuente: Elaboración propia.

### **Dinámica de la concentración plasmática de glucosa**

La concentración plasmática basal de glucosa fue similar ( $P > 0,9999$ ) al comparar el grupo de hembras control ( $62,41 \pm 3,81$  mg/dl) con el grupo de hembras expuestas a un exceso de testosterona ( $58,44 \pm 2,94$  mg/dl). Durante el TTGEV, tras la infusión de glucosa se presentó un aumento agudo en la concentración plasmática de este carbohidrato a los 3 minutos de iniciada la infusión en ambos grupos ( $P = 1,0000$ ), alcanzando una concentración máxima de  $154,67 \pm 6,33$  mg/dl en las hembras-C y  $143,29 \pm 5,86$  mg/dl en las hembras-T ( $P = 0,2165$ , Gráfico 27). Sin embargo, el promedio de la concentración plasmática de glucosa fue significativamente mayor en el grupo de hembras-C al compararlas con las hembras-T ( $P = 0,0063$ ), siendo  $89,32 \pm 4,70$  mg/dl y  $70,76 \pm 2,63$  mg/dl, respectivamente. Al comparar entre ambos grupos en los distintos tiempos, se observó que la concentración plasmática de glucosa fue significativamente mayor en el grupo de hembras-C en los tiempos T20 ( $P = 0,0245$ ), T23 ( $P = 0,0222$ ), T25 ( $P = 0,0111$ ), T27 ( $P = 0,0016$ ), T30 ( $P = 0,0014$ ), T33 ( $P = 0,0008$ ), T35 ( $P = 0,0006$ ), T37 ( $P < 0,0001$ ), T40 ( $P < 0,0001$ ), T50 ( $P < 0,0001$ ), T60 ( $P = 0,0001$ ) y T70 ( $P = 0,0006$ ) con respecto a las hembras-T.

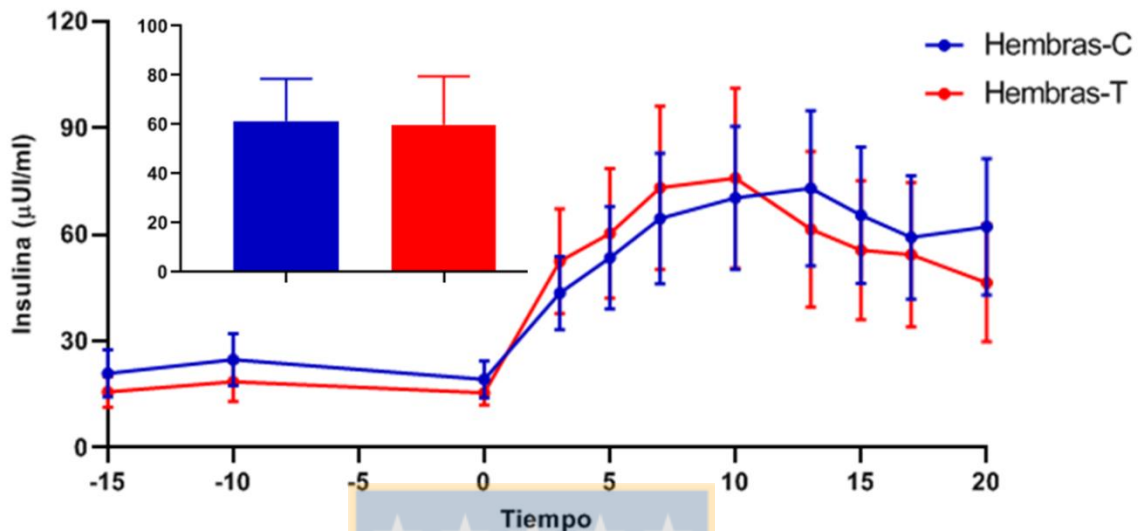
Gráfico 27: Dinámica y promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 30 semanas de edad.



### Dinámica de la concentración plasmática de insulina

El promedio de la concentración plasmática basal de insulina no presentó diferencias al comparar entre grupos ( $P=0,5156$ ), siendo  $27,33 \pm 1,14 \mu\text{UI/ml}$  en el grupo de hembras-C y  $26,29 \pm 1,05$  en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (Gráfico 28). Tras el inicio de la infusión de glucosa se presentó un incremento en la secreción de insulina en ambos grupos, siendo la media de la concentración máxima de insulina  $75,21 \pm 20,85 \mu\text{UI/ml}$  en el grupo de hembras control y  $78,50 \pm 25,46 \mu\text{UI/ml}$  en las hembras del grupo tratado ( $P=0,9372$ ), pero el tiempo en el cual se produce esta concentración máxima de insulina fue significativamente menor ( $P=0,0185$ ) en las hembras-T (T10) con respecto a las hembras-C (T13-T15). En relación al promedio de la concentración plasmática de insulina esta variable no presentó diferencias entre grupos ( $P=0,9372$ ) siendo  $61,46 \pm 17,07 \mu\text{UI/ml}$  en las hembras-C y  $59,97 \pm 19,55 \mu\text{UI/ml}$  en las hembras-T.

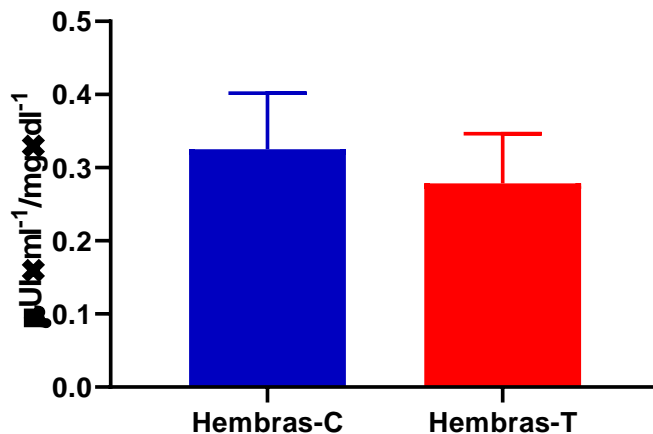
Gráfico 28: Dinámica y promedio de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 30 semanas de edad.



### Relación Insulina/Glucosa

La relación insulina/glucosa basal fue similar al comparar entre grupos ( $P=0,4848$ ), siendo  $0,33 \pm 0,08 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} / \text{mg} \times \text{dl}^{-1}$  en el grupo de hembras-C y  $0,28 \pm 0,07 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} / \text{mg} \times \text{dl}^{-1}$  en el grupo de hembras-T (Gráfico 29).

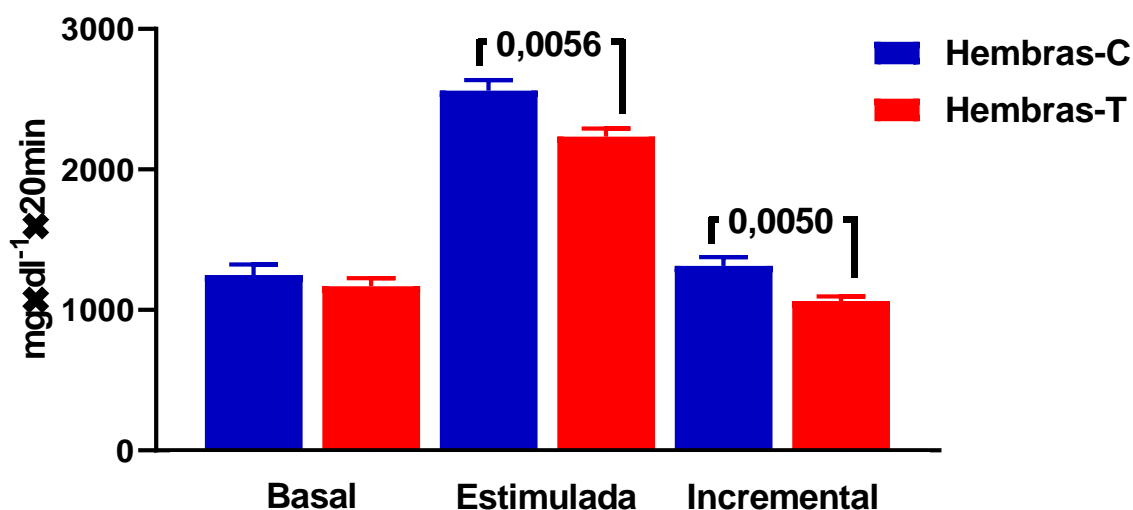
Gráfico 29: Relación insulina/glucosa basal en hembras ovinas ooforectomizadas de 30 semanas de edad expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona y control.



### Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa

El ABC basal de la concentración plasmática de glucosa fue similar entre ambos grupos ( $P > 0,9999$ ) siendo  $1248,13 \pm 76,11 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  en el grupo de hembras-C y  $1168,78 \pm 58,71 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  en el grupo de hembras-T. Tras la administración de glucosa, la concentración plasmática de este azúcar aumentó en ambos grupos, siendo significativamente mayor en el grupo de hembras control con respecto al grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona ( $P = 0,0056$ ), esta variable fue  $2562,36 \pm 73,00 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  y  $2233,34 \pm 58,56 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$ , respectivamente (Gráfico 30). La diferencia entre la sustracción del ABC estimulada y el ABC basal, el ABC incremental, fue significativamente mayor en el grupo de hembras control al compararlas con el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona ( $P = 0,0050$ ), siendo  $1314,22 \pm 62,35 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  en las hembras del grupo control y  $1064,56 \pm 31,30 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  en el grupo de hembras tratadas.

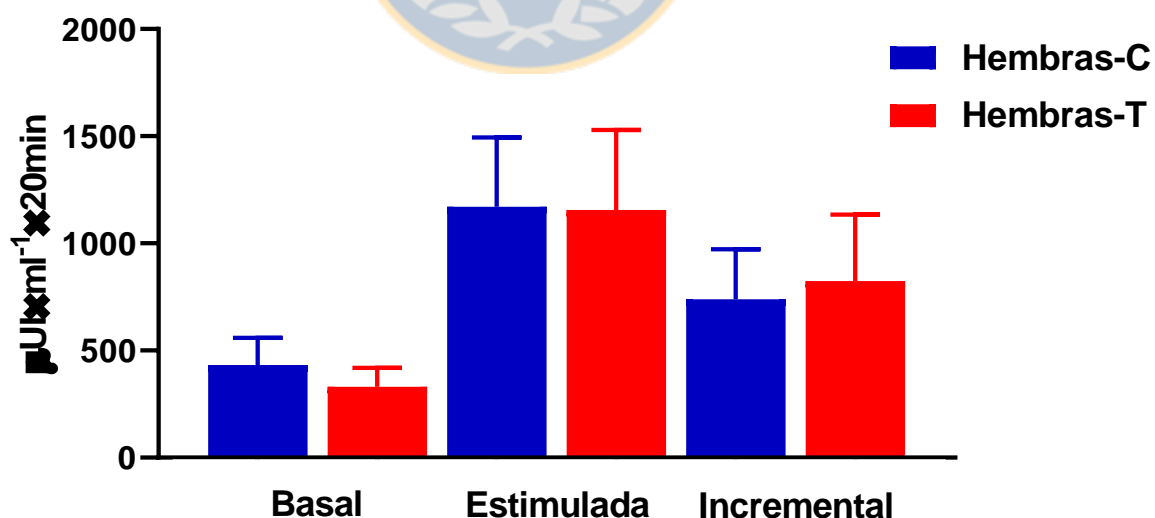
Gráfico 30: Área bajo la curva basal, estimulada e incremental en hembras ovinas ooforectomizadas de 30 semanas de edad control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.



### Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina

El ABC basal de la concentración plasmática de insulina no presentó diferencias entre los grupos experimentales ( $P=0,3939$ ) siendo  $432,65 \pm 127,16 \mu\text{UI}\times\text{ml}^{-1}\times 20\text{min}$  en las hembras-C y  $331,15 \pm 87,44 \mu\text{UI}\times\text{ml}^{-1}\times 20\text{min}$  en las hembras-T (Gráfico 31). De la misma forma, no se evidenciaron diferencias al comparar el ABC estimulada de la insulina secretada en respuesta a la glucosa durante los primeros 20 minutos tras el comienzo de la infusión de glucosa ( $P=0,9372$ ), siendo  $1171,60 \pm 323,13 \mu\text{UI}\times\text{ml}^{-1}\times 20\text{min}$  en las hembras ooforectomizadas control y  $1156,02 \pm 372,92 \mu\text{UI}\times\text{ml}^{-1}\times 20\text{min}$  en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona ooforectomizadas. Asimismo, no hubo diferencia en el ABC incremental entre ambos grupos ( $P=0,8293$ ) siendo en el grupo de hembras-C  $738,96 \pm 233,73 \mu\text{UI}\times\text{ml}^{-1}\times 20\text{min}$  y en las hembras-T  $824,87 \pm 310,04 \mu\text{UI}\times\text{ml}^{-1}\times 20\text{min}$ .

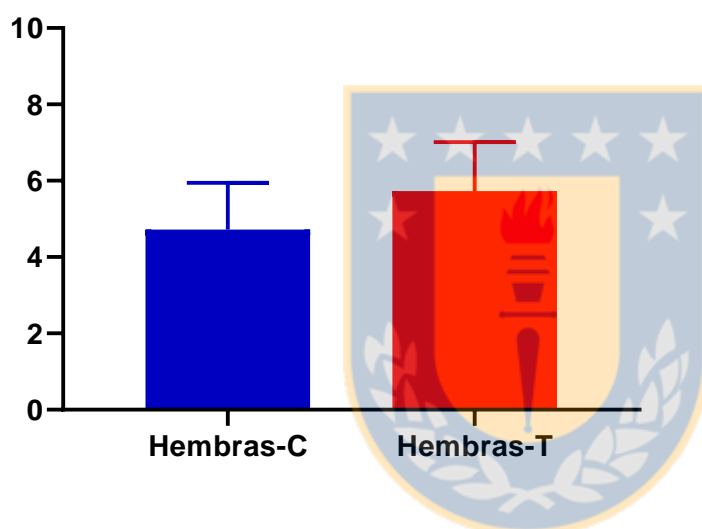
Gráfico 31: Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina en hembras ovinas ooforectomizadas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 30 semanas de edad.



### ISI-Composite

El ISI-Composite fue  $4,72 \pm 1,22$  en el grupo de hembras control y  $5,73 \pm 1,29$  en el grupo de hembras expuestas a un exceso de testosterona durante su desarrollo fetal (Gráfico 32), al realizar la comparación estadística entre ambos grupos no se presentó una diferencia significativa en esta variable ( $P=0,5849$ ).

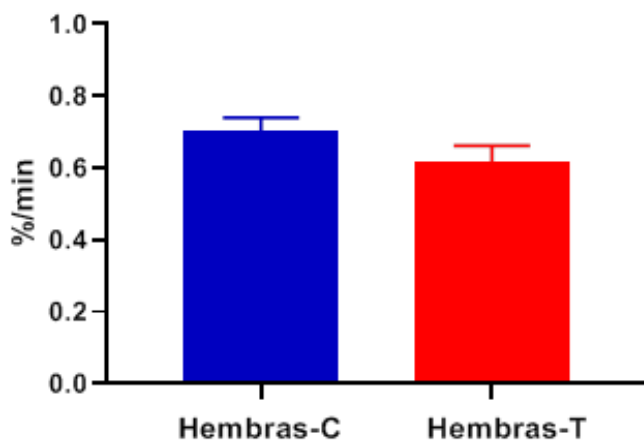
Gráfico 32: ISI-Composite en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 30 semanas de edad.



### ISI-Grulet

Al comparar este índice de sensibilidad a la insulina entre ambos grupos de hembras ooforectomizadas no se presentó una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0,1537$ ). Esta variable fue  $0,70 \pm 0,03$  %/min en el grupo de hembras-C y  $0,62 \pm 0,05$  %/min en el grupo de hembras expuestas a un exceso de testosterona (Gráfico 33).

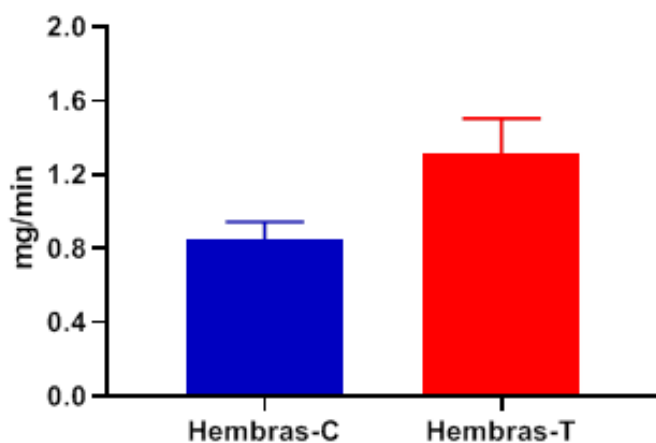
Gráfico 33: ISI-Grulet en hembras-C y hembras-T ooferectomizadas de 30 semanas de edad.



### Tasa de Desaparición de la glucosa

Al comparar la tasa de desaparición de la glucosa entre ambos grupos experimentales sólo se presentó una tendencia a ser mayor en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona ( $P=0,0529$ ), siendo  $1,31 \pm 0,19$  mg/min en este grupo y  $0,84 \pm 0,10$  en el grupo de hembras control (Gráfico 34).

Gráfico 34: Tasa de desaparición de glucosa en hembras-C y hembras-T ovariectomizadas de 30 semanas de edad.



## Efecto de la administración crónica de testosterona sobre la sensibilidad a insulina en ovejas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona de 38 semanas de edad

Los resultados de los análisis endocrinos y bioquímico-metabólicos tras la administración crónica de testosterona se presentan en la tabla 9.

Tabla 9: Peso y variables bioquímicas, metabólicas y endocrinas plasmáticas en hembras-C y hembras-T a las 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.

<b>Variables</b>	<b>Hembras-C</b>	<b>Hembras-T</b>	<b>Valor de P</b>
Peso (kg)	31,42 ± 1,61	34,40 ± 1,55	0,2112
<b>Variables metabólicas</b>			
Glucosa (mg/dl)	65,15 ± 3,82	63,37 ± 1,73	0,6799
Triglicéridos (mg/dl)	24,48 ± 4,50	20,30 ± 2,00	0,4156
Colesterol total (mg/dl)	54,59 ± 2,40	48,77 ± 1,84	0,0827
Colesterol HDL (mg/dl)	34,87 ± 2,41	31,21 ± 1,16	0,2016
Colesterol LDL (mg/dl)	14,83 ± 1,68	13,50 ± 1,27	0,8182
Proteínas plasmáticas totales (mg/dl)	7,08 ± 0,26	7,48 ± 0,55	0,5214
<b>Transaminasas hepáticas y otras</b>			
GPT (U/l)	10,98 ± 1,79	7,15 ± 0,72	0,0747
GOT (U/l)	26,87 ± 2,43	22,55 ± 2,85	0,2754
LDH (U/l)	149,17 ± 26,69	122,50 ± 15,96	0,4112
GGT (U/l)	24,25 ± 1,03	26,18 ± 2,13	0,4326
FA (U/l)	225,02 ± 23,11	223,78 ± 27,75	0,9734
α-Amilasa (U/l)	20,27 ± 3,94	25,77 ± 8,64	0,9329
<b>Variables endocrinas</b>			
Insulina (μUI/ml)	11,56 ± 1,26	18,60 ± 3,81	0,1104
Testosterona total (TT, ng/ml)	1,76 ± 0,22	1,17 ± 0,36	0,1898
Testosterona libre (TL, pg/ml)	9,72 ± 0,61	6,59 ± 1,46	0,0761
Relación TL/TT	0,58 ± 0,05	0,66 ± 0,07	0,4394
Estradiol (pg/ml)	10,91 ± 4,48	7,32 ± 0,96	0,8874
Progesterona (ng/dl)	0,76 ± 0,08	0,62 ± 0,08	0,2007

Fuente: Elaboración propia.



A las 38 semanas de edad, tras la administración crónica de testosterona por 8 semanas a las hembras de ambos grupos experimentales, no hubo diferencias en las variables bioquímico-metabólicas sanguíneas, en los niveles séricos de las transaminasas hepáticas y en los distintos indicadores endocrinos evaluados (Tabla 9). Sin embargo, se presentó una tendencia a disminuir la concentración plasmática de colesterol total, la transaminasa GPT y la concentración plasmática de testosterona libre en el grupo expuesto prenatalmente a un exceso de testosterona con respecto al grupo de hembras control.

### **Dinámica de la concentración plasmática de glucosa durante el tercer TTGEV**

El promedio de la concentración basal de glucosa (T-15-T0) en las hembras-C fue  $65,15 \pm 3,82$  mg/dl y  $63,37 \pm 1,73$  mg/dl en el grupo de hembras-T no existiendo diferencias entre los grupos ( $P=0,6799$ ). Tras la administración de glucosa la concentración plasmática de esta aumentó alcanzando su máximo a los 3 minutos (T3) del TTGEV en ambos grupos experimentales, presentando valores de  $151,30 \pm 8,54$  mg/dl en el grupo de hembras-C y de  $149,60 \pm 5,09$  mg/dl en el grupo de hembras-T, no existiendo diferencias al comparar esta variable entre los grupos experimentales ( $P=0,8670$ , Gráfico 35). Al comparar el valor promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV (T3-T180) no hubo diferencia entre los grupos de hembras ( $P=0,6556$ ), siendo en las hembras-C  $82,61 \pm 6,07$  mg/dl y en las hembras-T  $79,67 \pm 2,04$  mg/dl.

### **Dinámica de la concentración plasmática de insulina durante el tercer TTGEV**

La concentración de insulina basal, previo a la administración de glucosa, fue similar al comparar los grupos experimentales, esto es  $11,56 \pm 1,26$   $\mu$ UI/ml en las hembras control y  $18,60 \pm 3,81$   $\mu$ UI/ml en las hembras-T ( $P=0,1104$ ). Sin embargo, al comparar la concentración promedio de insulina tras la administración de glucosa esta fue significativamente mayor ( $P=0,0260$ ) en el grupo de hembras-T ( $58,49 \pm 13,88$   $\mu$ UI/ml) con respecto a las hembras-C ( $29,64 \pm 4,94$   $\mu$ UI/ml). Asimismo, al comparar la dinámica de la concentración plasmática de insulina, desde los 3 hasta los 20 minutos, se observó que

las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona secretan una mayor cantidad de insulina tras la carga de glucosa, pero por la alta variabilidad en la secreción de esta hormona en cada oveja que forma parte del grupo tratado (Gráfico 36), sólo se presentó una diferencia en el minuto 7 (T7) tras el inicio de la infusión de glucosa ( $P=0,0475$ ). Esta mayor secreción de insulina puede ser también demostrada por una concentración máxima de esta hormona significativamente mayor en el grupo de hembras-T en relación a las hembras-C ( $P=0,0411$ ), siendo esta variable  $37,67 \pm 6,08 \mu\text{UI/ml}$  y  $79,93 \pm 21,06 \mu\text{UI/ml}$ , respectivamente. El tiempo en que se provocó esta concentración máxima fue similar entre ambos grupos produciéndose aproximadamente a los 10 minutos tras el comienzo de la infusión de glucosa durante el TTGEV ( $P=0,7796$ ).

Gráfico 35: Dinámica y promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T a las 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.

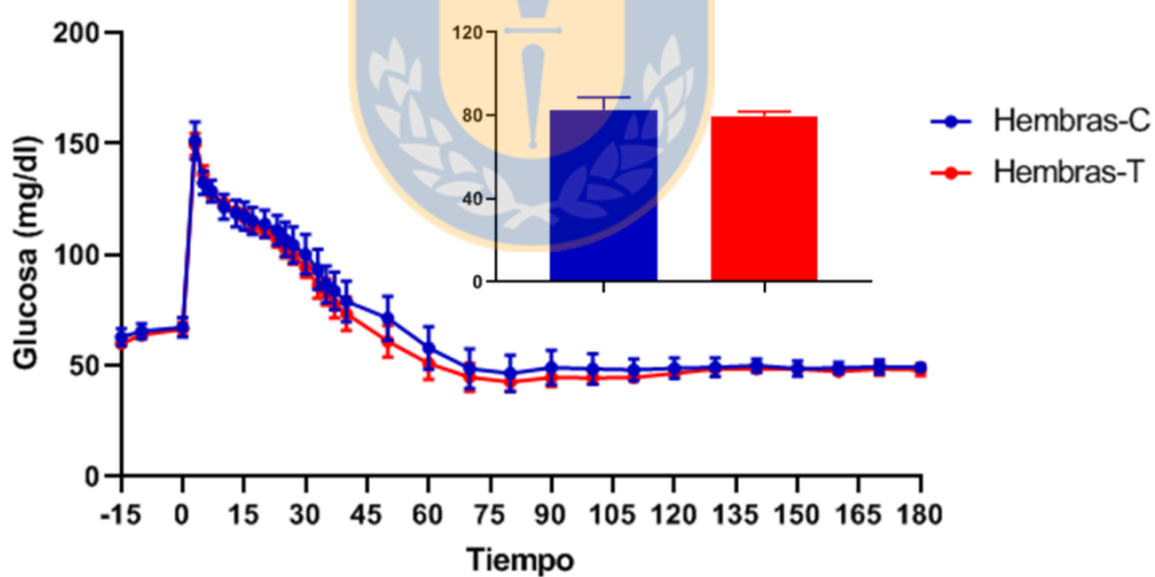
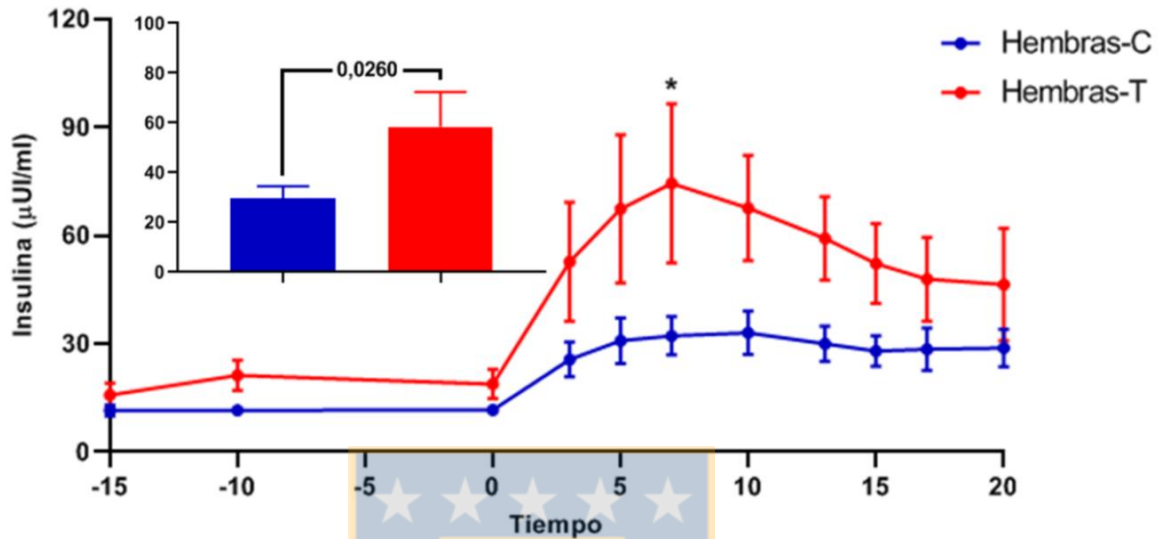


Gráfico 36: Dinámica y promedio de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV en hembras ovinas control y EPT tras la administración crónica de testosterona.

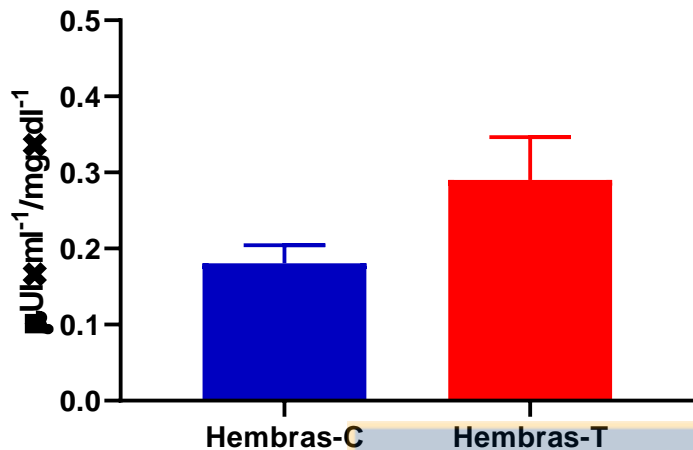


### Índices de Sensibilidad a la Insulina

#### Relación Insulina/Glucosa Basal

Al comparar la relación insulina/glucosa basal entre los grupos experimentales, se evidenció una relación mayor en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona ( $0,29 \pm 0,06 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} / \text{mg} \times \text{dl}^{-1}$ ) comparado con las hembras control ( $0,18 \pm 0,02 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} / \text{mg} \times \text{dl}^{-1}$ , Gráfico 37). Sin embargo, esta diferencia no alcanzó a ser significativa entre ambos grupos ( $P=0,1020$ ).

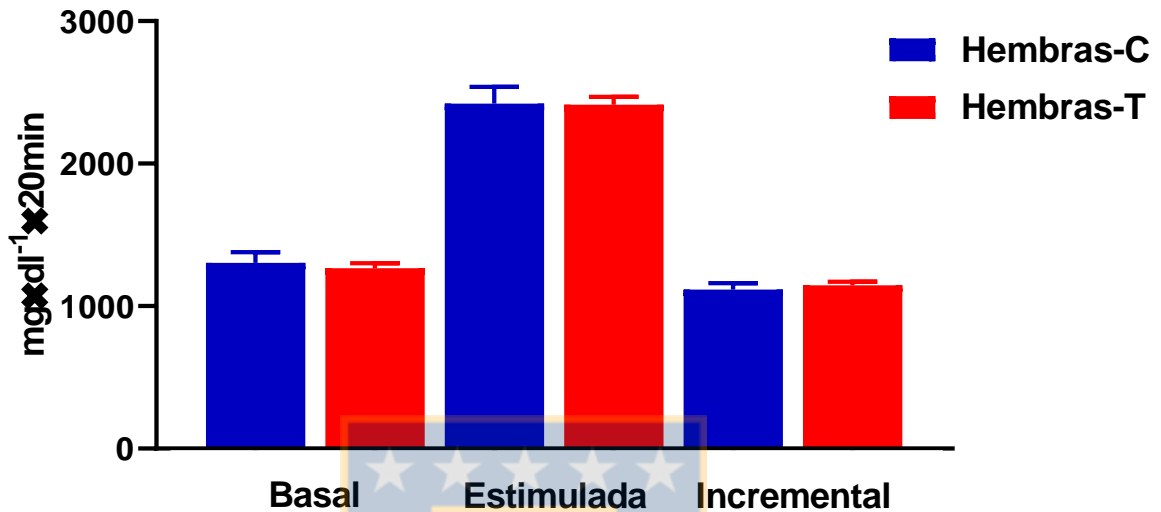
Gráfico 37: Relación insulina/glucosa basal durante el TTGEV en hembras ovinas de 38 semanas de edad control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona tras la administración crónica de testosterona.



#### Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa

El ABC basal de la concentración plasmática de glucosa durante el tercer TTGEV fue comparable entre los grupos experimentales no existiendo diferencias en esta variable ( $P=0,6799$ ), siendo  $1303,05 \pm 76,49 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  en las hembras-C y  $1267,38 \pm 34,60 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  en las hembras-T (Gráfico 38). Tras la administración de glucosa, la concentración plasmática de esta aumentó produciendo un ABC estimulada en las hembras control de  $2420,01 \pm 118,30 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  y  $2414,34 \pm 54,87 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona, siendo similar al comparar esta variable entre los grupos ( $P=0,9662$ ). El ABC incremental de la concentración de glucosa no presentó diferencias ( $P=0,5678$ ) siendo  $1116,96 \pm 44,22 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  en el grupo de hembras-C y  $1146,96 \pm 24,97 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  en el grupo de hembras-T.

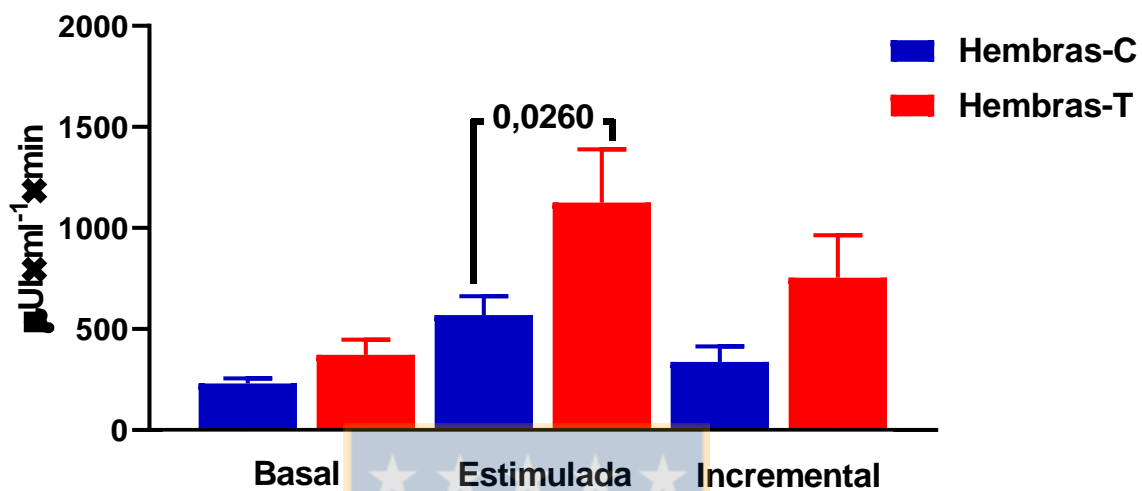
Gráfico 38: Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa durante el tercer TTGEV en hembras-C y hembras-T de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.



#### Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina

El ABC basal de la concentración plasmática de insulina no presentó diferencias al comparar los grupos experimentales ( $P=0,1104$ ), siendo en el grupo control  $231,26 \pm 25,25 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  y en el grupo EPT  $371,93 \pm 76,25 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$ . Tras la administración de glucosa aumentó la secreción de insulina alcanzando un ABC estimulada de  $568,40 \pm 94,07 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  en las hembras del grupo control y  $1125,60 \pm 263,10 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona. Al comparar esta variable entre los grupos experimentales, esta fue significativamente mayor ( $P=0,0260$ ) en el grupo de hembras-T con respecto a las hembras-C (Gráfico 39). A pesar de esta diferencia, al comparar el ABC incremental de la concentración plasmática de insulina durante los primeros 20 minutos del TTGEV solo pudo evidenciarse una tendencia a que esta variable fuese mayor en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona en comparación al grupo de hembras control ( $P=0,0933$ ), siendo  $753,68 \pm 210,94$  y  $337,14 \pm 76,99 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$ , respectivamente.

Gráfico 39: Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina en hembras C y hembras-T enteras a las 38 semanas de edad tras 8 semanas de la administración crónica de testosterona.



### ISI-Composite

En el índice de sensibilidad a la insulina ISI-C sólo se evidenció una tendencia a que esta variable disminuyera en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona con respecto a las hembras control ( $P=0,0568$ ), a pesar de que se evidenció una secreción mayor de insulina en respuesta a la glucosa infundida. En el grupo de hembras-T fue  $4,24 \pm 0,81$  y en las hembras-C fue  $6,49 \pm 0,66$  (Gráfico 40).

### ISI-Grulet

No se presentaron diferencias al comparar este índice entre los grupos experimentales ( $P=0,8005$ ). En las hembras nacidas de madres tratadas con testosterona fue  $0,62 \pm 0,03$  %/min y en las hembras nacidas del grupo de madres control fue  $0,61 \pm 0,01$  %/min (Gráfico 41).

Gráfico 40: ISI-Composite en hembras-C y Hembras-T de 38 semanas de edad tras 8 semanas de administración de testosterona.

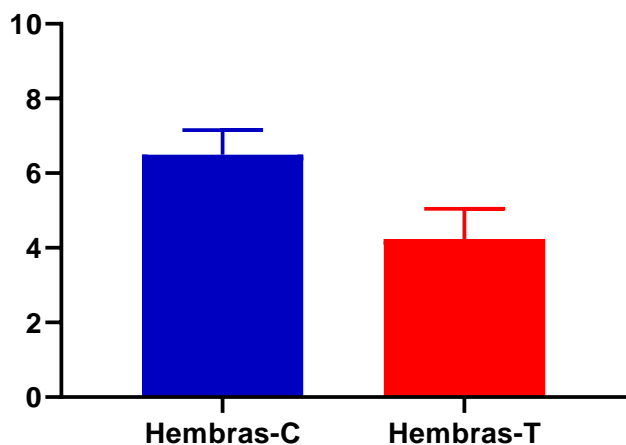
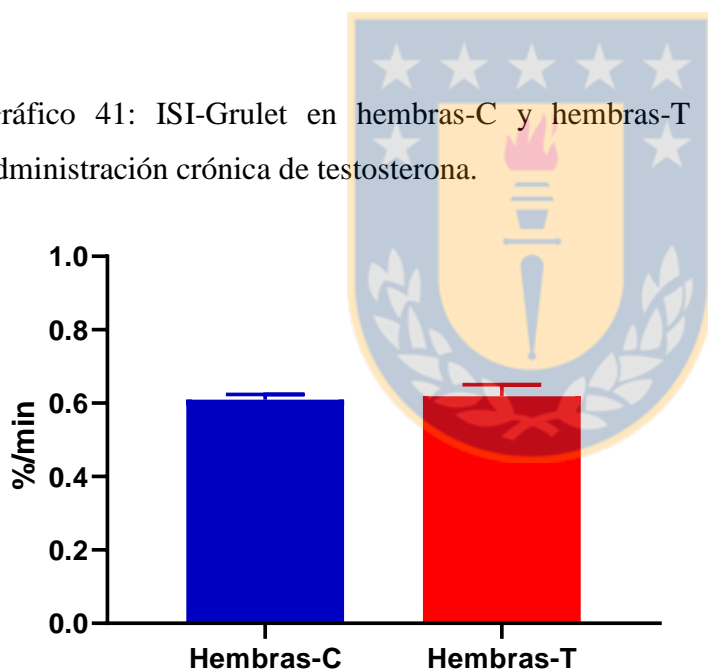


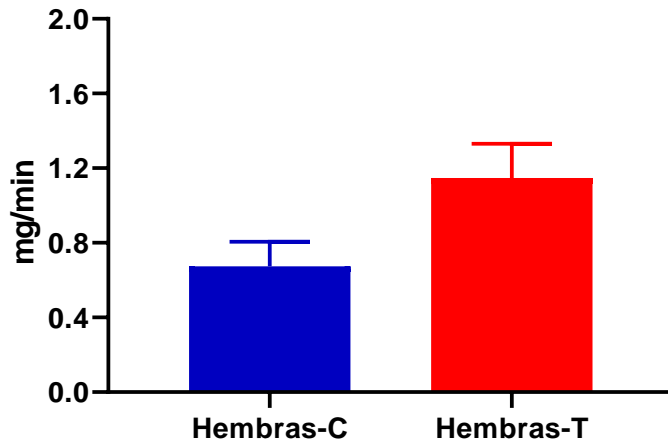
Gráfico 41: ISI-Grulet en hembras-C y hembras-T de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.



### Tasa de desaparición de la glucosa

No se presentaron diferencias al comparar este índice de sensibilidad a la insulina entre los grupos experimentales, sólo una tendencia a que esta variable fuese mayor en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona ( $P=0,0645$ ). En el grupo de hembras-C fue  $0,67 \pm 0,13$  mg/min y en las hembras-T  $1,15 \pm 0,18$  mg/min (Gráfico 42).

Gráfico 42: Tasa de desaparición de la glucosa en hembras-C y hembras-T enteras de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.



**Efecto de la administración aguda de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en hembras ooforectomizadas de 38 semanas de edad expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona**

#### **Peso y concentración plasmática de testosterona**

El peso corporal en ambos grupos de hembras fue similar en ambas condiciones, previo a la administración de testosterona, cuando se llevó a cabo el primer test de tolerancia a glucosa endovenosa y 48 horas tras la administración de testosterona (40 mg/oveja), tiempo en el que se realizó el segundo test de tolerancia a la glucosa endovenosa. De la misma forma, al comparar la concentración plasmática de testosterona durante el primer TTGEV esta fue similar entre ambos grupos ( $P=1,0000$ ). Tras la administración de testosterona, la concentración plasmática de esta hormona nuevamente no presentó diferencias entre ambos grupos experimentales (Tabla 10). Al cuantificar la concentración plasmática de otras hormonas esteroidales de origen ovárico, como el estradiol y la progesterona, estas no fueron detectables por medio de radioinmunoensayo. En el perfil lipídico, la administración de testosterona no generó cambios en la concentración plasmática de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos y proteínas plasmáticas totales. Asimismo, al



evaluar el efecto de la administración de testosterona sobre las transaminasas hepáticas (fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa, alanino aminotransferasa, gama-glutamil transaminasa y lactato deshidrogenasa) no se presentaron diferencias previo y 48 horas tras la administración de este andrógeno (datos no mostrados).

Tabla 10: Peso corporal y concentración plasmática de testosterona previo y 48 horas tras la administración de testosterona en hembras ovinas ooforectomizadas adultas de 38 semanas de edad control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.

<b>Variables</b>	<b>Hembras-C</b>	<b>Hembras-T</b>	<b>Valor de P</b>
Peso previo-T (kg)	32,70 ± 1,84	29,80 ± 1,18	0,6174
Peso 48 horas tras-T (kg)	34,10 ± 2,00	30,80 ± 1,23	0,5702
Testosterona previo-T (ng/ml)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,0000
Testosterona 48 horas tras-T (ng/ml)	1,71 ± 0,22	1,72 ± 0,27	0,9812

Fuente: Elaboración propia.

### **Dinámica de la concentración plasmática de glucosa**

En ovejas adultas, ooforectomizadas a las 26 semanas de edad, se evaluó el efecto de la administración aguda de testosterona sobre la sensibilidad de los tejidos a la insulina a las 38 semanas. A través de la comparación entre grupos se evaluó el efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona y por medio de la comparación dentro de los grupos, el efecto agudo de la testosterona administrada.

El promedio de la concentración plasmática basal de glucosa presentó una tendencia a ser mayor en el grupo de hembras-T al compararlas con las hembras-C previo a la administración de testosterona (P=0,0721). Tras la administración de testosterona no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en esta variable (P=0,1760), ni dentro de los grupos (hembras-C P=0,6750 y en las hembras-T, P=0,3188). La infusión de glucosa durante los test de tolerancia a la glucosa endovenosa provocó un aumento agudo en la concentración plasmática de este carbohidrato, presentándose la concentración

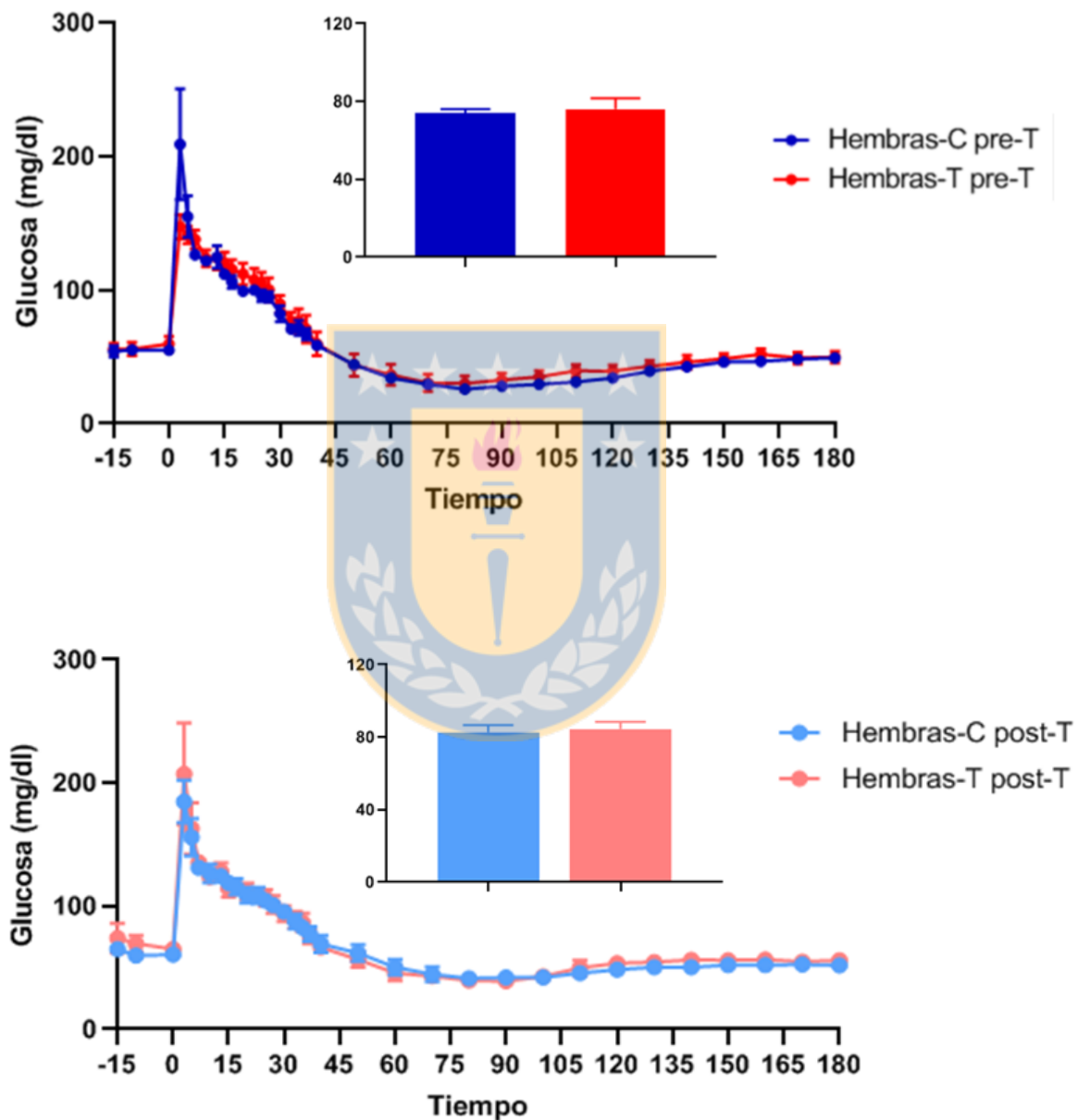
máxima de glucosa entre los 3 y 5 minutos de iniciado el ensayo en ambos grupos (T0), previo a la administración de testosterona (Gráfico 43). No hubo diferencia en el tiempo en que se alcanzó la concentración máxima de glucosa al realizar la comparación entre grupos previo (P=0,7344) y 48 horas tras la administración de testosterona (P=0,7485). Al comparar el efecto agudo de la administración de testosterona sobre el tiempo en que se alcanzó la concentración máxima de glucosa, sólo se presentó una tendencia a aumentar en el grupo de hembras-C (P=0,0858) lo que no se observó en el grupo de hembras-T (P=0,2445). La media de la concentración plasmática de glucosa, tras la infusión de glucosa durante el TTGEV, fue similar al comparar entre los grupos y dentro de los grupos previo y tras la administración de testosterona (Tabla 11).

Tabla 11: Concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV en hembras ovinas adultas ooforectomizadas previo y 48 horas tras la administración de testosterona.

<b>Variables</b>	<b>Hembras-C</b>	<b>Hembras-T</b>
<b>Glucosa Basal</b>		
Previo a la Testosterona (mg/dl)	54,74 ± 2,73	61,85 ± 2,25
48 horas tras Testosterona (mg/dl)	57,15 ± 4,85	69,66 ± 7,09
<b>Concentración máxima</b>		
Previo a la Testosterona (mg/dl)	208,97 ± 41,48	152,53 ± 8,16
48 horas tras Testosterona (mg/dl)	187,95 ± 18,47	209,27 ± 40,72
<b>Promedio concentración glucosa</b>		
Previo a la Testosterona (mg/dl)	74,11 ± 1,98	76,15 ± 5,51
48 horas tras Testosterona (mg/dl)	82,66 ± 4,02	84,51 ± 3,92

Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 43: Dinámica y promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV previo (superior) y 48h tras la administración de testosterona (inferior) en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad.



## **Dinámica de la concentración plasmática de insulina**

La concentración plasmática basal de insulina, previo a la infusión de glucosa, fue similar al comparar entre grupos previo y tras la administración de testosterona. Al comparar dentro de los grupos, en el grupo de hembras-C se presentó un aumento significativo ( $P=0,0133$ ) en la concentración basal de insulina tras la administración de testosterona, en cambio, en el grupo de hembras-T no hubo diferencias al comparar dentro del grupo, previo y tras la administración de testosterona (Gráfico 44).

Tras la administración de glucosa, durante los TTGEV, aumentó la secreción de insulina en ambos grupos bajo las dos condiciones, previo y 48 horas tras la administración de testosterona. La concentración máxima se presentó entre los 7 y 13 minutos tras el inicio de la infusión de glucosa. La concentración máxima de insulina no presentó diferencias al comparar dentro de los grupos experimentales, pero al comparar entre grupos hubo una diferencia estadísticamente significativa tras la administración de testosterona ( $P=0,0341$ ), siendo mayor en las hembras-C. Previo a la administración de testosterona no hubo diferencia al comparar entre los grupos (Tabla 12). Asimismo, el promedio de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV fue significativamente mayor al comparar entre grupos, hembras-C versus hembras-T, previo y tras la administración de testosterona, siendo significativamente mayor en el grupo de hembras-C. Esto pudo evidenciarse en el T13 y T17 en los que la concentración plasmática de insulina fue significativamente mayor en el grupo de hembras-C al compararlas con las hembras-T 48 horas tras la administración de testosterona ( $P=0,0184$  y  $P=0,0094$ , respectivamente). Al comparar dentro de los grupos sólo se presentó una diferencia estadísticamente significativa en las hembras-C en el T17, previo y 48 tras la administración de testosterona, siendo mayor tras la administración de esta hormona en este grupo ( $P=0,0159$ ).

Gráfico 44: Dinámica y promedio de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV en hembras ovinas adultas ooforectomizadas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona previo y 48 horas tras la administración de testosterona.

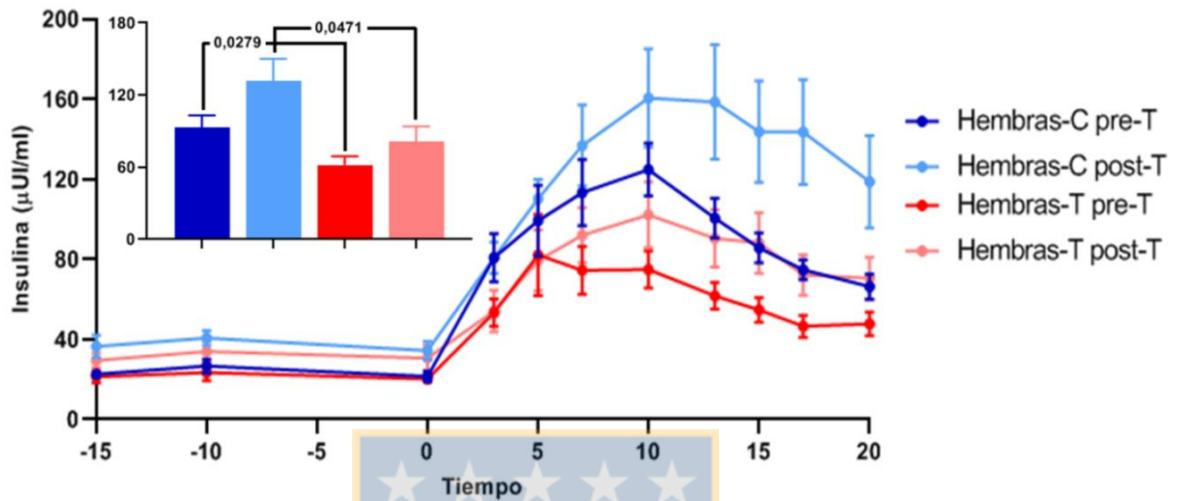


Tabla 12: Concentración plasmática de insulina basal, máxima y promedio durante el TTGEV en hembras ovinas adultas ooforectomizadas previo y 48 horas tras la administración de testosterona.

Variable	Hembras-C	Hembras-T
<b>Insulina Basal</b>		
Previo a la Testosterona (µUI/ml)	23,60 ± 2,62 <sup>a</sup>	21,70 ± 2,77
48 horas tras Testosterona (µUI/ml)	37,23 ± 3,93 <sup>b</sup>	31,41 ± 4,93
<b>Concentración máxima</b>		
Previo a la Testosterona (µUI/ml)	126,59 ± 14,17	97,91 ± 18,58
48 horas tras Testosterona (µUI/ml)	178,65 ± 26,41 <sup>x</sup>	102,33 ± 16,44 <sup>y</sup>
<b>Promedio concentración insulina</b>		
Previo a la Testosterona (µUI/ml)	93,30 ± 9,80 <sup>x</sup>	62,02 ± 7,22 <sup>y</sup>
48 horas tras Testosterona (µUI/ml)	131,74 ± 18,39 <sup>x</sup>	81,22 ± 12,64 <sup>y</sup>

(a,b) Letras diferentes representa diferencias significativas al comparar dentro del grupo.

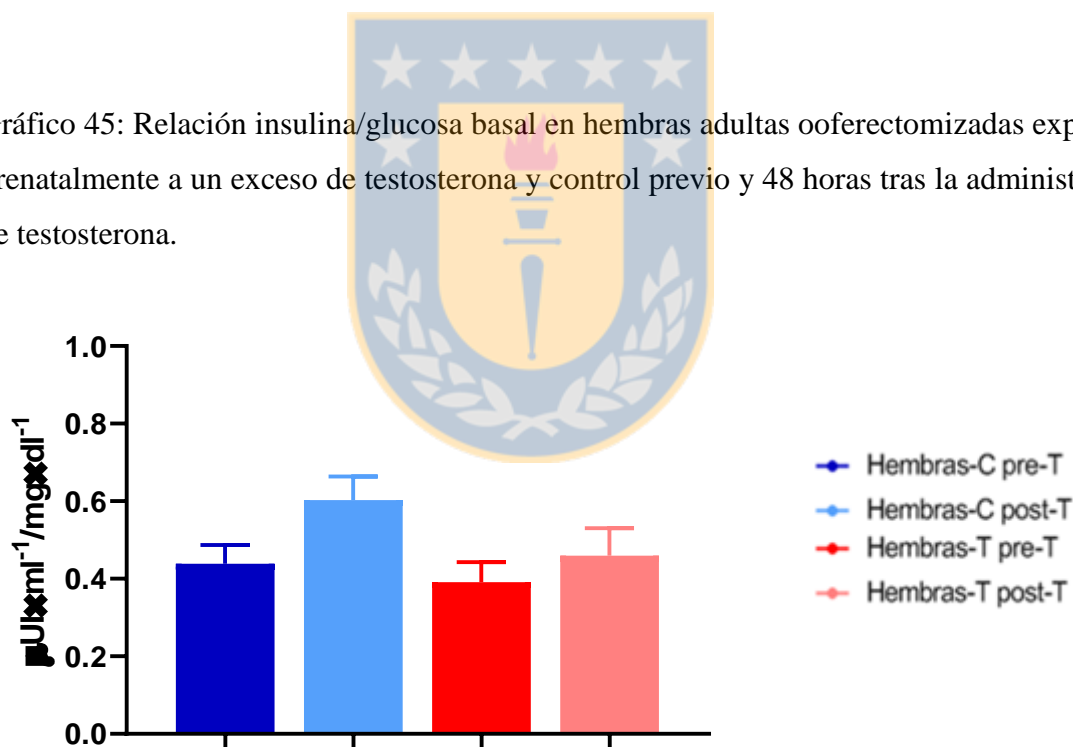
(x,y) Letras diferentes representa diferencias significativas al comparar entre grupos.

Fuente: Elaboración propia.

## Relación Insulina/Glucosa

La relación insulina/glucosa basal presentó una tendencia a ser significativamente mayor en las hembras-C al comparar dentro de este grupo ( $P=0,0595$ ), previo y 48 horas tras la administración de testosterona, siendo  $0,44 \pm 0,05$  y  $0,60 \pm 0,06 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1}/\text{mg} \times \text{dl}^{-1}$ , respectivamente (Gráfico 45). En el grupo de hembras-T no se evidenciaron diferencias dentro del grupo antes y después de la administración de testosterona ( $P=0,8182$ ), siendo  $0,39 \pm 0,05$  y  $0,46 \pm 0,07 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1}/\text{mg} \times \text{dl}^{-1}$ , respectivamente. De la misma forma, al realizar una comparación entre los grupos, es decir, el efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona, no hubo diferencia estadísticamente significativa previo a la administración de testosterona ( $P=0,5209$ ) y 48 horas tras la administración de este andrógeno ( $P=0,1797$ ).

Gráfico 45: Relación insulina/glucosa basal en hembras adultas ooforectomizadas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona y control previo y 48 horas tras la administración de testosterona.



## Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de glucosa

El ABC basal de glucosa previo y 48 horas tras la administración de testosterona fue similar al comparar entre grupos. Sólo se presentó una tendencia a aumentar el ABC basal tras la administración de testosterona en el grupo de hembras-C ( $P=0,0720$ ), lo que no se evidenció en el grupo de hembras-T ( $P=0,1797$ ). De la misma forma, al comparar el ABC

estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa, entre y dentro de los grupos, previo y 48 horas tras la administración de testosterona, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas (Gráfico 46, Tabla 13).

### **Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de insulina**

El ABC de la concentración plasmática de insulina durante ambos test de tolerancia a la glucosa endovenosa presentó varias diferencias significativas al comparar entre grupos y dentro de los grupos experimentales. En ambos grupos de hembras la administración de testosterona provocó que aumentara el ABC basal de la concentración de insulina; no obstante, sólo en el grupo de hembras-C este aumento fue estadísticamente significativo ( $P=0,0132$ ), a diferencia del grupo de hembras-T ( $P=0,6072$ ). Al comparar esta variable entre grupos no hubieron diferencias previo a la administración ( $P=0,6072$ ) ni 48 horas tras la administración de testosterona ( $P=0,3939$ ; Gráfico 47).

Tras la infusión de glucosa, aumentó la secreción de insulina en respuesta a la hiperglicemia generada, el ABC estimulada de insulina se incrementó en ambos grupos previo y tras la administración de testosterona, pero este aumento tendió a ser mayor en el grupo de hembras-C tras la administración de este andrógeno ( $P=0,0984$ ). Al comparar entre grupos pudo observarse que el ABC estimulado fue significativamente mayor en el grupo de hembras-C al compararlas con las hembras-T previo ( $P=0,0259$ ) y 48 horas tras ( $P=0,0473$ ) la administración de testosterona. En el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de andrógenos no se observó que el aumento en la secreción de insulina estimulada por la infusión de glucosa fuera mayor al comparar previo y tras la administración de este esteroide ( $P=0,2091$ ). Finalmente, al evaluar el diferencial, nuevamente se mantuvo la diferencia establecida al comparar entre grupos, hembras-C versus hembras-T, previo ( $P=0,0248$ ) y 48 horas después ( $P=0,0491$ ) de la administración de testosterona, es decir, principalmente por el efecto de la androgenización durante el desarrollo fetal. Al comparar dentro de los grupos no hubo una diferencia estadísticamente significativa en esta variable, es decir, no hubo un efecto de la administración aguda de testosterona sobre este índice de sensibilidad a la insulina (hembras-C  $P=0,2629$  y hembras-T  $P=0,4196$ ; Tabla 14).

Gráfico 46: Área bajo la curva de la concentración plasmática de glucosa durante los TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad previo y 48 horas tras la administración de testosterona.

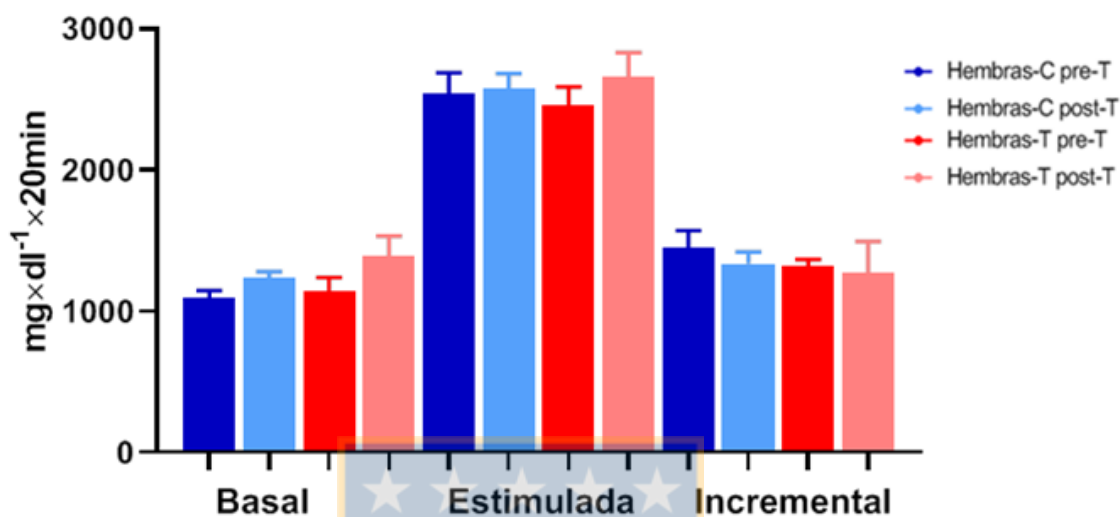


Tabla 13: Promedio  $\pm$  EEM del área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa previo y 48 horas después de la administración de una dosis de testosterona en hembras-C y hembras-T.

Variable	Hembras-C	Hembras-T
<b>Área bajo la curva basal</b>		
Previo a la Testosterona ( $\text{mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$ )	1094,90 $\pm$ 54,54	1142,90 $\pm$ 96,95
48 horas tras Testosterona ( $\text{mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$ )	1237,03 $\pm$ 44,93	1393,10 $\pm$ 141,90
<b>Área bajo la curva estimulada</b>		
Previo a la Testosterona ( $\text{mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$ )	2544,60 $\pm$ 143,40	2457,97 $\pm$ 131,40
48 horas tras Testosterona ( $\text{mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$ )	2576,73 $\pm$ 106,20	2663,78 $\pm$ 168,30
<b>Área bajo la curva incremental</b>		
Previo a la Testosterona ( $\text{mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$ )	1449,70 $\pm$ 122,60	1315,07 $\pm$ 51,89
48 horas tras Testosterona ( $\text{mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$ )	1339,70 $\pm$ 82,70	1270,68 $\pm$ 222,40

Fuente: Elaboración propia.



Gráfico 47: Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina en hembras-C y hembras-T de 38 semanas de edad antes y 48 horas después de la administración de una dosis de testosterona.

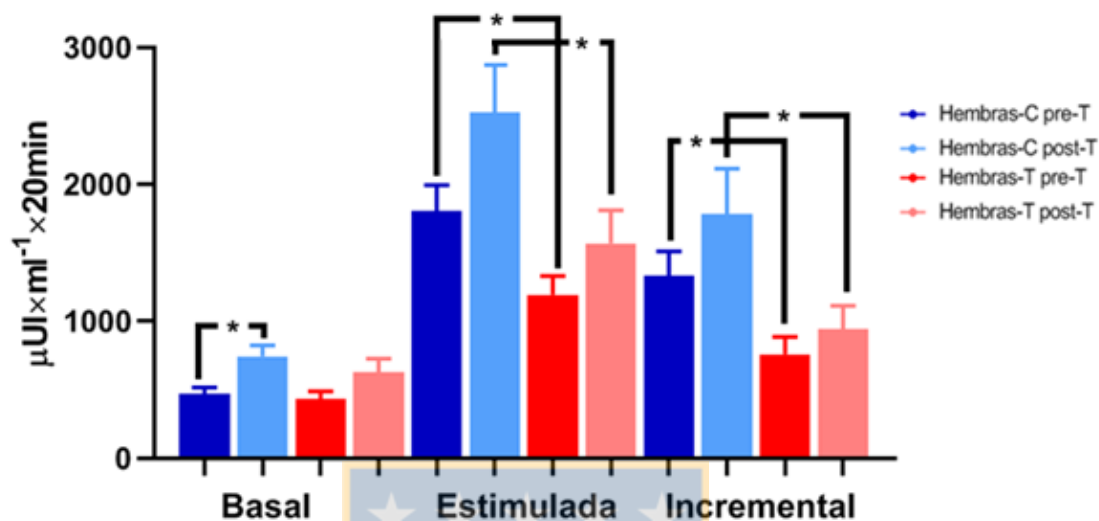


Tabla 14: Promedio  $\pm$  EEM del área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV previo y 48 horas después de la administración de una dosis de testosterona en hembras-C y hembras-T a las 38 semanas de edad.

Variables	Hembras-C	Hembras-T
<b>Área bajo la curva basal</b>		
Previo a la Testosterona ( $\mu\text{UI}\times\text{ml}^{-1}\times 20\text{min}$ )	472,03 $\pm$ 45,24 <sup>a</sup>	434,07 $\pm$ 55,41
48 horas tras Testosterona ( $\mu\text{UI}\times\text{ml}^{-1}\times 20\text{min}$ )	744,57 $\pm$ 78,62 <sup>b</sup>	628,13 $\pm$ 98,70
<b>Área bajo la curva estimulada</b>		
Previo a la Testosterona ( $\mu\text{UI}\times\text{ml}^{-1}\times 20\text{min}$ )	1804,82 $\pm$ 189,70 <sup>x</sup>	1194,06 $\pm$ 136,50 <sup>y</sup>
48 horas tras Testosterona ( $\mu\text{UI}\times\text{ml}^{-1}\times 20\text{min}$ )	2524,93 $\pm$ 346,60 <sup>x</sup>	1568,16 $\pm$ 242,90 <sup>y</sup>
<b>Área bajo la curva incremental</b>		
Previo a la Testosterona ( $\mu\text{UI}\times\text{ml}^{-1}\times 20\text{min}$ )	1332,78 $\pm$ 177,50 <sup>x</sup>	759,99 $\pm$ 125,20 <sup>y</sup>
48 horas tras Testosterona ( $\mu\text{UI}\times\text{ml}^{-1}\times 20\text{min}$ )	1780,37 $\pm$ 332,90 <sup>x</sup>	940,02 $\pm$ 173,40 <sup>y</sup>

(a,b) Letras diferentes representa diferencias significativas al comparar dentro del grupo.

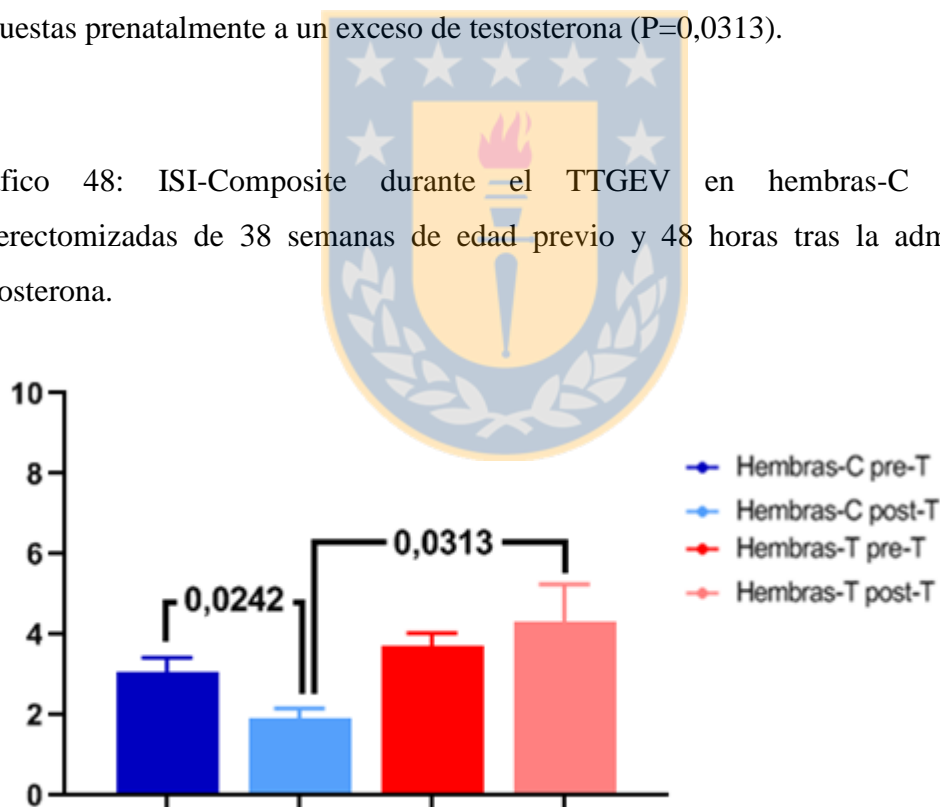
(x,y) Letras diferentes representa diferencias significativas al comparar entre grupos.

Fuente: Elaboración propia.

## ISI-Composite

El ISI-Composite presentó resultados contrastantes en ambos grupos de hembras tras la administración de testosterona. Dentro del grupo de hembras-C previo a la administración de testosterona el ISI-Composite fue  $3,07 \pm 0,36$  y, tras la administración de testosterona, este índice disminuyó significativamente ( $P=0,0242$ ) alcanzando un valor de  $1,93 \pm 0,23$  (Gráfico 48). Sin embargo, en el grupo de hembras-T tras la administración de testosterona el ISI-Composite aumentó desde  $3,71 \pm 0,34$  a  $4,32 \pm 0,93$ , pero este incremento no fue significativo ( $P=0,5477$ ). Al comparar entre grupos, previo a la administración de testosterona no hubo una diferencia entre el grupo de hembras-C y las hembras-T ( $P=0,2226$ ). No obstante, al comparar entre ambos grupos, el ISI-Composite 48 horas tras la administración de una dosis de testosterona, fue significativamente mayor en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona ( $P=0,0313$ ).

Gráfico 48: ISI-Composite durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad previo y 48 horas tras la administración de testosterona.

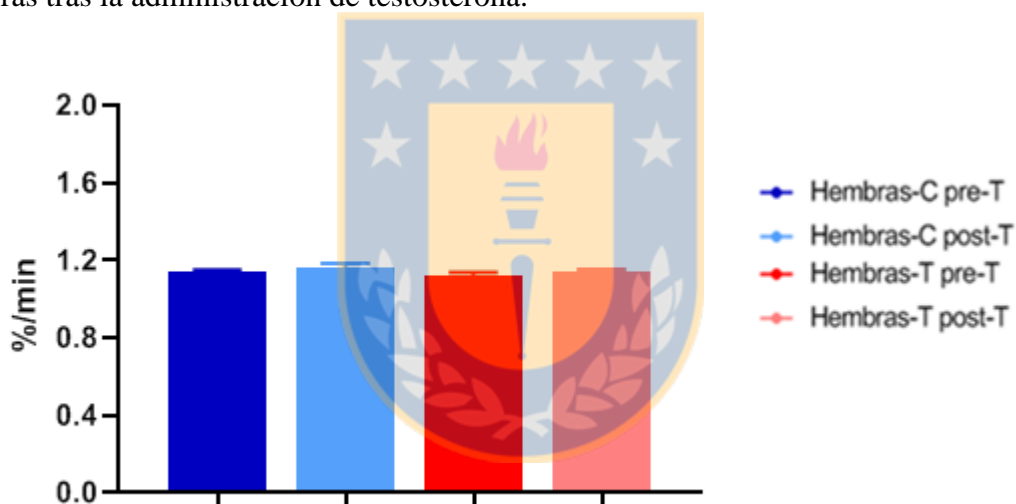


## ISI-Grulet

El ISI-Grulet no presentó diferencias entre los grupos en ambas condiciones. Previo a la administración de testosterona el ISI-Grulet en el grupo de hembras control fue  $1,14 \pm 0,01$

%/min y, tras la administración de testosterona,  $1,17 \pm 0,02$  %/min ( $P=0,3309$ ). En las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona fue  $1,12 \pm 0,02$  %/min y tras la administración de este andrógeno fue  $1,14 \pm 0,02$  %/min, este incremento no alcanzó a ser significativo ( $P=0,4437$ ) al comparar dentro de los grupos (Gráfico 49). Al realizar la comparación entre los grupos bajo las dos condiciones, no hubo diferencias atribuibles al efecto reprogramatorio de la exposición prenatal a un exceso de testosterona (previo a la administración de testosterona  $P=0,2447$  y 48 horas tras la administración de testosterona  $P=0,6147$ ).

Gráfico 49: ISI-Grulet en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas adultas previo y 48 horas tras la administración de testosterona.

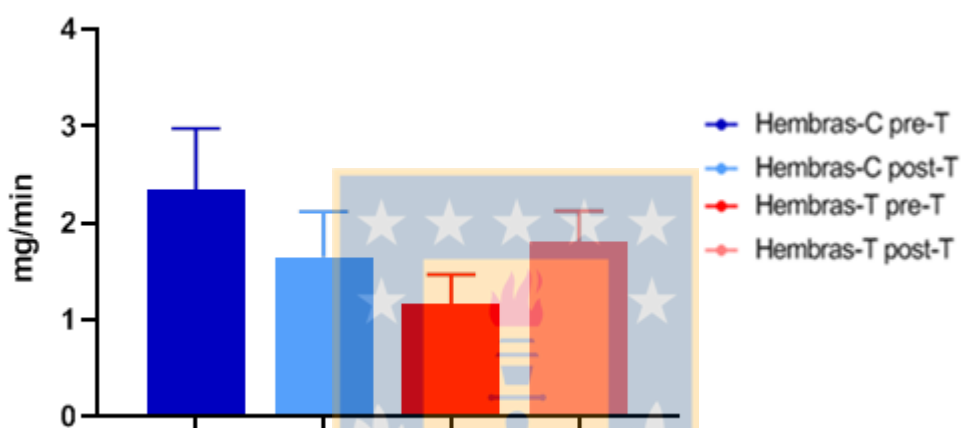


### Tasa de Desaparición de la Glucosa

Respecto a esta variable no hubo diferencia estadísticamente significativa, pero el efecto observado difirió en ambos grupos. En el grupo de hembras control, previo a la administración de testosterona la TDG fue  $2,34 \pm 0,64$  mg/min y tras la administración de testosterona esta variable disminuyó siendo  $1,65 \pm 0,46$  mg/min, pero esta reducción no alcanzó a ser significativa ( $P=0,4062$ ). En cambio, en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a testosterona aumentó este índice siendo  $1,16 \pm 0,31$  mg/min previo a la administración de una dosis de testosterona y, 48 horas tras la administración de este

andrógeno, esta variable aumentó a  $1,80 \pm 0,32$  mg/min no alcanzando a ser significativo este incremento ( $P=0,1832$ ). Al comparar entre grupos previo a la administración de testosterona ( $P=0,1281$ ) y tras la administración de este esteroide ( $P=0,7988$ ) no hubieron diferencias significativas (Gráfico 50).

Gráfico 50: Tasa de desaparición de la glucosa previo y tras la administración de glucosa en hembras-C y hembras-T ovariectomizadas de 38 semanas de edad.



**Efecto de la administración crónica de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en hembras ooforectomizadas adultas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona**

### **Peso y variables metabólico-endocrinas**

Durante el tercer test de tolerancia a la glucosa endovenosa en ambos grupos de hembras, control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona, se evaluó el efecto de la administración crónica de testosterona por 8 semanas, sobre la sensibilidad de los tejidos a la insulina en ovejas que fueron ooforectomizadas, esta etapa de desarrollo somático fue considerada el periodo post-puberal tardío.

Tabla 15: Peso corporal, variables bioquímico-metabólicas, endocrinas y transaminasas hepáticas en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas adultas tras la administración crónica de testosterona.

<b>Variables</b>	<b>Hembras-C</b>	<b>Hembras-T</b>	<b>Valor de P</b>
Peso (kg)	33,27 ± 1,65	29,27 ± 1,08	0,0696
<b>Variables metabólicas</b>			
Glucosa (mg/dl)	64,07 ± 0,71	58,62 ± 2,56	0,0674
Triglicéridos (mg/dl)	17,47 ± 2,07	16,61 ± 1,67	0,7529
Colesterol total (mg/dl)	54,50 ± 3,79	53,62 ± 2,52	0,8503
Colesterol HDL (mg/dl)	35,47 ± 3,96	36,22 ± 3,00	0,8821
Colesterol LDL (mg/dl)	15,54 ± 2,39	14,08 ± 2,19	0,9372
Proteínas plasmáticas totales (mg/dl)	6,98 ± 0,49	7,24 ± 0,69	0,7650
<b>Transaminasas hepáticas y otras</b>			
GPT (U/l)	10,68 ± 0,86	7,53 ± 1,08	0,0455*
GOT (U/l)	33,95 ± 4,79	27,95 ± 3,89	0,3538
LDH (U/l)	134,17 ± 6,64	106,00 ± 4,85	0,0152*
GGT (U/l)	32,05 ± 2,89	28,87 ± 5,10	0,5986
FA (U/l)	279,68 ± 19,95	186,87 ± 28,77	0,0243*
α-Amilasa (U/l)	23,00 ± 1,91	24,12 ± 5,73	0,8570
<b>Variables endocrinas</b>			
Insulina (μUI/ml)	11,96 ± 2,02	15,46 ± 2,90	0,3449
Testosterona total (TT, ng/ml)	1,28 ± 0,19	1,11 ± 0,17	0,5226
Testosterona libre (TL, pg/ml)	5,18 ± 1,45	6,16 ± 1,32	0,6272
Relación TL/TT	0,43 ± 0,09	0,60 ± 0,10	0,2452
Estradiol (pg/ml)	7,90 ± 1,14	7,63 ± 1,42	0,6364
Progesterona (ng/ml)	0,003 ± 0,002	0,003 ± 0,002	>0,9999

(\*) Diferencia estadísticamente significativa al comparar entre grupos (P<0,05). Fuente: Elaboración propia.

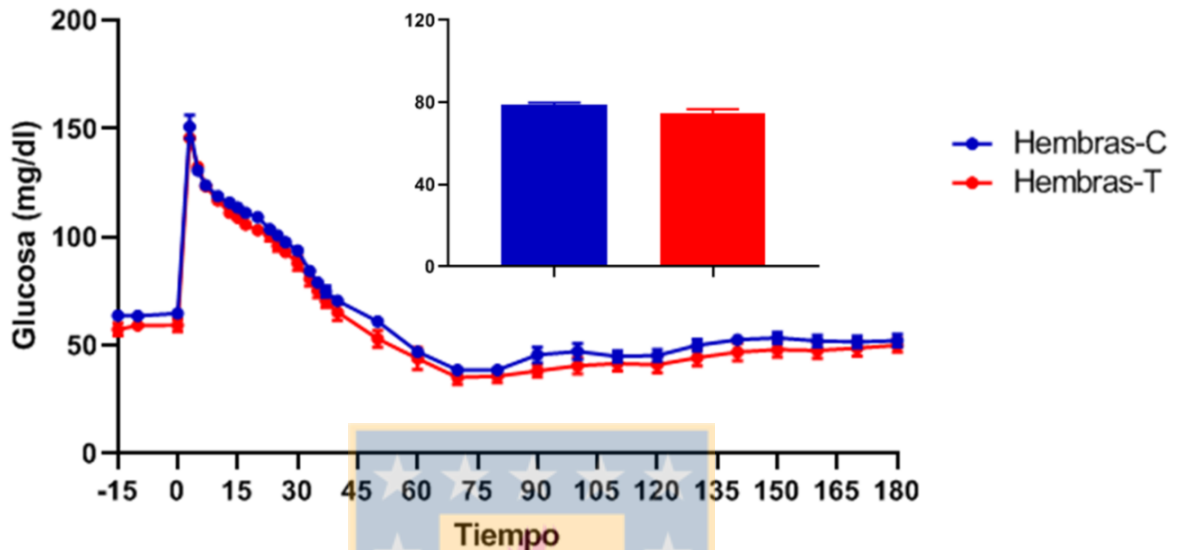
En esta etapa, el peso corporal y la concentración plasmática de varios sustratos energéticos y metabólicos fue similar entre los grupos de hembras ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, al comparar la concentración plasmática de algunas transaminasas hepáticas estas fueron significativamente mayores en el grupo de hembras control respecto a las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona, principalmente la alanino-aminotransferasa (GPT), la lactato deshidrogenasa y la fosfatasa alcalina (Tabla 15).

De la misma forma, la concentración plasmática de testosterona total, testosterona libre y la relación testosterona libre/testosterona total fue similar entre las hembras-T y las hembras-C. Asimismo, la concentración plasmática de estradiol fue similar entre los grupos experimentales y la concentración plasmática de progesterona no fue detectable por medio del ensayo con el que se realizó la cuantificación.

#### **Dinámica de la concentración plasmática de glucosa**

La concentración plasmática basal de glucosa fue  $64,07 \pm 0,71$  mg/dl en el grupo de hembras control y  $58,62 \pm 2,56$  mg/dl en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona tendiendo a ser esta variable menor en el grupo de hembras-T ( $P=0,0674$ ). Tras el inicio de la administración de glucosa la concentración plasmática de esta aumentó alcanzando la concentración máxima de  $150,91 \pm 5,48$  mg/dl en el grupo de hembras-C y  $145,73 \pm 2,26$  en el grupo de hembras-T, siendo similar esta variable entre los grupos ( $P=0,4027$ ). La concentración máxima se alcanzó en ambos grupos a los 3 minutos de iniciada la infusión de glucosa ( $P=1,0000$ , Gráfico 51). El promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV (T3-T180) fue similar entre los grupos de hembras ( $P=0,1251$ ), siendo en las hembras control  $78,66 \pm 1,16$  mg/dl y en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona  $74,44 \pm 2,24$  mg/dl.

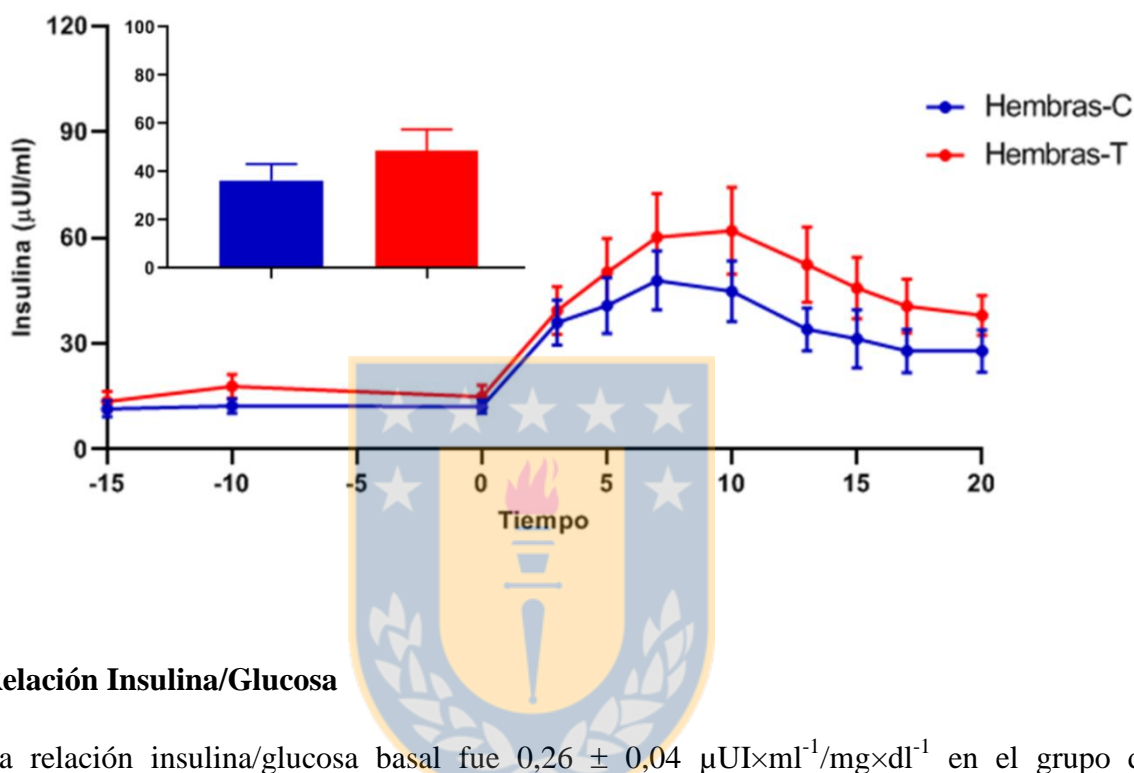
Gráfico 51: Dinámica y promedio de la concentración plasmática de glucosa durante TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.



### Dinámica de la concentración plasmática de insulina

Tras el inicio de la administración de glucosa aumentó la concentración plasmática de insulina súbitamente en ambos grupos alcanzando la concentración máxima entre los 7 y 10 minutos de iniciada la infusión de glucosa. La concentración máxima de insulina alcanzó los  $49,46 \pm 8,99 \mu\text{UI/ml}$  en las hembras del grupo control y  $63,57 \pm 12,70 \mu\text{UI/ml}$  en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona, siendo comparable esta variable entre los grupos ( $P=0,3857$ ). Si bien, la dinámica de la secreción de insulina estimulada por glucosa en el grupo de hembras-T fue mayor que en las hembras-C, al realizar la comparación estadística no se evidenciaron diferencias entre los grupos durante todo el ensayo (Gráfico 52). Por esto, al comparar el promedio de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV entre ambos grupos no se evidenció una diferencia en esta variable ( $P=0,3078$ ), siendo en las hembras-C  $36,34 \pm 6,87 \mu\text{UI/ml}$  y  $48,53 \pm 9,03 \mu\text{UI/ml}$  en las hembras-T.

Gráfico 52: Dinámica y promedio de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.

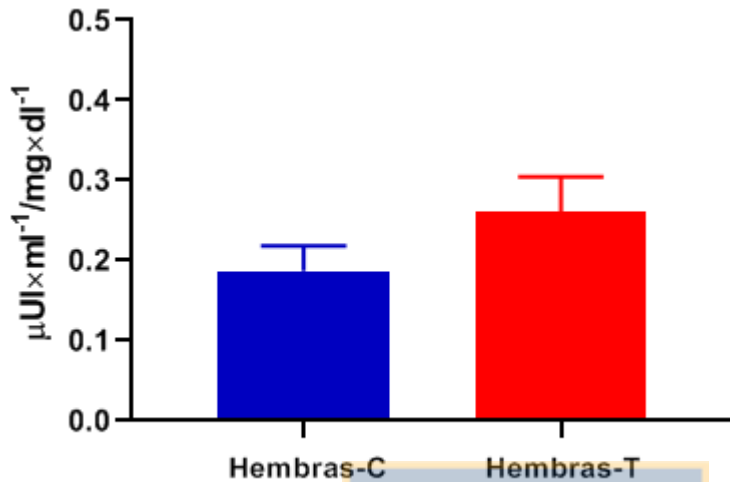


### Relación Insulina/Glucosa

La relación insulina/glucosa basal fue  $0,26 \pm 0,04 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} / \text{mg} \times \text{dl}^{-1}$  en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona y  $0,19 \pm 0,03 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} / \text{mg} \times \text{dl}^{-1}$  en el grupo de hembras control, si bien este índice fue mayor en el grupo de hembras-T, la diferencia no alcanzó a ser estadísticamente significativa ( $P=0,1980$ , Gráfico 53).



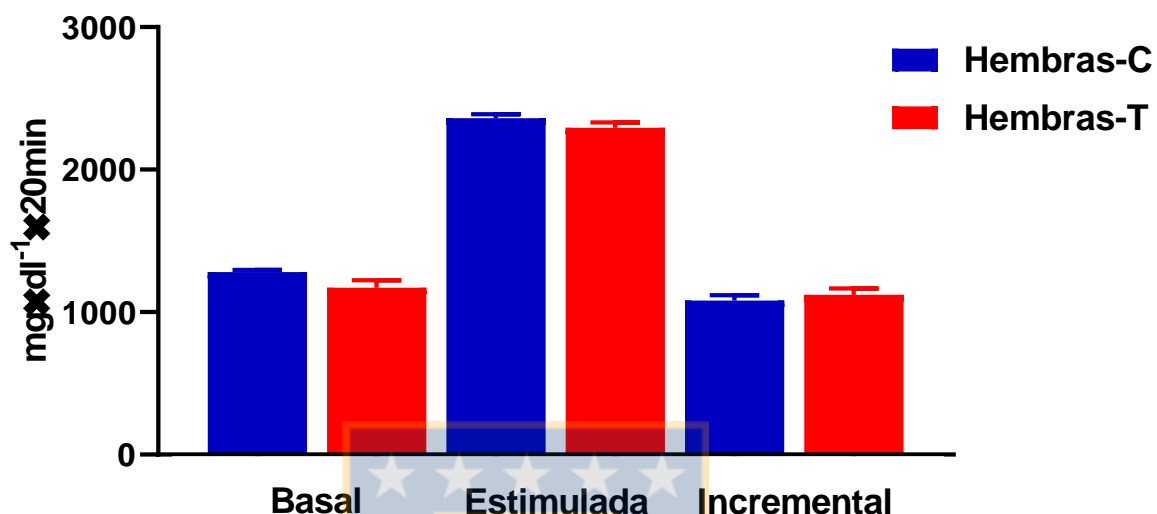
Gráfico 53: Relación insulina/glucosa basal en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.



#### Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de glucosa

El ABC basal de la concentración plasmática de glucosa presentó una tendencia a ser mayor en el grupo de hembras-C al compararlas con las hembras-T ( $P=0,0674$ ), en las hembras control esta variable alcanzó los  $1281,50 \pm 14,15 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  y en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona los  $1172,43 \pm 51,26 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$ . Tras el inicio de la infusión de glucosa aumentó la concentración plasmática de este carbohidrato en ambos grupos. El ABC estimulada en las hembras-C fue  $2361,85 \pm 27,25 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$  y en las hembras-T  $2293,13 \pm 38,66 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$ , siendo similar entre los grupos ( $P=0,1769$ , Gráfico 54). De la misma forma, al comparar el ABC incremental de la concentración plasmática de glucosa durante este TTGEV no hubo una diferencia significativa entre los grupos ( $P=0,4848$ ), a pesar de ser ligeramente mayor en el grupo de hembras-T ( $1120,70 \pm 46,50 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$ ) respecto a las hembras-C ( $1080,36 \pm 37,90 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1} \times 20\text{min}$ ).

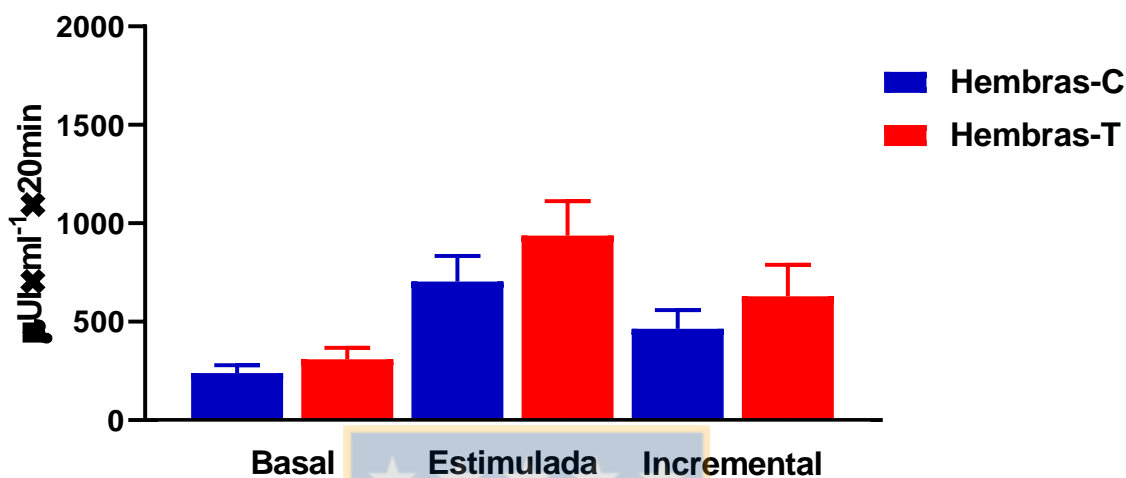
Gráfico 54: Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV tras la administración crónica de testosterona en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad.



#### Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de insulina

El ABC basal de la concentración plasmática de insulina en el grupo de hembras-T fue  $309,24 \pm 57,94 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  y en las hembras-C  $239,20 \pm 40,43 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$ , siendo similar entre los grupos experimentales ( $P=0,3449$ ). Tras la infusión de glucosa, aumentó la secreción de insulina alcanzando el ABC estimulada los  $938,08 \pm 175,00 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  en el grupo de hembras control y en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona esta variable alcanzó los  $703,41 \pm 130,80 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  sin presentar diferencias entre los grupos ( $P=0,3080$ , Gráfico 55). Finalmente, el ABC incremental fue similar entre los grupos ( $P=0,3976$ ), siendo en las hembras-C  $464,21 \pm 95,30 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$  y en las hembras-T  $628,85 \pm 160,10 \mu\text{UI} \times \text{ml}^{-1} \times 20\text{min}$ .

Gráfico 55: Área bajo la curva basal, estimulada e incremental de la concentración plasmática de insulina durante el TTGEV en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.



#### ISI-Composite

El ISI-Composite fue similar al realizar la comparación entre los grupos experimentales ( $P=0,4026$ ), siendo en el grupo de hembras control  $6,53 \pm 1,38$  y en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona  $5,14 \pm 0,81$  (Gráfico 56).

#### ISI-Grulet

El ISI-Grulet no presentó diferencias significativas tras la administración crónica de testosterona en hembras de 38 semanas de edad ooforectomizadas ( $P=0,3942$ ), siendo en el grupo de hembras-C  $0,59 \pm 0,01$  %/min y en las hembras-T  $0,62 \pm 0,03$  %/min (Gráfico 57).

Gráfico 56: ISI-Composite durante el TTGEV en ovejas adultas ooforectomizadas de 38 semanas de edad control y EPT tras la administración crónica de testosterona.

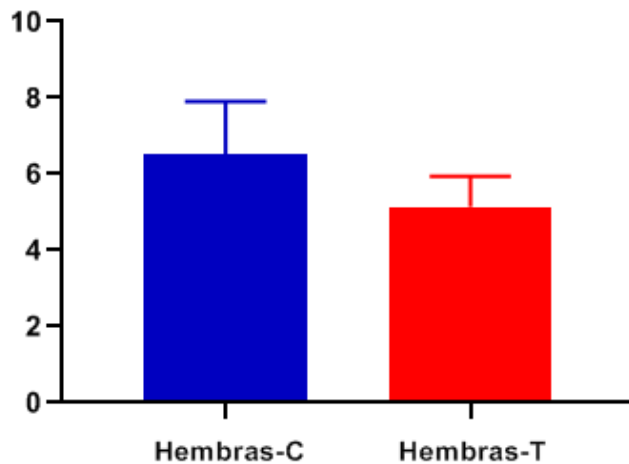
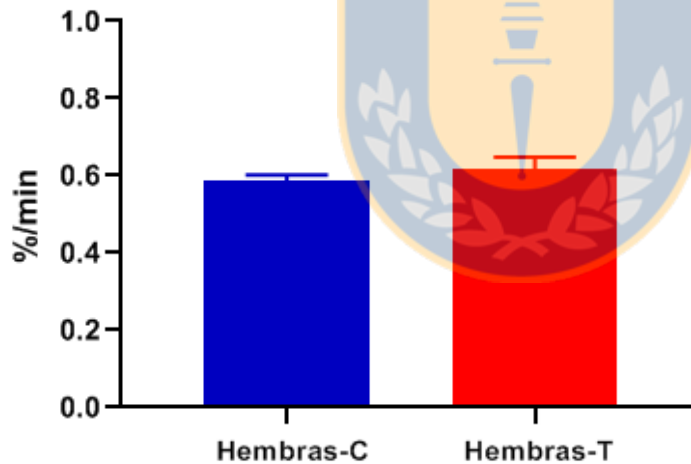


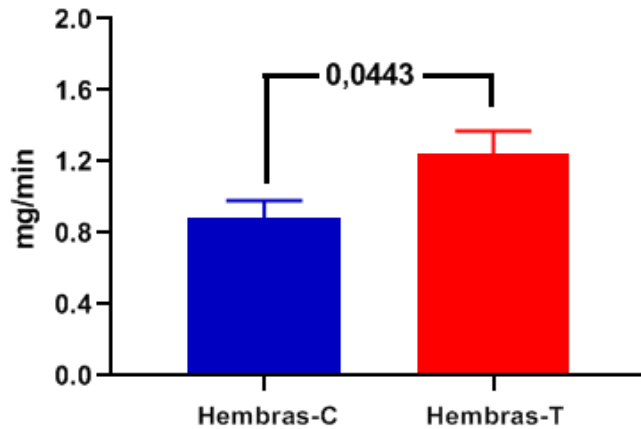
Gráfico 57: ISI-Grulet en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas de 38 semanas de edad tras la administración crónica de testosterona.



### Tasa de Desaparición de la Glucosa

Tras 8 semanas de administración crónica de testosterona en hembras ovinas ooforectomizadas de 38 semanas de edad, la tasa de desaparición de la glucosa durante el test de tolerancia a la glucosa endovenosa fue significativamente mayor ( $P=0,0443$ ) en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona siendo  $1,25 \pm 0,12$  mg/min y, en el grupo de hembras control, fue  $0,88 \pm 0,10$  mg/min (Gráfico 58).

Gráfico 58: Tasa de desaparición de la glucosa en hembras-C y hembras-T ooforectomizadas tras la administración crónica de testosterona.

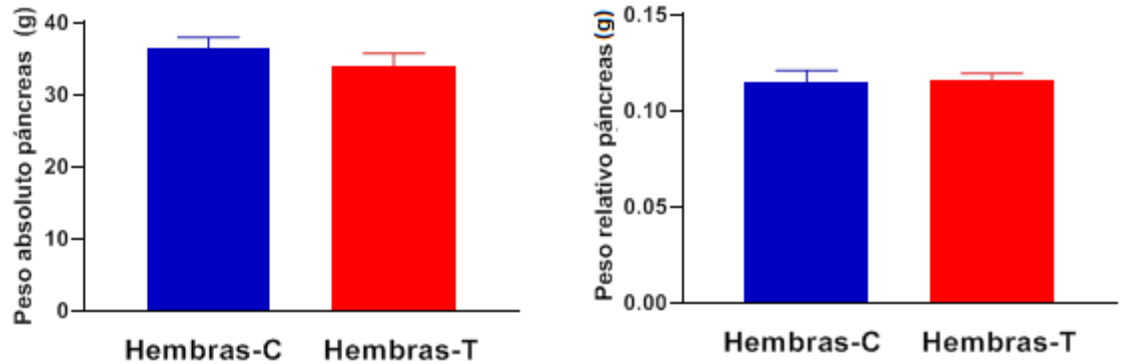


### Efecto de la administración crónica de testosterona sobre la estructura del páncreas y la secreción y producción de insulina estimulada por glucosa

#### Peso páncreas

A las 38 semanas de edad y 48 horas tras el último test de tolerancia a la glucosa endovenosa las hembras fueron eutanasiadas y el páncreas fue removido para los estudios morfológicos y moleculares. Una vez que se removieron los linfonódulos y otros tejidos, el peso absoluto del páncreas en el grupo de hembras control fue  $36,50 \pm 1,49$  g y en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona fue  $33,97 \pm 1,77$  g, al comparar entre los grupos experimentales no se presentó una diferencia en esta variable ( $P=0,2955$ , Gráfico 59). Al comparar entre grupos el porcentaje del peso corporal que representa el páncreas no se evidenciaron diferencias ( $P=0,4444$ ), correspondiendo al  $0,1147 \pm 0,006\%$  del peso vivo en las hembras-C y al  $0,1160 \pm 0,003\%$  del peso vivo en las hembras-T.

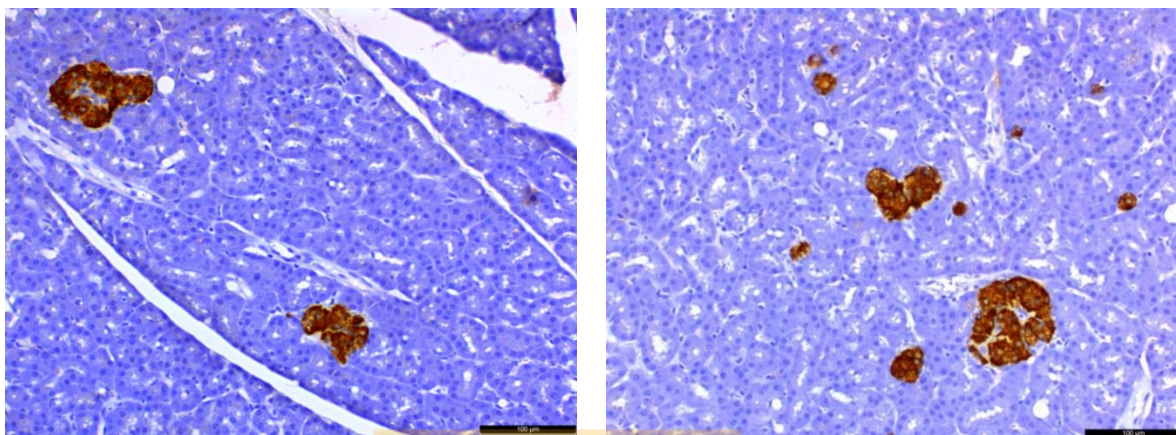
Gráfico 59: Peso absoluto (izquierda) y relativo (derecha) del páncreas en hembras ovinas adultas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 38 semanas de edad.



### Análisis morfométrico

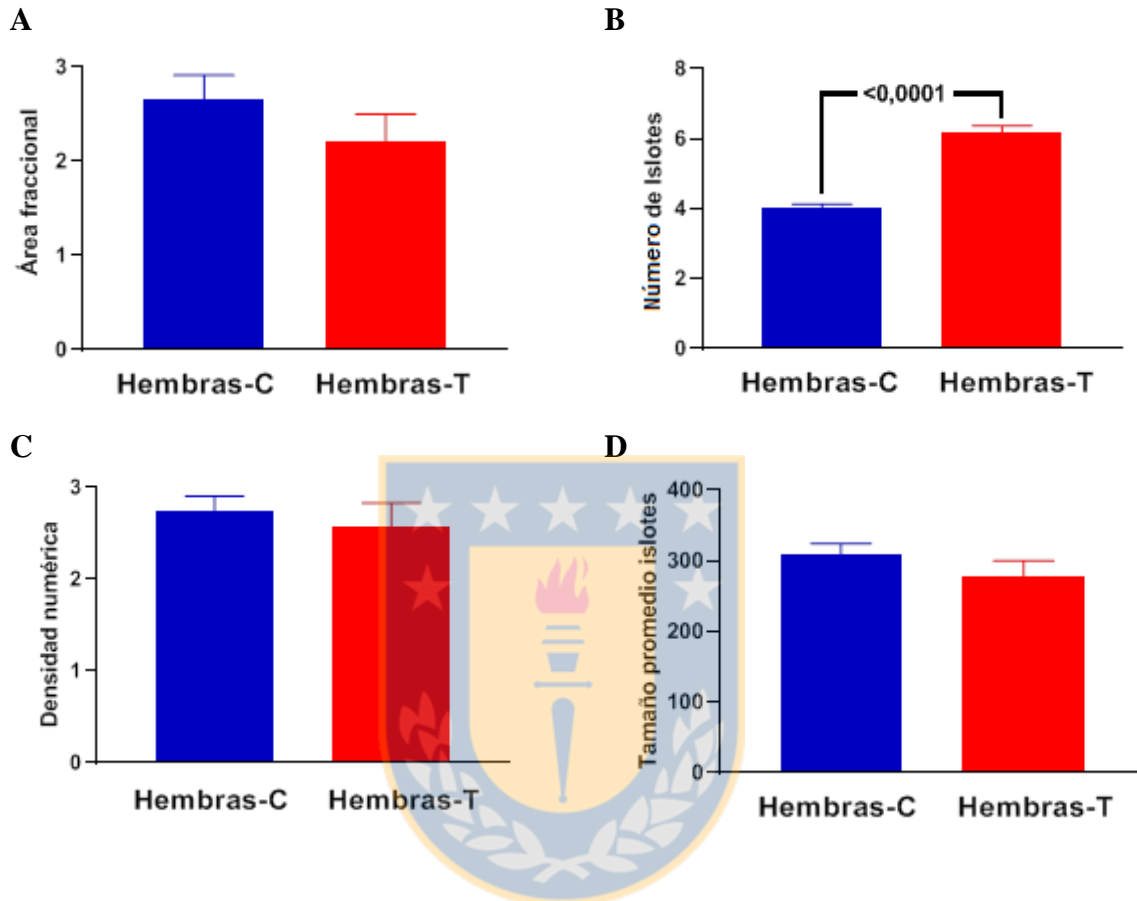
Al realizar los ensayos morfológicos, se evidenció que el número de islotes por campo es mayor en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona al compararlas con las hembras control. Si bien, en las hembras-T se observó un número mayor de islotes, la mayor parte de estos fueron de pequeño tamaño conformados principalmente por 6-12 células  $\beta$  altamente inmunorreactivas a insulina y, además, algunas células  $\beta$  aisladas o en grupos de menor tamaño (2-4 células) cercanas a los conductos principalmente (imagen no mostrada). Además, en los islotes de mayor tamaño se evidenció un gran número de células que presentan núcleos con cromatina muy densa y citoplasma homogéneo, que no presentan inmunorreactividad a insulina, glucagón o somatostatina (Figura 6). En cambio, en las hembras control se presentaron islotes de diferentes tamaños, principalmente de tamaño medio, altamente conservados en estructura y con un gran número de células inmunorreactivas a insulina en la parte central.

Figura 3: Imágenes representativas de un corte histológico pancreático en hembras control (izquierda) y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (derecha) de 38 semanas de edad con inmunotinción contra insulina (barra=100µm).



El área fraccional (Área total de los islotes/Área total cuantificada) que permite determinar el área que representan, dentro del tejido pancreático, los islotes de Langerhans fue similar al comparar entre los grupos ( $P=0,2730$ ), siendo  $2,02 \pm 0,44$  en las hembras-C y  $1,89 \pm 0,62$  en las hembras-T (Gráfico 60, panel A). El número de islotes (número de islotes por área o sección) fue significativamente mayor ( $P<0,0001$ ) en el grupo de hembras expuestas a un exceso de testosterona, siendo  $6,16 \pm 0,21$  y en las hembras control  $4,01 \pm 0,12$  (Gráfico 60, panel B). La densidad numérica, es decir, el cociente entre el promedio del número de islotes pancreáticos visualizados en una sección de tejido pancreático y el promedio del diámetro mayor de los islotes observados, no presentó diferencias entre ambos grupos ( $P=0,5960$ ) siendo  $2,74 \pm 0,16$  en el grupo de hembras control y  $2,57 \pm 0,26$  en el grupo de hembras-T (Gráfico 60, panel C). Finalmente, el tamaño promedio de los islotes que corresponde al cociente entre el recuento total de islotes y el área total de los mismos, no presentó diferencias entre los grupos ( $P=0,2671$ ), siendo  $308,17 \pm 16,12$  en las hembras-C y  $276,89 \pm 22,94$  en el grupo de hembras EPT (Gráfico 60, panel D).

Gráfico 60: Área fraccional (panel A), número los islotes (panel B), densidad numérica (panel C) y tamaño promedio de los islotes pancreáticos (panel D) en hembras ovinas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 38 semanas de edad.

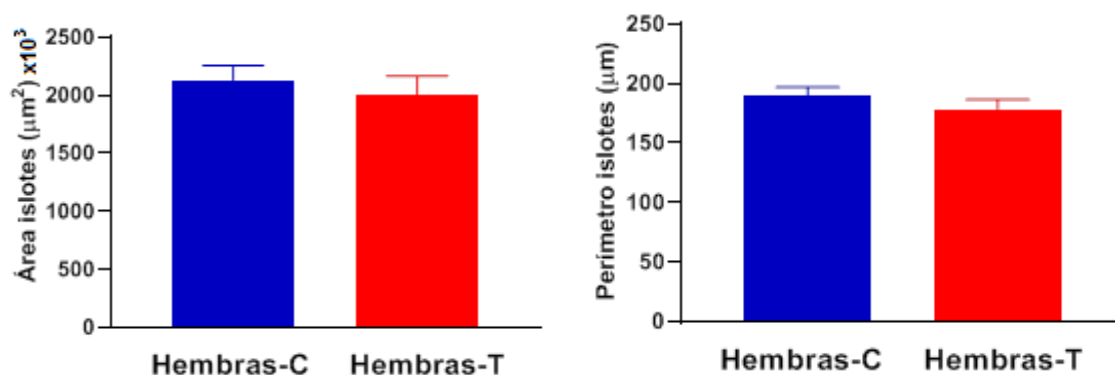


### Área y perímetro de los islotes

Al comparar histológicamente el área y perímetro de los islotes se observó que el área de los islotes fue similar entre los grupos ( $P=0,7330$ ), siendo en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona  $2002,07 \pm 164,3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  y en las hembras control  $2130,12 \pm 123,1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ . Asimismo, al comparar el perímetro de los islotes, este fue similar entre los grupos ( $P=0,6905$ ), en las hembras-T esta variable fue  $178,47 \pm 7,86 \mu\text{m}$  y en las hembras-C fue  $189,90 \pm 6,84 \mu\text{m}$ .

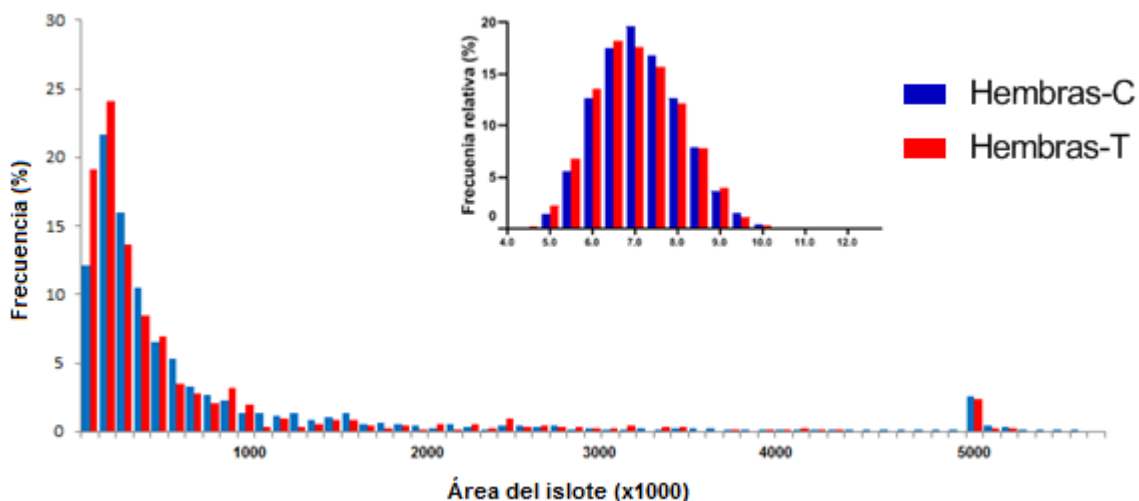


Gráfico 61: Área (izquierda) y perímetro (derecha) de los islotes de Langerhans en hembras-C y hembras-T de 38 semanas de edad.



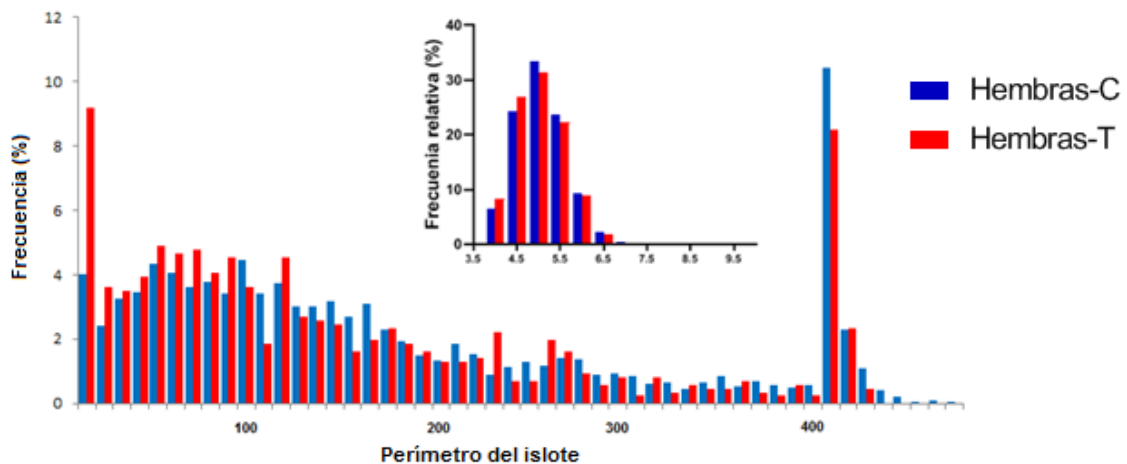
Al graficar la distribución numérica y porcentual del área y perímetro de los islotes se evidencia que las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona presentan un gran número de islotes de área pequeña ( $100-400 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ), en cambio en las hembras del grupo control el mayor número de islotes presentan un área ligeramente mayor ( $300-600 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ , Gráfico 62). Sin embargo, al graficar la frecuencia relativa del área de los islotes normalizada (logaritmo del área), no se evidencian diferencias entre los grupos.

Gráfico 62: Frecuencia numérica (izquierda) y porcentual (panel pequeño) del área de los islotes de Langerhans en hembras ovinas de 38 semanas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.



De la misma forma, al graficar la distribución numérica y porcentual del perímetro de los islotes, se evidenció que en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona aumentó significativamente el número de islotes de perímetro pequeño (10-110  $\mu\text{m}$ ) y, respecto a los islotes de mayor perímetro, estas presentaron un menor número de esos islotes (500-1200  $\mu\text{m}$ ). En cambio, en el grupo de hembras control el número de islotes presentó una distribución más homogénea en aquellos de menor perímetro (10-170  $\mu\text{m}$ ); sin embargo, en el rango comprendido entre los 100-200  $\mu\text{m}$  presentaron un mayor número de estos islotes. Respecto a los islotes de mayor perímetro (500-1200  $\mu\text{m}$ ) presentaron un gran número de estos islotes a diferencia de lo que ocurre en el grupo de hembras-T, principalmente en el rango comprendido entre los 800-1200  $\mu\text{m}$  al compararlas con las hembras-T. Estas últimas presentaron menos islotes de gran perímetro (Gráfico 63). Al graficar la frecuencia relativa de los islotes normalizada se puede observar lo que anteriormente se menciona, esto es que el grupo de hembras-T presentó un alto porcentaje de islotes de bajo perímetro, en cambio el grupo de hembras-C presentaron islotes de mayor tamaño.

Gráfico 63: Frecuencia numérica (izquierda) y porcentual (panel pequeño) del perímetro de los islotes en hembras ovinas de 38 semanas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.

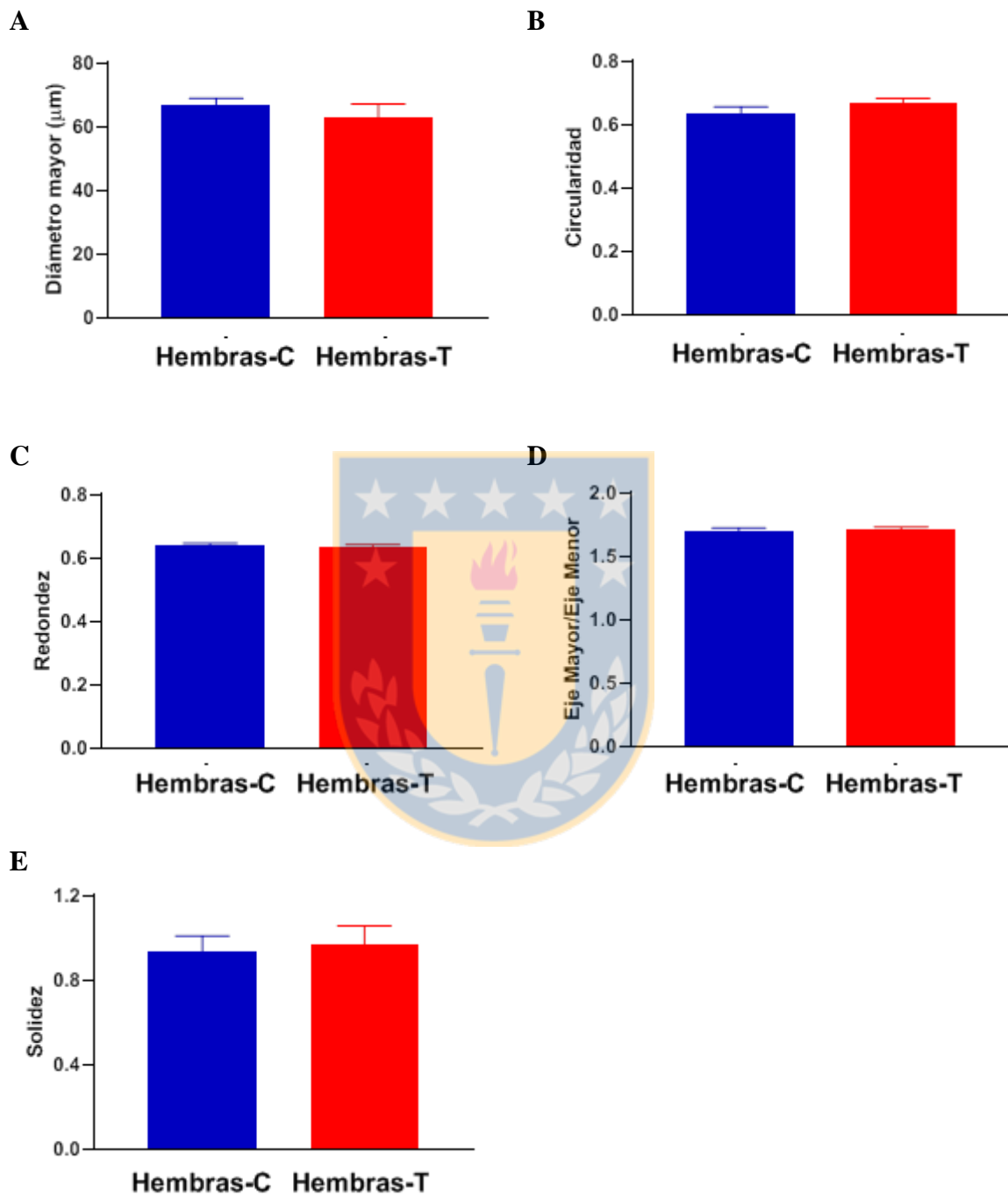


Con respecto a los análisis de la forma de los islotes, el diámetro mayor fue  $66,71 \pm 2,25$   $\mu\text{m}$  en el grupo de hembras control y  $62,98 \pm 4,27$   $\mu\text{m}$  en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona, siendo esta variable similar entre los grupos ( $P=0,4037$ ). La circularidad [ $4\pi(\text{área}/\text{perímetro}^2)$ ], una medida que oscila entre 1 (círculo perfecto) y 0 (polígono elongado), fue  $0,64 \pm 0,02$  en las hembras-C y  $0,67 \pm 0,01$  en las hembras-T, sin diferencias al comparar ambos grupos ( $P=0,1949$ ).

La redondez [ $(4 \times \text{área})/(\pi \times \text{eje mayor}^2)$ ] fue similar entre los grupos ( $P=0,6905$ ) siendo  $0,64 \pm 0,008$  en las hembras-C y  $0,64 \pm 0,005$  en las hembras-T (Gráfico 64). La relación de aspecto [Eje Mayor/Eje Menor] también fue una variable que no presentó diferencias al comparar entre los grupos experimentales ( $P=0,7481$ ), siendo  $1,70 \pm 0,03$  en las hembras-C y  $1,71 \pm 0,02$  en las hembras-T. Finalmente, la solidez [área/área convexa], fue  $0,94 \pm 0,07$  en las hembras del grupo control y  $0,97 \pm 0,09$  en las hembras-T y no presentó diferencias entre los grupos ( $P=0,1339$ ).



Gráfico 64: Índices morfológicos de los islotes pancreáticos en hembras ovinas de 38 semanas control y EPT.



### **Determinación de poblaciones celulares dentro del islote**

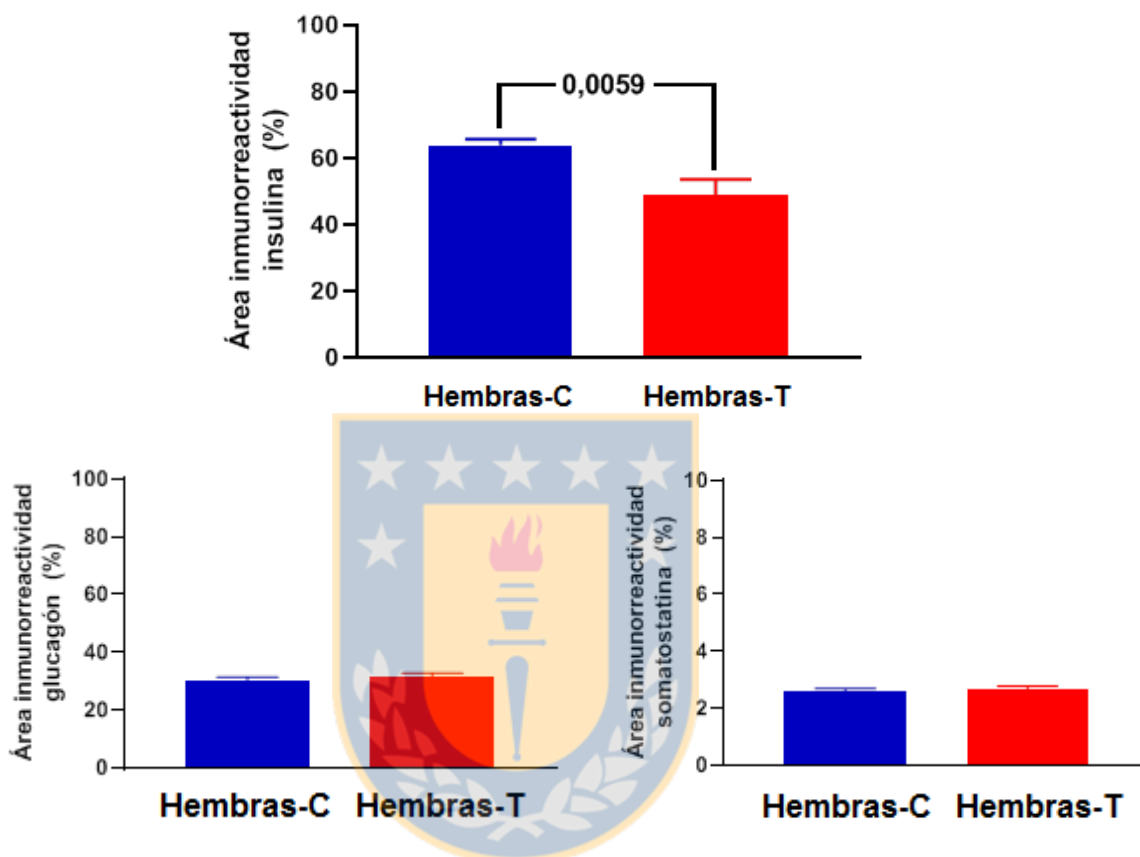
Respecto al área porcentual que ocupan las células  $\beta$  dentro del islote, en las hembras control fue  $63,72 \pm 1,87\%$  (rango 55,97-76,61), en cambio en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona fue  $48,76 \pm 4,81\%$  (rango 29,70-40,86). Al comparar ambos grupos el área inmunorreactiva a insulina (células  $\beta$ ) fue significativamente menor en el grupo de hembras-T ( $P=0,0059$ ).

A pesar de la disminución del área que representan las células  $\beta$  del total del islote, no hubo una variación en las otras poblaciones celulares evaluadas. El área inmunorreactiva a glucagón (células  $\alpha$ ) fue similar entre los grupos ( $P=0,4461$ ), siendo  $30,28 \pm 1,06\%$  (rango 25,81-36,91) en las hembras control y  $31,56 \pm 1,27\%$  (rango 26,17-37,98) en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.

En relación a la inmunoreactividad a somatostatina (células  $\delta$ ) no se presentó una diferencia entre los grupos ( $P=0,7238$ ), representando esta población celular el  $2,57 \pm 0,12\%$  (rango 1,98-3,20) en las hembras-C y  $2,64 \pm 0,14\%$  (rango 1,87-3,03) en las hembras-T (Gráfico 65).

Se realizaron inmunotinciones para determinar el área porcentual que ocupaban en el interior de los islotes de Langerhans las células inmunorreactivas a grelina (células  $\epsilon$ ) y al polipéptido pancreático (células PP o  $\gamma$ ), pero los datos no fueron reproducibles debido a la inexistencia de anticuerpos específicos para la especie ovina.

Gráfico 65: Área inmunorreactiva a insulina (panel superior), glucagón (panel inferior-izquierda) y somatostatina (panel inferior-derecha) en islotes pancreáticos de ovejas a las 38 semanas de edad control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.



### Proporción y distribución de las poblaciones celulares en los islotes

Respecto a la distribución de los distintos tipos celulares en el interior de los islotes de Langerhans, en las hembras control no se evidenciaron modificaciones o se presentaron ligeros cambios en la arquitectura de los islotes, principalmente células  $\beta$  que se organizaron en la periferia del islote. En cambio, en los islotes de las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona, se evidenció una severa alteración en la estructura de los islotes, principalmente por la aparición de pequeños agregados de células  $\beta$  (4-6 células) con una alta inmunorreactividad a insulina. En los islotes de Langerhans de tamaño medio ( $>200\mu\text{m}^2$ ) se observó que las células  $\beta$  ocupan un posición periférica y, de

la misma forma, las células  $\alpha$  y  $\delta$  se aprecian en la periferia, pero también en la parte central de los islotes (Figura 4). En los islotes de mayor tamaño ( $>500\mu\text{m}^2$ ), en las hembras-T, se pudo observar grandes agregados de células que no presentaron inmunorreactividad a insulina, glucagón o somatostatina (Figura 5 y 6).

Figura 4: Imágenes representativas de inmunohistoquímica en secciones pancreáticas (40x) con inmunorreactividad a insulina (superior) y glucagón (inferior) en hembras ovinas de 38 semanas control (izquierda) y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (derecha) barra =100 $\mu\text{m}$ .

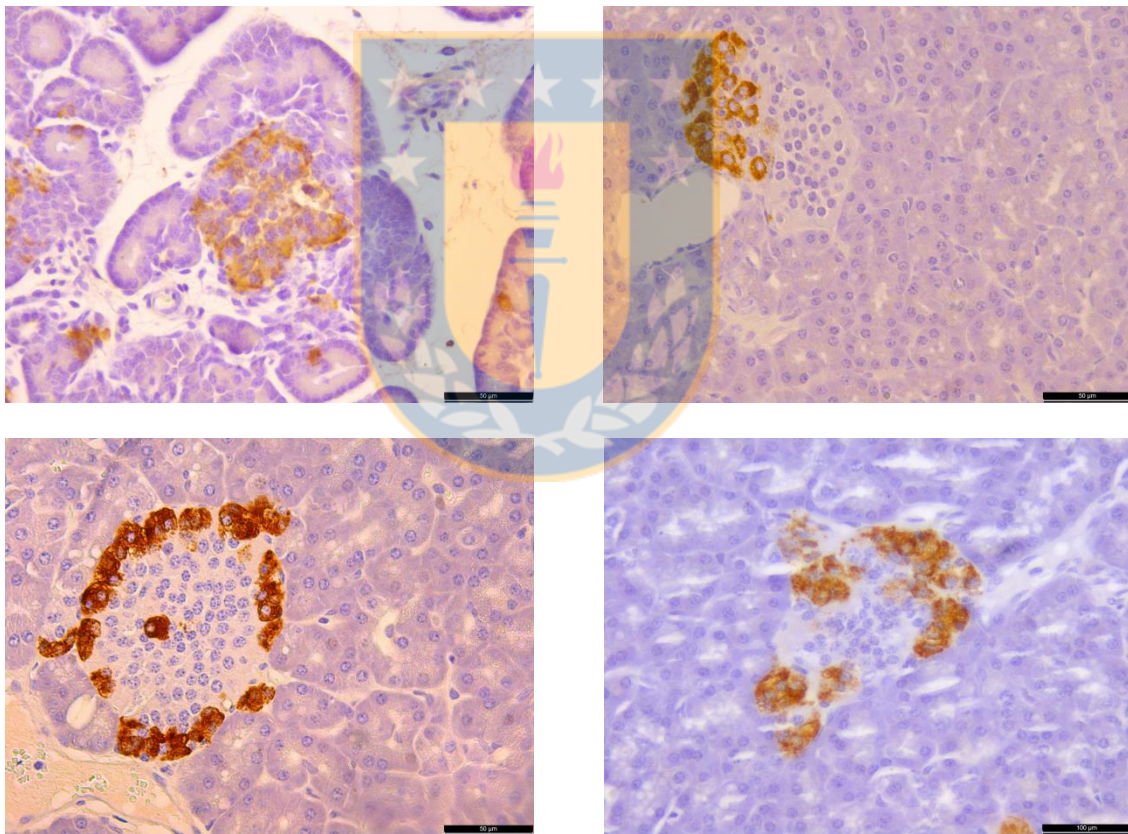


Figura 5: Imágenes representativas de islotes de Langerhans en hembras-C. Inmunorreactividad de las distintas poblaciones celulares en distintas secciones del tejido pancreático (rojo: insulina; verde: glucagón; lila: somatostatina; azul: DAPPI), las flechas lilas indican células  $\delta$  en el interior de los islotes. Panel A, C y D 10x, panel B: imagen aumentada del islote presente en el panel A (20x).

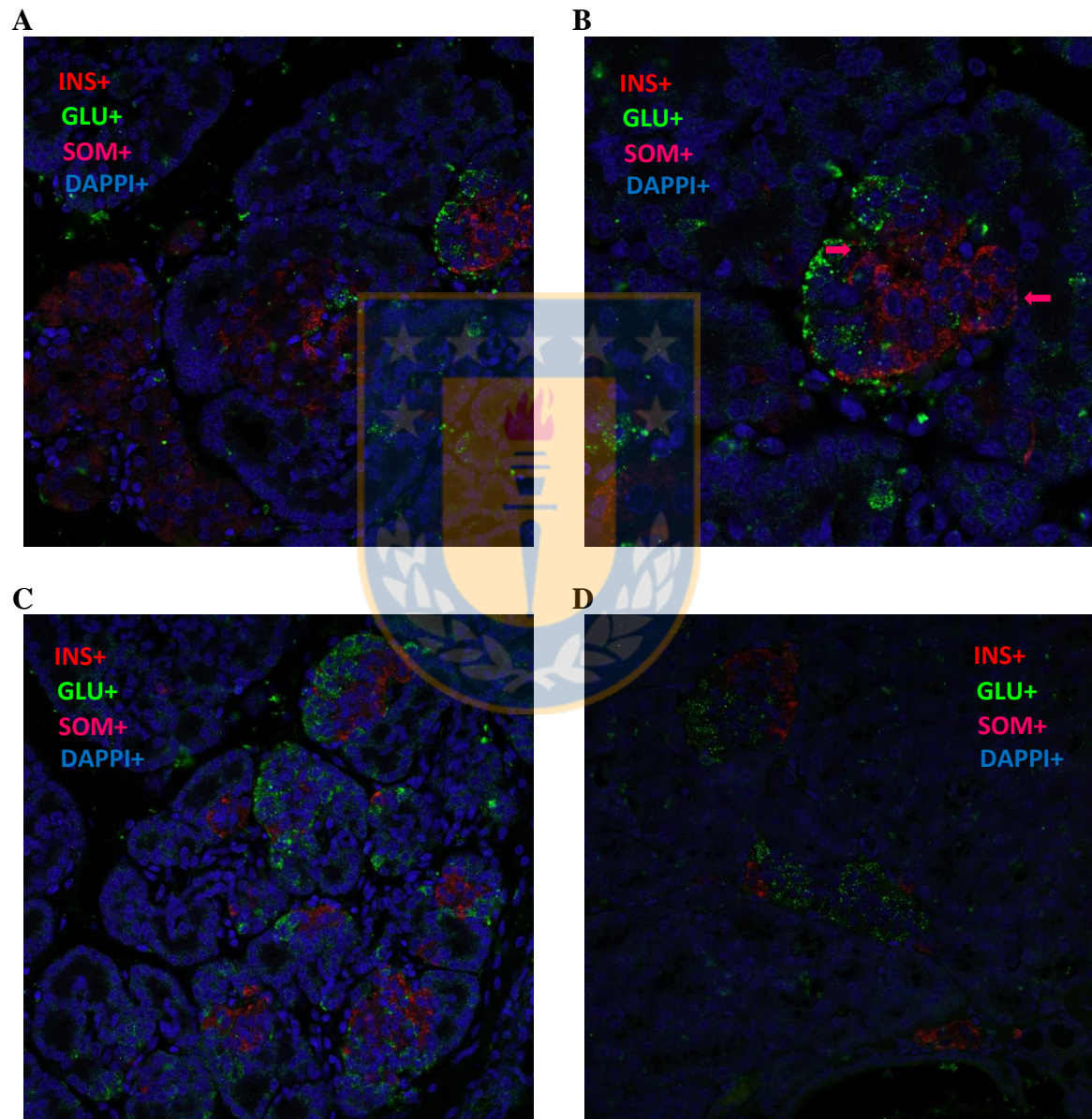
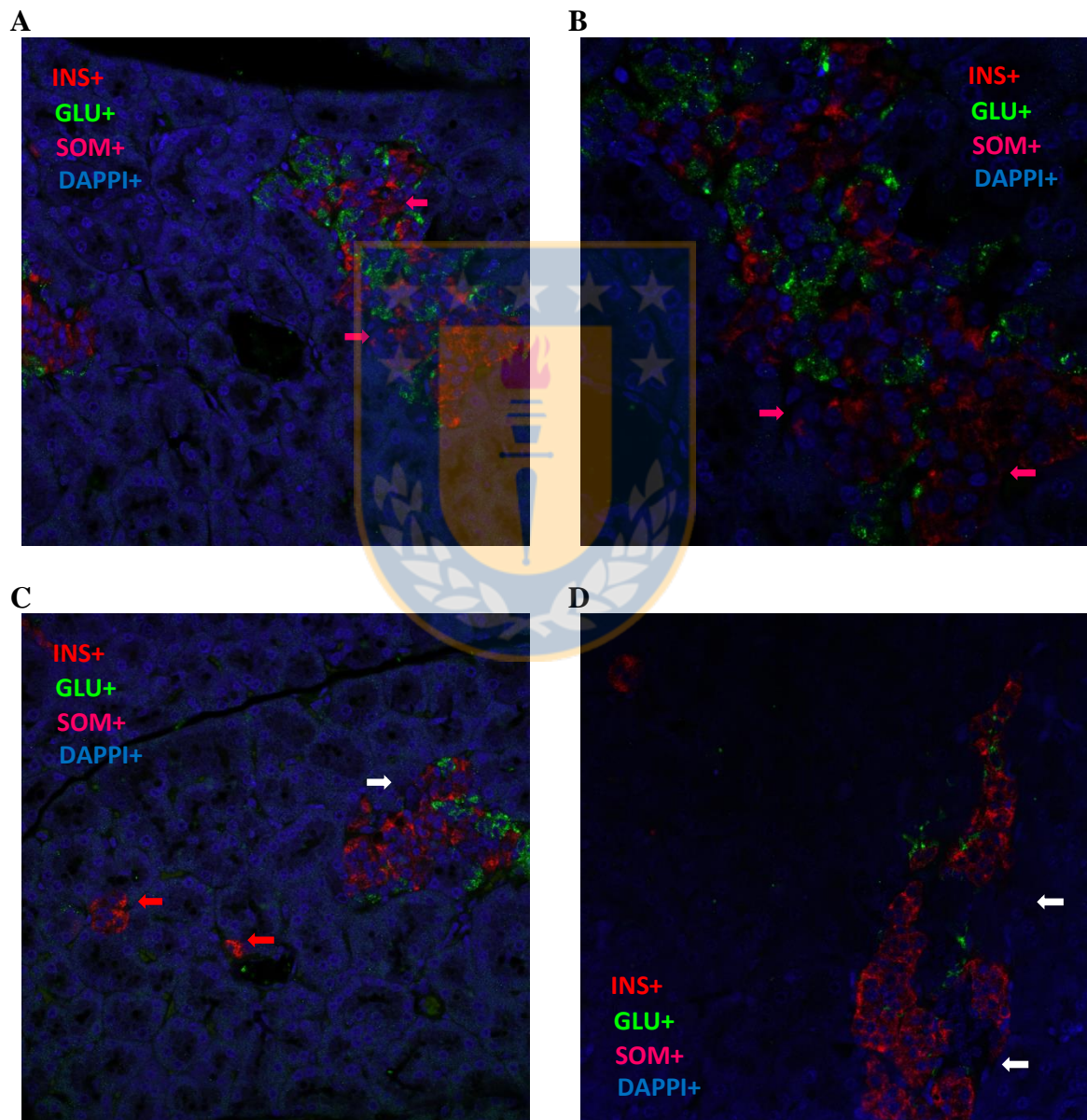


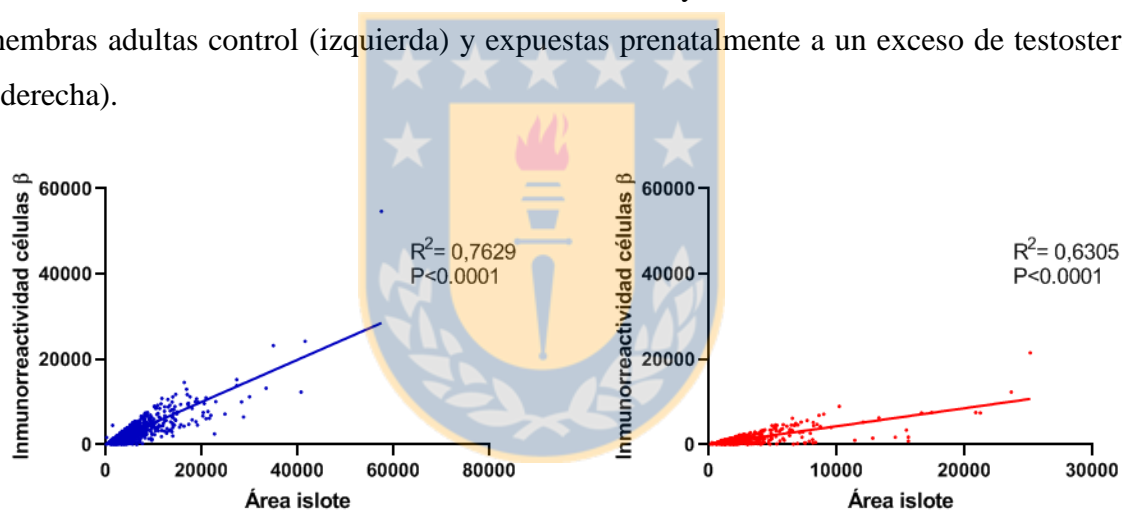


Figura 6: Imágenes representativas de islotes pancreáticos en hembras-T. Inmunorreactividad de las distintas poblaciones celulares en secciones del tejido pancreático (rojo: insulina; verde: glucagón; lila: somatostatina; azul: DAPPI), las flechas lilas indican células  $\delta$  en el interior de los islotes, flechas blancas indican grupos de células que no presentan inmunorreactividad a insulina, glucagón o somatostatina; flechas rojas indican pequeñas agrupaciones de células  $\beta$  libres o cercanas a los vasos sanguíneos.



Al correlacionar el área inmunorreactiva de las células  $\beta$  pancreáticas con el área del islote de Langerhans, tanto en las hembras-C como en las hembras-T hubo una correlación positiva, es decir, en la medida que aumenta el área de los islotes aumenta la proporción que ocupan en el interior de este las células  $\beta$  ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, en las hembras-T el coeficiente de determinación es menor ( $R^2 = 0,6305$ ) que en las hembras-C ( $R^2 = 0,7629$ ) lo que se debe a que en ellas, los islotes de mayor área, presentaron zonas en las que las células no presentaron inmunorreactividad a insulina, glucagón o somatostatina (Gráfico 66). Además, en algunos casos se observaron grandes islotes con células sin inmunorreactividad a ninguna de las hormonas evaluadas.

Gráfico 66: Correlación entre el área de los islotes y área inmunorreactiva a insulina en hembras adultas control (izquierda) y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (derecha).

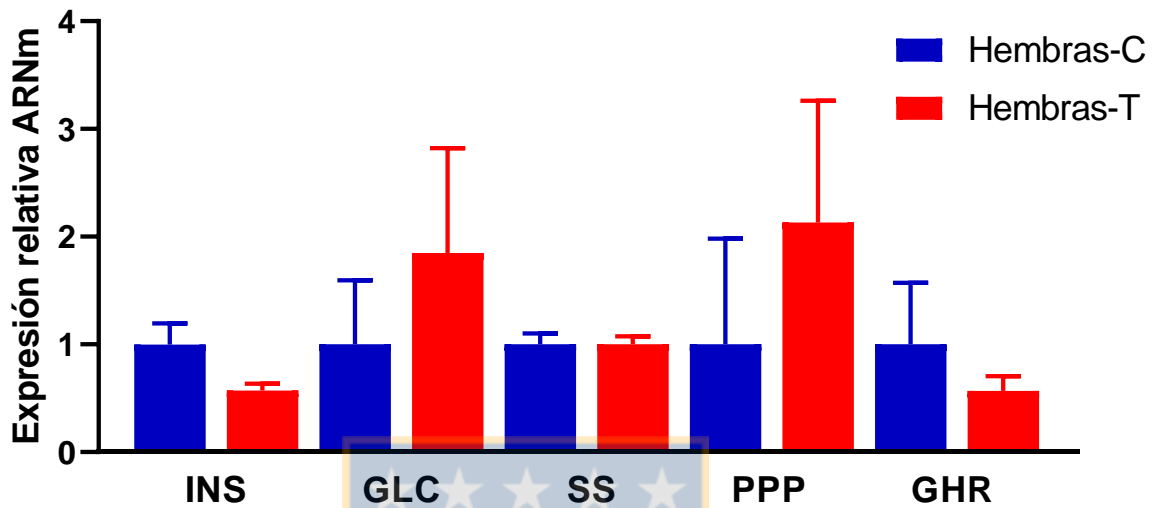


## Análisis de expresión génica

### Expresión del ARNm de las hormonas sintetizadas en los islotes

La expresión del ARNm para glucagón (GLC), somatostatina (SS), polipéptido pancreático (PPP) y grelina (GHR) no presentó diferencias entre los grupos experimentales ( $P = 0,1905$ ;  $P = 0,9968$ ;  $P > 0,9999$ ;  $P = 0,7223$ , respectivamente). Respecto a la expresión del ARNm de insulina, sólo se presentó una tendencia a ser menor en las hembras-T respecto a las hembras-C ( $P = 0,0690$ ; Gráfico 67).

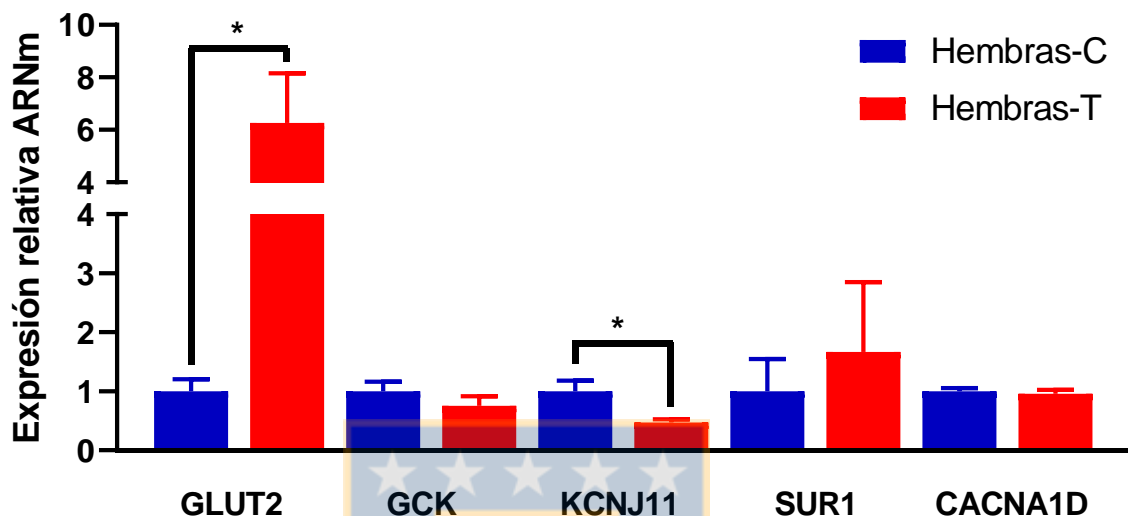
Gráfico 67: Expresión relativa del ARNm de insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina en tejido pancreático total en hembras ovinas adultas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.



#### Determinación de la expresión del ARNm de proteínas involucradas en la secreción de insulina estimulada por glucosa

La expresión del ARNm de glucoquinasa (GKC), subunidad D del canal de calcio voltaje dependiente (CACNA1D) y subunidad reguladora o receptor de sulfonilureas (SUR1) fue similar al comparar entre las hembras control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (Gráfico 68). La expresión del ARNm del transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2) aumentó significativamente ( $P=0,0194$ ) en el grupo de hembras-T al compararlas con las hembras-C, en cambio la expresión del ARNm de la subunidad rectificadora, que forma el poro del canal de potasio sensible al ATP (KCNJ11), disminuyó significativamente en el grupo de hembras-T ( $P=0,0099$ ) comparado con el grupo de hembras control.

Gráfico 68: Expresión de ARNm de GLUT2, glucoquinasa (GCK), KCNJ11, SUR1 y CACNA1D en hembras ovinas control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 38 semanas de edad.

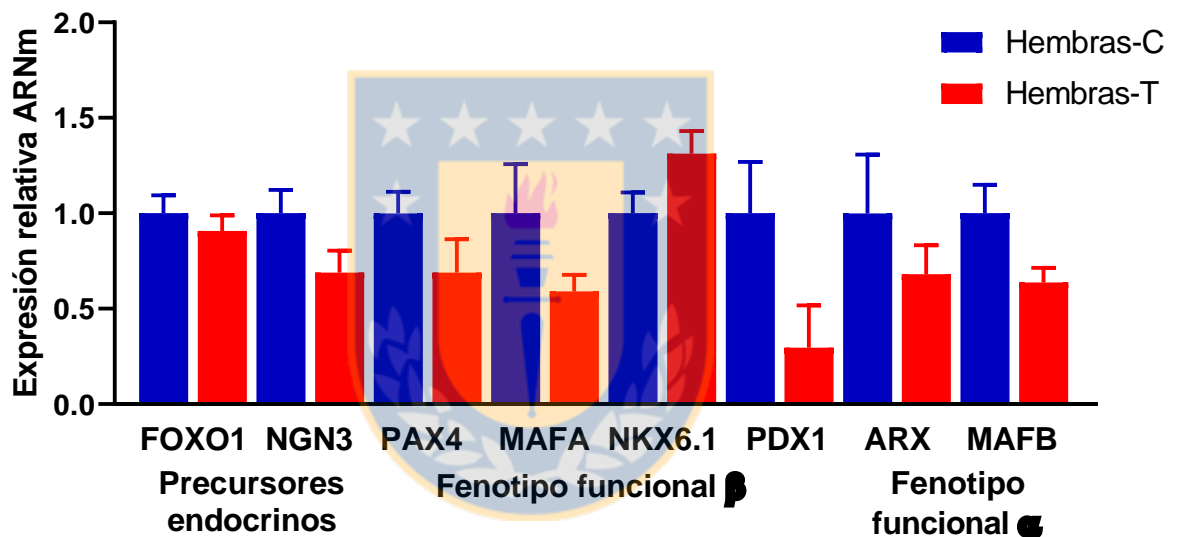


### Determinación de la expresión del ARNm de los factores de transcripción relacionados con la mantención de los fenotipos celulares

La expresión del ARNm de los factores de transcripción que se relacionan con la divergencia entre la diferenciación hacia un fenotipo endocrino (FOXO1 y NGN3) fue similar en ambos grupos de hembras, no se evaluó la expresión de otros factores relacionados con la diferenciación hacia el fenotipo exocrino. Respecto a la expresión del ARNm de los factores de transcripción involucrados en la expresión del gen de insulina y, por tal, la mantención del fenotipo funcional  $\beta$  no se presentó una diferencia al realizar la comparación entre grupos (PAX4 y MAFA), salvo que la expresión de NKX6.1 presentó una tendencia a ser mayor en el grupo de hembras-T ( $P=0,0753$ ) y PDX1 tuvo una tendencia a ser menor con respecto a las hembras-C ( $P=0,0952$ ). Respecto a los factores de transcripción importantes para la expresión del gen de glucagón y, por ello, la mantención del fenotipo funcional  $\alpha$ , la expresión de ARX fue similar entre los grupos ( $P=0,7223$ ) y sólo se presentó una tendencia ( $P=0,0556$ ) a que la expresión del ARNm de MAFB fuese

mayor en el grupo de hembras-C al compararlas con las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (Gráfico 69).

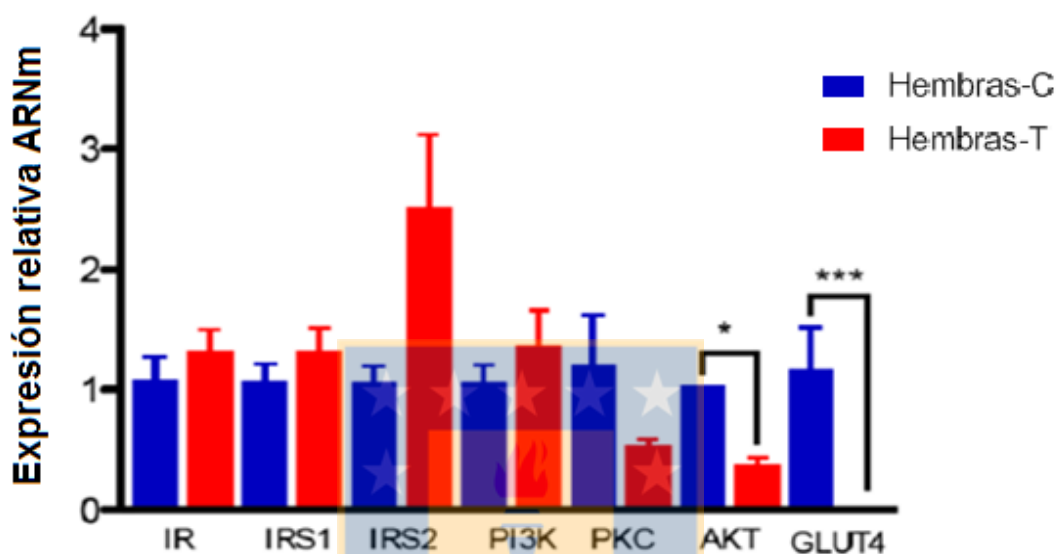
Gráfico 69: Expresión del ARNm de los factores de transcripción involucrados en la diferenciación endocrina (FOXO1, NGN3) y en la mantención del fenotipo funcional  $\alpha$  (ARX, MAFB) y  $\beta$  (PAX4, MAFA, NKX6.1) en tejido pancreático total en hembras adultas de 38 semanas de edad control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.



### Determinación de la expresión de ARNm de las proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina

La expresión del ARNm de IR, IRS-1, IRS-2, PI3K y PKC fue similar entre los grupos experimentales ( $P > 0,05$ ). En cambio, la expresión de AKT y GLUT4 fue significativamente menor en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (Gráfico 70).

Gráfico 70: Expresión de ARNm del receptor de insulina (IR), substratos del receptor de insulina (IRS1 y 2), fosfatidilinositol-3 kinasa, proteína kinasa C, AKT, transportador de glucosa tipo 4 en hembras ovinas a las 38 semanas de edad control y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona.

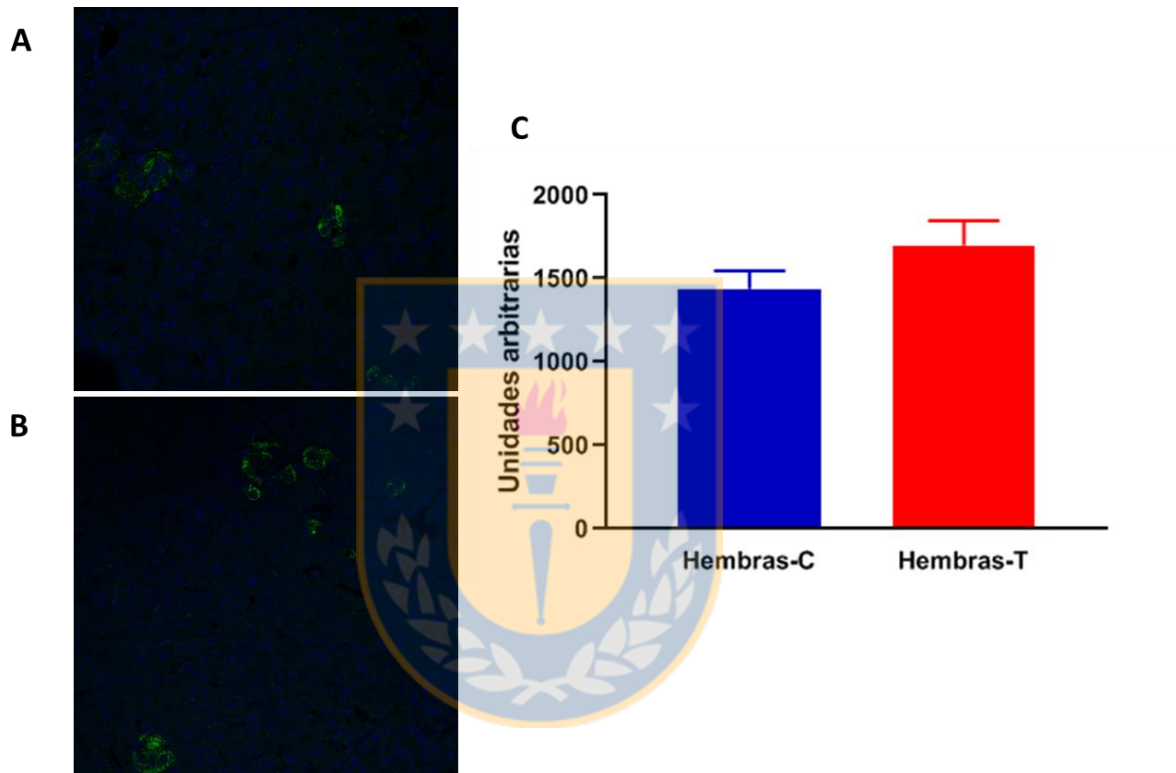


### Cuantificación contenido proteico de insulina y Pdx1 en células $\beta$ pancreáticas

El contenido de insulina y Pdx1, de extractos de proteínas totales, fue obtenido desde tejido pancreático total. Sin embargo, la cuantificación no pudo llevarse a cabo por Western-blot ya que los resultados no pudieron ser reproducibles. Por ello, finalmente la cuantificación se realizó por medio de inmunofluorescencia empleando anticuerpos que fueron validados previamente.

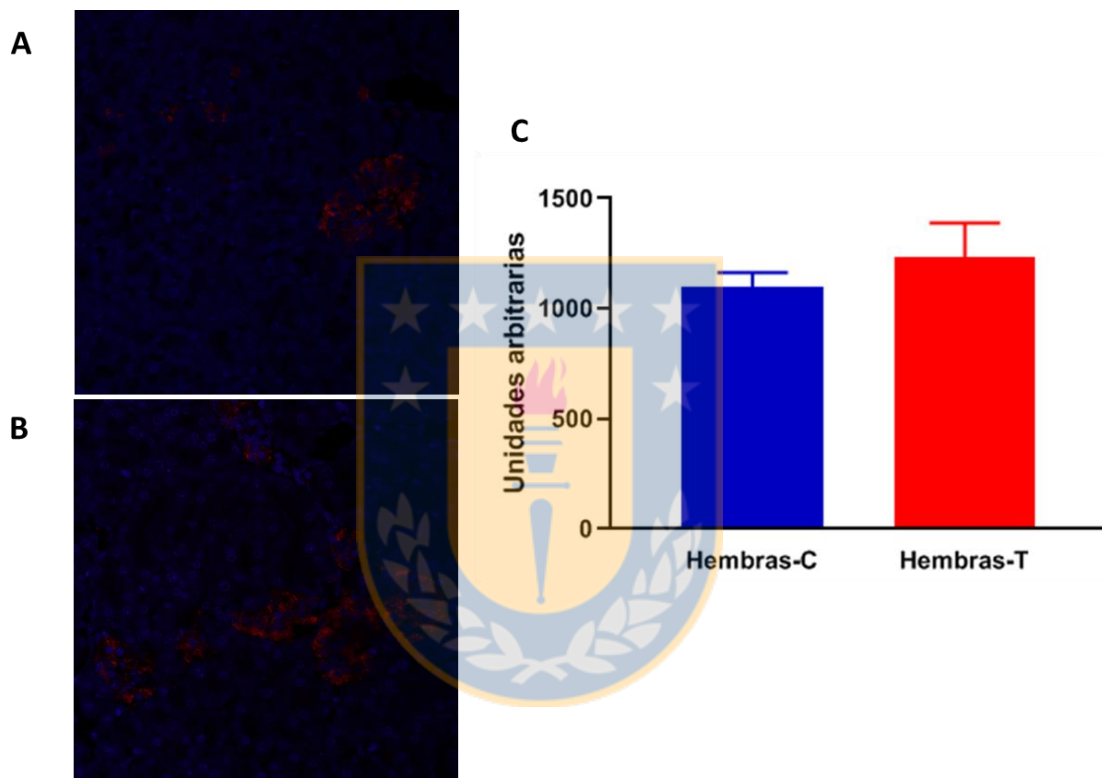
La inmunotinción de Pdx1 permitió detectar la presencia de la proteína principalmente en el citoplasma de las células en las hembras-C y una distribución similar a nivel citoplasmático en las hembras-T, pero con mayor presencia en el núcleo en comparación con el grupo control. Al cuantificar el contenido de Pdx1, éste no presentó diferencias entre los grupos ( $P=0,1717$ ; Figura 7).

Figura 7: Secciones histológicas pancreáticas representativas de islotes de Langerhans teñidos con inmunotinción fluorescente anti-Pdx1 en células  $\beta$  (verde) en hembras ovinas adultas control (A) y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (B). Cuantificación relativa del contenido de Pdx1 en células  $\beta$  (C).



La inmunofluorescencia anti-insulina permitió observar células altamente inmunorreactivas a esta hormona en el interior de los islotes pancreáticos. La reactividad se presentó con alta intensidad a nivel citoplasmático en ambos grupos de hembras. Al realizar la cuantificación del contenido de insulina presente en las células, este fue similar ( $P=0,4116$ ) entre las hembras control y las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (Figura 8).

Figura 8: Secciones histológicas pancreáticas representativas de los islotes de Langerhans con inmunotinción fluorescente anti-insulina en células  $\beta$  (rojo) en hembras ovinas adultas control (A) y expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona (B). Cuantificación relativa del contenido de insulina en células  $\beta$  (C).





## 5. DISCUSIÓN

### **Efectos sobre la madre y consecuencias en el feto**

La exposición prenatal a varias sustancias que pueden alcanzar directa o indirectamente al feto, alterando la homeostasis de la madre, provocan una divergencia en la vía normal de desarrollo de los individuos. Entre estas sustancias se encuentran tóxicos y toxinas, pesticidas, cosméticos, fármacos, drogas, entre otras (Padmanabhan *et al.*, 2016). Sus efectos son mediados en forma directa por la capacidad que tienen estas sustancias de interferir o modificar la funcionalidad normal de las células, tejidos o sistemas de órganos; no obstante, otro grupo de estas sustancias son capaces de modificar indirectamente la estructura y funcionalidad de los sistemas al emular, bloquear, potenciar o modificar vías normales de transducción de señales, a través de las cuales los sistemas se comunican o son regulados por sistemas integradores de respuestas, entre ellos el sistema nervioso y el sistema endocrino, a este grupo de sustancias se les conoce como disruptores endocrinos. Sin embargo, la exposición directa a hormonas, en concentraciones anormalmente altas o bajas, puede desviar la trayectoria normal de desarrollo de los individuos ya que altera el delicado balance de hormonas, metabolitos o sustancias disueltas en la sangre, o medio interno, bajo el cual se asegura el correcto desarrollo de los individuos.

La reprogramación de la diferenciación y adquisición de función de los órganos fetales, por la exposición a un exceso de testosterona durante la gestación, puede ser mediada por la acción de este esteroide a varios niveles. Primero, estos cambios pueden ser inducidos por un medio endocrino o un metabolismo alterado en la madre producido por esta hormona. En segundo lugar, los efectos del exceso de testosterona en la madre pueden ser generados por la modificación de la tasa de transferencia de nutrientes, alteraciones en el transporte o intercambio de gases a nivel placentario y/o el transporte anómalo de hormonas en la interfaz materno-fetal. Tercero, el exceso de testosterona o la aromatización de la misma a estradiol, puede atravesar la barrera placentaria e influir directamente en el medio esteroideal, metabólico o bioquímico fetal, así como en el crecimiento y la diferenciación de órganos. Por ello, es clave identificar cuáles son los mediadores “circulantes” involucrados en la desviación de la trayectoria del desarrollo fetal y que podrían ser la causa de las

disfunciones observadas en el individuo adulto. Por ello, es esencial comprender los cambios en la concentración plasmática, fetal y materna, de andrógenos y estrógenos, los cambios en la homeostasis endocrina materna y fetal inducidos por éstos, y las alteraciones en la trayectoria de crecimiento del feto durante su desarrollo uterino y posteriormente durante su vida postnatal a consecuencia de ellos.

Respecto a esto, el peso corporal en las hembras gestantes fue similar al compararlos entre la semana 5 a la 17 de gestación y sólo se presentó una variación de aproximadamente 4-5 kilos, en ambos grupos de madres, durante el periodo en que fueron muestreadas. Estudios previos indican que la testosterona es una hormona con efectos anabólicos provocando un metabolismo nitrogenado positivo que se caracteriza por un aumento en el depósito de tejido muscular debido a un aumento en el transporte de aminoácidos no esenciales al interior de las células musculares, asociado a una disminución en la degradación de proteínas en este tejido (Ferrando *et al.*, 1998; Ferrando *et al.*, 2003). Es importante señalar que la administración de testosterona a las madres del grupo tratado, no generó una diferencia en la ganancia de peso con respecto al grupo de madres control, debido a que otros autores han atribuido a esta ganancia de peso un potencial reprogramatorio, ya que estudios previos indican que el alto peso o la obesidad en las hembras gestantes, provocaría una serie de alteraciones metabólico-endocrinas en ellas y en la transferencia de nutrientes a través de la placenta (Neri y Edlow, 2016; Reynolds *et al.*, 2017; Ford y Odhiambo, 2017) lo que comprometería el desarrollo de los fetos. Adicionalmente, la hiperandrogenemia en hembras gestantes produce una alteración en el depósito de grasa, induciendo un depósito con características androide, más que ginoide, con una distribución que se desvía principalmente hacia el compartimiento visceral, con consecuencias metabólicamente nocivas (Pérez *et al.*, 2010; Palmer y Clegg, 2015; Cardoso *et al.*, 2016). Sin embargo, esto no fue evaluado en el grupo de hembras tratadas.

La administración de testosterona a las hembras gestantes provocó un aumento en la concentración plasmática de esta hormona con un valor promedio de 4 ng/ml, en cambio en el grupo de madres-C la concentración plasmática de esta hormona fue casi indetectable por el kit. Una característica importante de este modelo, respecto a otros es que la dosis de testosterona administrada a las hembras gestantes produce una hiperandrogenemia, es decir,

un aumento en los niveles plasmáticos de este andrógeno que es mayor a la que presentan normalmente las hembras, pero menor a la concentración plasmática de testosterona presente en el plasma de los machos ( $>8$  ng/ml). Veiga-Lopez *et al.* (2011) empleando ovejas Suffolk-down gestantes a las que administró 100 mg/oveja de propionato de testosterona, por vía intramuscular, entre los días 30 al 90 de gestación, indican que la concentración plasmática de esta hormona es mayor a 8,4 ng/ml. Esto provoca una diferencia considerable entre los modelos, en los que si bien se produce una hiperandrogenemia en las hembras gestantes, en el modelo de Veiga-Lopez *et al.* (2011) se generaría un aumento excesivo de esta hormona provocando un desbalance en el ambiente endocrino-metabólico de la madre de características “farmacológicas” y difiere de otros ensayos en los que se procura evaluar concentraciones anormalmente altas de esta hormona, pero con una dinámica que se asemeja a la que se presenta en patologías como el síndrome de ovario poliquístico (Sir-Petermman *et al.*, 2002). Esto permitiría generar un modelo de características “fisiopatológicas” que permite evaluar, en animales, la consecuencia de la exposición prenatal a un exceso de testosterona en la descendencia, ya que en un artículo publicado recientemente se ha demostrado la transferencia transgeneracional de este síndrome (Risal *et al.*, 2019).

La concentración plasmática de cortisol, progesterona e insulina no se modificó por la administración de testosterona en las ovejas gestantes. Estos hallazgos nos permiten diferenciar específicamente, en este modelo experimental, el efecto de la administración de testosterona a la madre y la exposición fetal a un exceso de esta hormona, de aquellos derivados de otras hormonas metabólicamente importantes en el desarrollo temprano de los individuos, como la insulina (Recabarren *et al.*, 2019). Estos resultados proporcionan información acerca de las ventajas que tiene esta especie animal como modelo experimental para las patologías observadas en las mujeres, ya que las ovejas y los humanos exhiben características de desarrollo similares, con una trayectoria comparable en el desarrollo de los órganos fetales y los pesos al nacer. Asimismo, al comparar el perfil de la concentración plasmática de glucosa, proteínas plasmáticas totales y colesterol total, la administración de testosterona no provocó una alteración de estos en la sangre materna, por lo que podría inferirse que la disponibilidad de estos nutrientes para el feto en desarrollo no fue limitada por este tratamiento. Es destacable, en este modelo, que el tratamiento no afectó la relación

insulina/glucosa en las hembras gestantes, ya que, en hembras, la administración de testosterona provoca resistencia a la insulina (Abi-Salloum *et al.*, 2012), caracterizada por una hiperinsulinemia compensatoria que podría contribuir a los efectos sobre el desarrollo del feto, provocando una reprogramación debida al exceso de esta hormona (Guilloteau *et al.*, 2009).

Asimismo, el día 120 de gestación, la administración de testosterona no alteró la concentración plasmática de nutrientes en las ovejas tratadas ni la concentración plasmática de varias hormonas relacionadas con el metabolismo, la sensibilidad de los tejidos a la insulina y la disponibilidad de nutrientes en la madre. Sin embargo, a diferencia de lo que se observa en la dinámica de la progesterona durante el periodo de administración de testosterona, la concentración de progesterona disminuyó en las hembras tratadas cuando se cuantificó la concentración plasmática de esta hormona el día 120 de gestación. La principal fuente de progesterona durante este periodo de la gestación es la placenta (Kumar y Magon, 2012); sin embargo, Beckett *et al.* (2014) indican que la administración de testosterona en ovejas gestantes produce un avance en el desarrollo placentario en etapas tempranas de la gestación (60dg), pero después es incapaz de mantener la eficiencia placentaria en etapas más avanzadas de la gestación (140dg). Asimismo, la administración de testosterona en ratas disminuye el flujo sanguíneo uterino y la oxigenación placentaria (Gopalakrishnan *et al.*, 2016), lo que limitaría la disponibilidad de sustratos para la producción de progesterona, el metabolismo de las células de la placenta o la actividad enzimática de esta estructura (Maliqueo *et al.*, 2013), siendo potencialmente la causa de la disminución de la concentración de esta hormona particularmente en este periodo.

En los fetos hembra provenientes de madres a las que se le administró testosterona la concentración plasmática de sustratos energéticos, a los 120 días de gestación, fue similar a la que presentan los fetos del grupo de hembras control y no se evidenció que la exposición prenatal a un exceso de testosterona provocara una alteración en los marcadores plasmáticos de funcionalidad hepática, salvo un aumento en la transaminasa hepática AST que también se evidenció en los fetos macho EPT junto con una hepatomegalia en ellos. La concentración plasmática de insulina e IGF-II fue significativamente menor en los fetos hembra del grupo de hembras tratadas. La insulina y los factores de crecimiento similares a

la insulina son claves, durante el desarrollo embrionario y fetal, para el correcto desarrollo y crecimiento del feto, para la maduración de los órganos y la adquisición de funcionalidad de los distintos sistemas orgánicos. Por ello, la disminución de la concentración plasmática de estas hormonas podría estar directamente relacionada con los efectos reprogramatorios observados durante la vida adulta. Adicionalmente, la concentración plasmática de adiponectina también fue menor en los fetos hembra expuestos prenatalmente a un exceso de testosterona. La adiponectina es una hormona clave en el metabolismo energético, principalmente lipídico, y su concentración plasmática se correlaciona positivamente con la sensibilidad de los tejidos a la insulina (Lihn *et al.*, 2005; Ziemke y Mantzoros, 2010). Por ello, la exposición prenatal a un exceso de testosterona generaría una disminución en la concentración plasmática de varias hormonas claves en el crecimiento y desarrollo del feto, junto con otras que determinan la sensibilidad de los tejidos a la insulina, hormona clave en el desarrollo somático de los individuos tanto durante la vida prenatal, como en la vida postnatal.

La administración de testosterona a la madre aumentó los niveles plasmáticos de testosterona y estradiol en los fetos hembra. Por ello, los efectos reprogramatorios sobre la morfología y fisiología de los fetos, debido a la administración de testosterona a la madre, podrían deberse directamente a la unión de esta a su receptor o, indirectamente, por la aromatización de la testosterona a estradiol. Rae *et al.* (2013) demostraron que en fetos hembra provenientes de madres tratadas con testosterona, no sólo se incrementa la concentración de esta hormona, sino también la concentración plasmática de estradiol, hipotetizando que algunas de las alteraciones inducidas en los fetos, por la administración de testosterona a las madres, se deben a los efectos androgénicos y otras a los efectos estrogénicos. Esta mayor concentración de testosterona que alcanza al feto hembra provoca una masculinización del genital externo generando un alargamiento de la uretra y la aparición de un saco escrotal vacío (pseudoscrotum). Respecto a esto, la distancia ano-apertura genital es el resultado del desarrollo del tubérculo genital, el pliegue genital y la membrana cloacal en el pene o el clítoris, el escroto o los labios mayores y el ano, respectivamente (Hsieh *et al.*, 2008; Hua *et al.*, 2018). En los mamíferos, incluidos los humanos, la reprogramación fetal del sistema reproductor de la hembra, debido a un exceso de andrógenos, se observa convencionalmente como una masculinización y/o

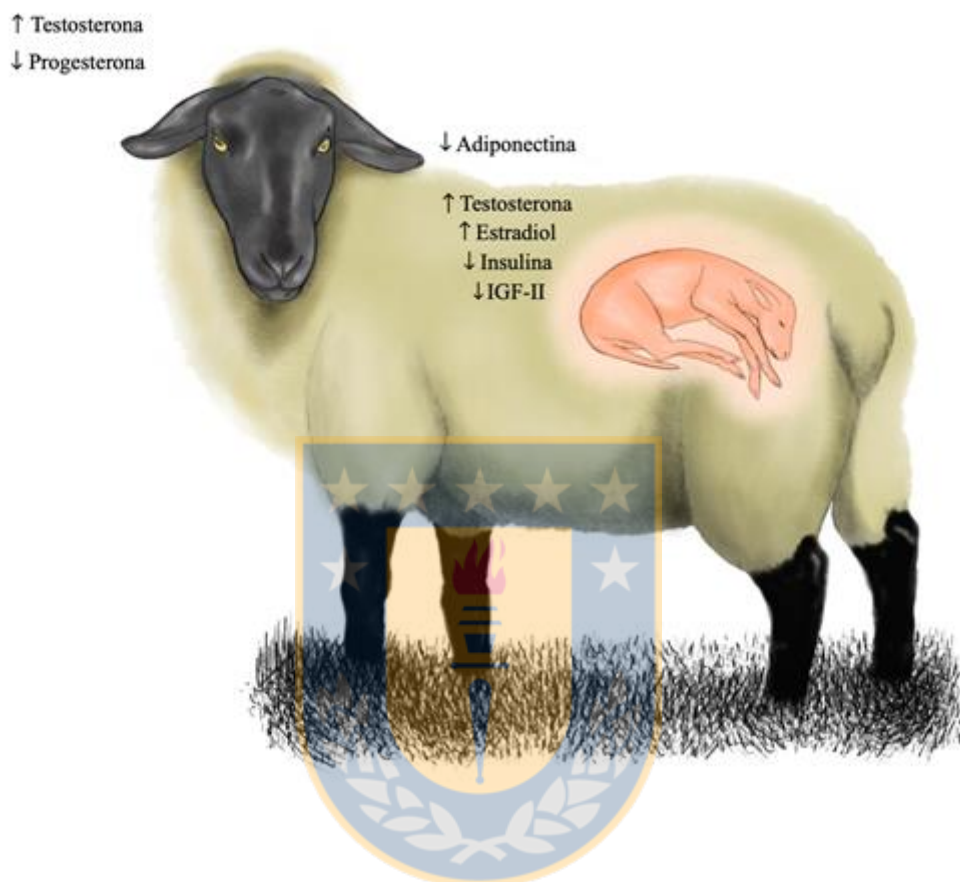
defeminización del fenotipo femenino, principalmente el genital externo (Jost, 1970; Wallen y Baum, 2002). La exposición fetal a un exceso de andrógenos masculiniza el desarrollo del tracto urogenital en las hembras de los mamíferos placentados al inducir la formación de genitales masculinos externos e internos, mientras se defeminiza el desarrollo del genital externo (Goy *et al.*, 1988). No obstante, por la carencia de los genes que determinan el desarrollo testicular, no se observa una alteración en el desarrollo del ovario, las trompas de Falopio, el útero, el cuello uterino y la parte superior de la vagina (Wells y van Wagenen, 1954; Goy *et al.*, 1988). Recabarren *et al.* (2009) demostraron que la administración de testosterona bajo dos protocolos, uno similar al empleado en este estudio y otro en el que se administran 60 mg de propionato de testosterona, dos veces por semana, desde el día 30 al 90 de gestación, provocan una masculinización del genital con un significativo aumento de la distancia entre el ano y la apertura genital que, si bien es mayor al compararlas con las hembra control, es menor a la de los machos control. Otra evidencia adicional, para la modulación endocrina de la distancia ano-apertura genital, es el hallazgo de que ratones hembra que se desarrollan en el útero adyacentes a dos fetos machos presentan una distancia anogenital más larga que las hembras que no tienen fetos machos cercanos a ellas (McDermott *et al.*, 1978). Asimismo, se ha descrito que hembras nacidas de ovejas tratadas con 200 mg de testosterona, entre los días 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 *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1999). En contraste, otros estudios han demostrado que las hembras nacidas de madres tratadas con testosterona entre los días 60-90 días de gestación nacen con genitales externos normales, pero tienen la postura urinaria masculinizada (Clarke *et al.*, 1976; Herbosa *et al.*, 1995), lo que permite concluir que el período crítico para la masculinización de los genitales externos en las hembras ovinas ocurre entre los días 30 y 60 de gestación. Por ello, la dosis de testosterona administrada, el protocolo de administración y el periodo en el que se administra son claves en la determinación de las alteraciones generadas por este esteroide en la descendencia.

Respecto a las otras variables zoométricas evaluadas, Manikkam *et al.* (2004) y Veiga-Lopez *et al.* (2011) indican que al comparar fetos expuestos prenatalmente a un exceso de testosterona con fetos control, hasta los 90 días de gestación aproximadamente, no

presentan diferencias en la distancia entre la cabeza y la base de la cola (largo parcial) y la circunferencia craneana, pero a los 140 días de gestación estos registros disminuyen y aumentan, respectivamente. Si bien, no se presentaron diferencias relevantes en la zoometría y en el peso del feto y los distintos órganos, al realizar una correlación entre las distintas variables evaluadas en los fetos expuestos prenatalmente a un exceso de testosterona aumentó la significancia en algunas correlaciones y, en otros casos, hay correlación entre las variables analizadas, a diferencia de los mismos registros determinados en fetos hembra control (largo total y parcial, alzada, largo del fémur y perímetro torácico con respecto a las otras medidas zoométricas). Esto difiere de estudios en los que la exposición fetal a un exceso de testosterona, la hiperinsulinemia u otras alteraciones en el metabolismo de la glucosa generan fetos o recién nacidos con modificaciones en el tamaño del individuo (Steckler *et al.*, 2005; Manikkam *et al.*, 2004; Sathishkumar *et al.*, 2011; Carlsen *et al.*, 2006). Entre ellas, se indica que gestaciones en las que simultáneamente se presenta resistencia a la insulina e hiperandrogenemia se presentan fetos grandes para la edad gestacional o, en algunos casos, pequeños para la edad gestacional (Sir-Petermann *et al.*, 2002), lo que es un predisponente en ellos para padecer una serie de enfermedades durante la vida adulta, entre las que se encuentran infarto al miocardio, hipertensión, resistencia a la insulina o DM2 (Guilloteau *et al.*, 2009).

Al término de la gestación y hasta alcanzar las 26 semanas de edad, el peso al nacimiento fue similar entre los grupos y la curva de crecimiento no presentó diferencias durante las distintas etapas de desarrollo somático, lo que contrasta con otros estudios en ovejas, en los que el peso al nacimiento es menor en estos fetos y, posteriormente, se genera un periodo de crecimiento compensatorio (“catch-up”) que aumentaría el riesgo a padecer alteraciones metabólicas y desarreglos que conducirían a resistencia a la insulina en estos individuos (Manikkam *et al.*, 2004; Berends *et al.*, 2013).

Figura 9: Resumen de los efectos endocrinos de la administración de testosterona en ovejas preñadas y en fetos ovinos hembra de 120 días de gestación debido a la exposición prenatal a un exceso de testosterona.



### **Efectos sobre la sensibilidad a la insulina en la vida postnatal**

A las 26 semanas de edad, se realizó el primer test de tolerancia a la glucosa endovenosa, periodo considerado como peripuberal. A esta edad, el peso y la concentración plasmática de varias hormonas de importancia reproductiva, metabólica y relacionadas con la sensibilidad de los tejidos a la insulina, fue similar entre los grupos. Maliqueo *et al.* (2012) demostraron que en hijas de mujeres que padecen síndrome de ovario poliquístico, en la medida que se acercan a la pubertad disminuye la concentración plasmática de adiponectina, lo que aumentaría el riesgo a padecer resistencia a la insulina. En ovejas EPT, Recabarren *et al.* (2005) describen que estas hembras presentan una disminución en la sensibilidad de los tejidos a la insulina desde las 5 semanas de edad, de la misma forma que Cardoso *et al.* (2015) en borregas a las 6 semanas de edad y Padmanabhan *et al.* (2010) en



borregas de 11 semanas de edad. Sin embargo, no hay estudios publicados en los que se determine la sensibilidad a la insulina de las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona durante la pubertad.

Al alcanzar el periodo peripuberal tanto el grupo de hembras control como las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona presentan una sensibilidad a la insulina similar determinada por medio del test de tolerancia a la glucosa endovenosa. Esto coincide con lo postulado por Cardoso *et al.* (2016), ya que ellos indican que se produciría un período de adaptación compensatoria de los tejidos reprogramados, entre la etapa de desarrollo somático juvenil y postpuberal temprana en las ovejas. Este grupo indica que posteriormente se produce una alteración en la morfología de los adipocitos, presentando una proporción mayor de adipocitos de menor tamaño, lo que causaría la disminución en la sensibilidad a la insulina que se presenta durante la vida adulta. Asimismo, ellos indican que la concentración plasmática de leptina sería mayor durante este periodo, lo que aumentaría la sensibilidad de los tejidos a la insulina al incrementar el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, esto contrasta con lo observado en nuestro modelo, ya que Recabarren *et al.* (datos no publicados) evidenciaron que a las 26 semanas de edad los adipocitos viscerales aumentan significativamente su tamaño, pero no sucede en los adipocitos subcutáneos. van Harmelen *et al.* (1998) indican que hay una relación directa entre el depósito de grasa y la concentración de leptina secretada; probablemente este podría ser el mecanismo compensatorio, en primera instancia, que permitiría disminuir temporalmente la resistencia a la insulina previamente informada en este modelo (Recabarren *et al.*, 2005).

A las 30 semanas de edad en las hembras enteras, la dinámica de la concentración plasmática de insulina y glucosa fue similar entre los grupos y sólo se evidenció una disminución en la constante de utilización de la glucosa (ISI-Grulet) y un aumento en la tasa de desaparición de la glucosa en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona. Si bien, no se presenta un aumento significativo en la secreción de insulina estimulada por glucosa, puede observarse que la secreción de insulina comienza a incrementarse en el grupo de hembras EPT en relación a las hembras control. Sin embargo, en hembras ooforectomizadas de la misma edad, la dinámica de la concentración plasmática

de glucosa fue significativamente menor durante el test de tolerancia a la glucosa endovenosa, lo que se reflejó por un menor promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el TTGEV y área bajo la curva estimulada e incremental de la concentración plasmática de glucosa en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona. Si bien, la concentración plasmática de hormonas de origen ovárico, estradiol y progesterona, es menor al comparar ambas condiciones, al parecer un requisito fundamental para que se evidencien prematuramente los signos de la disminución de la sensibilidad de los tejidos a la insulina es la presencia de ovarios o los productos de la funcionalidad de éstos.

En la actualidad se debate si la hiperinsulinemia es la causante del aumento en la producción de andrógenos a nivel ovárico, lo que finalmente agravaría la resistencia a la insulina existente, o si la hiperandrogenemia de origen ovárico sería la causante de la resistencia a la insulina, la que perpetuaría la esteroidogénesis anormal ovárica, acentuando la resistencia a la insulina. Una paradoja central es el aumento en la sensibilidad ovárica a la insulina, a pesar de la resistencia periférica a esta hormona (Utiger, 1996). En mujeres que padecen síndrome de ovario poliquístico, el aumento en la concentración plasmática de insulina es la fuerza impulsora que provoca un aumento en la secreción gonadal de andrógenos (Pasquali *et al.*, 1987; Ehrmann *et al.*, 1997). A nivel ovárico, el aumento en la concentración plasmática de insulina, asociado a una secreción mayor de hormona luteinizante desde la hipófisis, provoca un aumento en la producción de andrógenos por parte de las células de la teca de los folículos, la que no se metaboliza a estradiol, debido a una disminución en la expresión y actividad de la enzima aromatasas en las células de la granulosa (Hosseini *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Magoffin *et al.*, 1996). Además, el aumento en la concentración plasmática de insulina provoca una disminución en la producción de la proteína transportadora de hormonas sexuales (SHBG), lo que aumentaría la biodisponibilidad de testosterona (Nestler, 1997; Azziz, 2003). Sin embargo, en mujeres que padecen el síndrome de ovario poliquístico (SOP) también se ha observado que la esteroidogénesis a nivel de la glándula adrenal está alterada (Baptiste *et al.*, 2010), ya que cuando se suprime la producción de esteroides a nivel ovárico presentan un nivel anormalmente elevado de andrógenos, cuyo origen es esta glándula (Barnes *et al.*, 1989; Ehrmann *et al.*, 1992; Hoffman *et al.*, 1984) y, cuando se suprime la producción de

esteroides desde la glándula suprarrenal, se produce una hiperandrogenemia de origen ovárico (Lachelin *et al.*, 1982; Rittmaster y Thompson, 1990). Es por esto que se ha atribuido a un defecto en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada o al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, la causa de la hiperandrogenemia en mujeres que padecen SOP (Baptiste *et al.*, 2010). Sin embargo, uno de los primeros marcadores de un incremento en el riesgo de padecer resistencia a la insulina proviene de reportes de Sir-Petermann *et al.* (2012), en los que la concentración plasmática de insulina, estimulada por glucosa, en niñas hijas de madres que padecen SOP, permanece elevada durante el test de tolerancia oral a la glucosa (TTGO) tempranamente (desde etapa Tanner I, que corresponde a la niñez, en adelante), sin alteraciones en la concentración plasmática de testosterona, hormona luteinizante u hormona folículo-estimulante. Asimismo, en niñas hijas de madres SOP a los 6 años de edad (etapa prepuberal), además de presentar una concentración significativamente mayor de insulina 2 horas tras el TTGO, tienen una menor concentración plasmática de adiponectina, lo que es un factor de riesgo que incrementa la probabilidad de padecer resistencia insulínica y DM2 (Sir-Petermann *et al.*, 2007; Sir-Petermann *et al.*, 2009).

En hembras a las 38 semanas de edad, tras la administración crónica de testosterona (8 semanas) se evaluó el efecto de la hiperandrogenemia crónica sobre la sensibilidad de los tejidos a la insulina, en presencia de ovarios. La administración de testosterona en ambos grupos de hembras no provoca alteraciones en la concentración plasmática de hormonas de origen ovárico, ni modificaciones en la concentración plasmática de glucosa, proteínas plasmáticas totales o lípidos. Asimismo, la hiperandrogenemia no provocó alteraciones en la funcionalidad hepática, aunque reportes de Baptista *et al.* (2017) indican que la administración de testosterona en ratas adultas provoca una disminución en el área de los hepatocitos, colestasis y congestión hepática crónica, que se caracteriza por una disminución del parénquima hepático y un aumento en el depósito de tejido fibroso en este órgano. Análisis histológicos hepáticos de estas ovejas no presentaron evidencias de alteraciones en el parénquima, sobre el sistema vascular o en el contenido de lípidos en el interior del tejido hepático (datos no mostrados). Es importante mencionar esto, ya que cualquier alteración en la funcionalidad hepática podría generar resistencia a la insulina, debido a la incapacidad del tejido hepático de responder adecuadamente a la insulina.

Durante el test de tolerancia a la glucosa endovenosa, la dinámica de la concentración plasmática de glucosa fue similar entre los grupos, de la misma forma que el promedio de la concentración plasmática de glucosa durante el ensayo. Sin embargo, tras la administración de glucosa, la secreción de insulina en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona, fue significativamente mayor duplicando el promedio de la secreción de insulina estimulada por glucosa que presentó el grupo de hembras control. Esto provoca que el área bajo la curva estimulada de la concentración plasmática de insulina, sea mayor en este grupo de hembras y se genere una tendencia a que el ISI-Composite en la hembras EPT sea menor que el de las hembras control. Esto sugiere que es necesaria una mayor secreción de insulina para mantener la homeostasis de la glucosa en este grupo de hembras. Pamanabhan *et al.* (2015) establecieron que la exposición prenatal a un exceso de testosterona y las alteraciones que se producen en el medio interno de la madre, provocarían la generación de cambios “organizacionales”, esto es, los tejidos y las diferentes estructuras somáticas se modificarían tempranamente por efecto de este insulto. Posteriormente, un nuevo insulto, como por ejemplo la hiperandrogenemia que fue inducida por la administración crónica de testosterona, provocaría los efectos “activacionales”, o sea, activaría o permitiría la expresión de las alteraciones generadas durante el desarrollo fetal (Nungent *et al.*, 2012).

Por ello, a través de la metodología empleada se puede estudiar el modelo propuesto por Tang *et al.* (2013) de los "dos hits" en los que un primer evento (primer hit), generado en una etapa crítica del desarrollo fetal de un individuo, aumentaría su susceptibilidad a sufrir ciertas patologías durante la vida adulta (Barker, 1997), pero para la activación de estos se requiere un segundo, tercer o múltiples eventos (segundo o múltiples hits) para la manifestación de las características reprogramadas por el primer insulto (Recabarren *et al.*, 2006).

La concentración plasmática de estradiol, progesterona y otros metabolitos fue similar entre las hembras-C y hembras-T enteras tras la administración crónica de testosterona. La concentración plasmática de testosterona total, testosterona libre y la relación testosterona libre/testosterona total fue similar entre los grupos, de la misma forma que el peso corporal. Durante las ocho semanas de administración de testosterona no se producen diferencias en

la tasa de ganancia de peso entre los grupos de estudio, algunos autores han propuesto que alteraciones en el peso corporal, la concentración plasmática basal de insulina y la concentración plasmática de esteroides sexuales modifican la concentración plasmática de la proteína transportadora de esteroides sexuales, lo que altera la biodisponibilidad de la testosterona administrada, pudiendo, de esta forma, generar una diferencia en los efectos observados en los grupos de estudio (Holly *et al.*, 1989; Sørensen *et al.*, 2007; Sørensen *et al.*, 2009). Sin embargo, estas variables no presentaron diferencias entre los grupos, lo que disminuiría el impacto de estas variables sobre los efectos observados. Asimismo, el perfil lipídico no presentó cambios por efecto de la administración crónica de testosterona en las hembras enteras. Esto también es relevante debido a que varios autores han indicado que la hiperandrogenemia o las alteraciones en la concentración plasmática de esteroides modifican el metabolismo de las lipoproteínas, provocando una alteración en la homeostasis de los lípidos y el colesterol, lo que, asociado con un aumento en la concentración plasmática de estas sustancias, modificaría la sensibilidad de los tejidos a la insulina e incluso la secreción de insulina estimulada por glucosa (Wickramatilake *et al.*, 2013; Monroe y Dobs, 2013).

La administración crónica de testosterona tiende a disminuir el ISI-Composite en el grupo de hembras expuestas a los efectos reprogramatorios de la hiperandrogenemia prenatal. Diamond *et al.* (1998) evaluaron el efecto de la administración crónica de andrógenos empleando un protocolo en el que se dosifican diariamente 3 mg de metiltestosterona, por 8 a 12 días, en mujeres sanas. Ellos demostraron que la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina disminuyó, pero no la sensibilidad hepática a esta hormona en el estado euglicémico. Sin embargo, en condiciones de hiperglicemia la resistencia a la insulina se manifiesta. Esto se debe a una disminución en la captación de glucosa por parte de las células o tejidos que responden a ella.

Morimoto *et al.* (2001) han demostrado que la administración crónica de testosterona, en dosis que producen una concentración plasmática de esta hormona similar a la que presentan machos, provoca una significativa reducción en la captación de glucosa mediada por insulina. Asimismo, en ratas macho, este autor demostró que la insulina aumenta la expresión del ARNm de insulina *in vivo* e *in vitro*, junto con el contenido y secreción de

insulina en machos prepuberales castrados. Lo que sugiere que, en machos, una concentración fisiológica de andrógenos está involucrada en la síntesis y secreción de insulina o en otro mecanismo que pudiera inducir una mayor producción de insulina por parte de las células  $\beta$ . Adicionalmente, O'Meara *et al.* (1993) sugieren que la hiperinsulinemia podría ser el resultado de un incremento en la secreción de insulina o una consecuencia de la disminución en el clearance de esta hormona, ya que el receptor de andrógenos interactúa con la enzima intracelular que degrada la insulina en los hepatocitos o se saturaría la captación hepática de esta hormona limitando su degradación (Kupfer *et al.*, 1994).

Varios estudios han asociado la hiperandrogenemia con una disminución en la sensibilidad de los tejidos a la insulina (Polderman *et al.*, 1994; Corbould, 2008; Zhang *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2007). Sin embargo, debido a los antecedentes anteriormente expuestos, Xita y Tsatsoulis (2010) indican que la reprogramación provocada por la exposición a un ambiente uterino con concentraciones suprafisiológicas de andrógenos en hembras, podría provocar una alteración en la adquisición del fenómeno de dimorfismo tisular, es decir, que bajo la influencia de la testosterona los tejidos divergen hacia un fenotipo masculino alterando su fisiología y morfología, todo esto se asocia con una discrepancia entre una estructura masculina de los tejidos, en un medio metabólica y fisiológicamente femenino.

Adicionalmente, González *et al.* (2012) han demostrado que la administración de testosterona a mujeres sanas, provocando un aumento en la concentración plasmática de esta hormona similar a la que presentan mujeres que padecen el síndrome de ovario poliquístico, induce un aumento en la activación del NF $\kappa$ B en las células mononucleares en respuesta a la ingestión de glucosa, lo que provocaría un estado inflamatorio proaterogénico. Adicionalmente, Crisosto *et al.* (2017) indican que la testosterona provocaría un aumento en la expresión de CCL-2 e IL-6 en el tejido adiposo, lo que provocaría resistencia a la insulina, debido a un aumento en el número de macrófagos que infiltra este tejido (Kamei *et al.*, 2006). Esto se suma a que, bajo condiciones proinflamatorias, el TNF $\alpha$  inhibiría la señalización a través del receptor de insulina (Hotamisligil *et al.*, 1996), asociado a una disminución en la expresión de adiponectina y el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4), junto con un aumento en la expresión de resistina

e IL-1 $\beta$ , contribuyendo a la disminución en la sensibilidad a la insulina reportada (Nieto-Vázquez *et al.*, 2008; Ruan *et al.*, 2002).

A nivel sistémico, la testosterona provoca un aumento en el depósito de grasa visceral y una reducción en la concentración plasmática de adiponectina (Diamanti-Kandarakis y Dunaif, 2012), altera la actividad de la glicógeno sintetasa (Hölmang *et al.*, 1990; Hölmang *et al.*, 1992) e incrementa el estrés oxidativo (Liu *et al.*, 2010), lo que acentuaría la resistencia a la insulina. Además, por efecto del estrés oxidativo, se produce una peroxidación de lípidos en la membrana plasmática, lo que contribuiría a la disminución en la sensibilidad a la insulina, ya que provoca una disrupción en el metabolismo celular contribuyendo a la lipo o glucotoxicidad, que altera las vías de señalización celulares, entre ellas, la vía de transducción de señales activada por la unión de la insulina con su receptor (Awasthi *et al.*, 2004; Vodo *et al.*, 2013). Todo esto, sumado a una serie de consecuencias metabólicas de la hiperandrogenemia, promueve una disminución en la sensibilidad a la insulina ya que la testosterona aumenta la tasa metabólica y, simultáneamente, incrementa las necesidades tisulares de sustratos para el metabolismo energético, acentuando las alteraciones metabólicas a nivel celular y sistémico.

A nivel muscular, Hölmang *et al.* (1993, 1995) han demostrado que la hiperandrogenemia e hiperinsulinemia provocan una disminución en la red vascular en este tejido y una disminución en la relación entre fibras tipo 1 y tipo 2, lo que provoca una configuración muscular menos sensible a la insulina y reduce la capacidad que tiene la insulina de alcanzar su receptor presente en la superficie de las células de este tejido, lo que contribuye a disminuir la sensibilidad a la insulina, incrementando las necesidades sistémicas de insulina para mantener correctamente la homeostasis de la glucosa (Hölmang *et al.*, 1990).

Por todo esto, la administración crónica de testosterona afecta directamente la arquitectura del tejido adiposo y muscular, junto con modificar la distribución del tejido adiposo, asociado con cambios en el metabolismo de las células que son parte de estos tejidos. Asimismo, la testosterona provoca una disminución en la captación de glucosa inducida por insulina en los tejidos canónica y no canónicamente sensibles a la insulina (Dunaif *et al.*, 1995; Hölmang *et al.*, 2002; Beeson *et al.*, 2003; Farese *et al.*, 2005; Ciraldi *et al.*, 1992; Blouin *et al.*, 2010; Rosas *et al.*, 2015).

No debe desestimarse también que la hiperandrogenemia provoca una disrupción en la vía de señalización en el interior de las células  $\beta$  pancreáticas, lo que alteraría la producción y secreción de insulina. En esta vía, un incremento en la demanda sistémica de insulina provoca un aumento en la exigencia metabólica sobre las células  $\beta$ , lo que, en células con una alta tasa metabólica como éstas, generaría un estrés funcional pudiendo derivar en una alteración en el patrón de expresión de genes, lo que se traduciría en un cambio en el fenotipo o la viabilidad de estas células. Esto concuerda con las hipótesis de la “sobrecarga funcional de las células  $\beta$ ” y “agotamiento de las células  $\beta$ ” en las que, una sobreexigencia crónica, sin que necesariamente se produzca una hiperglicemia, puede provocar una disfunción similar a la que se presenta en personas que padecen DM2 (Marshak *et al.*, 1999; Hosokawa y Leahy, 1997).

A pesar de esto, un punto importante es que en hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona ooforectomizadas, se produce un fenómeno dual ante la administración de testosterona, considerando que previo a la administración de este andrógeno no hay diferencias en la sensibilidad de sus tejidos a la insulina, en comparación con hembras control, a las 30 semanas de edad. El grupo de hembras ooforectomizadas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona, durante el TTGEV, secretaron en promedio una menor cantidad de insulina tras la infusión de glucosa que el grupo de hembras control. Interesantemente, 48 horas tras la administración de sólo una dosis de testosterona estas hembras, si bien aumentan la secreción de insulina ante una misma carga de glucosa, la cantidad secretada es significativamente menor que la insulina secretada por las hembras-C.

Eisner *et al.* (2000) en primates expuestos prenatalmente a un exceso de testosterona durante etapas tempranas del desarrollo fetal, evidenció que se produce una alteración en la diferenciación de las células  $\beta$  y Hogg *et al.* (2011) manifiestan que las alteraciones que se evidencian en el páncreas se inician durante la vida uterina, ya que se produce un desbalance en la expresión de genes involucrados en el desarrollo y funcionalidad de este órgano. De esta forma, al parecer se produciría una disfuncionalidad en las células  $\beta$  pancreáticas haciendo que estas sean incapaces de responder adecuadamente ante un aumento en la concentración plasmática de glucosa, sin que esto gatille una intolerancia a la



glucosa. Esto fue demostrado por Rae *et al.* (2013) quienes evidenciaron que se altera la expresión de genes claves en la secreción de insulina estimulada por glucosa (mayor expresión de PDX1) y en la proliferación de las células  $\beta$  (mayor expresión de INSR e IGF1R), aumentando el número de células  $\beta$  por islote. Sin embargo, cuando se cultivan estos islotes en dos concentraciones distintas de glucosa (5,5mM y 20mM), los islotes provenientes de fetos expuestos prenatalmente a un exceso de testosterona secretan una mayor cantidad de insulina en ambas condiciones, pero no se presentan cambios en la concentración de insulina secretada cuando aumenta la cantidad de glucosa en el medio, lo que se traduciría en una reducción en el índice de estimulación (SI) de la secreción de insulina. En islotes de ratones androgenizados prenatalmente Rolan *et al.* (2010) han evidenciado que estos tienen una menor capacidad de sensar la concentración plasmática de glucosa y secretan una menor cantidad de insulina que islotes provenientes de animales control, debido a un defecto en la corriente de entrada de calcio en la célula  $\beta$ , que es un evento clave para la liberación de insulina.

Algunos autores indican que durante el proceso de diferenciación sexual, en la etapa de desarrollo fetal, se establece la futura sensibilidad pancreática a los esteroides androgénicos en forma diferencial entre machos y hembras, lo que ocurre desde el día 30 de gestación en adelante (Rae *et al.*, 2013). Ramaswamy *et al.* (2016) en un modelo ovino en el que se inyecta directamente al feto, administrando 20 mg de testosterona, indican que el desarrollo del páncreas endocrino se masculinizaría, con un perfil de células  $\beta$  parecido al de los machos. Esto provocaría una incongruencia en una hembra adulta entre un desarrollo del páncreas fetal masculinizado como consecuencia de la exposición prenatal a un exceso de testosterona, en un ambiente esteroidal femenino postnatalmente, esto es concentraciones variables de estradiol y progesterona dependientes de la etapa del ciclo estral en la que se encuentre la hembra. Sin embargo, la ventaja de ooferectomizar a las hembras en el periodo peripuberal es que evita el efecto de los esteroides liberados desde la gónada, pero no permite evitar completamente el efecto de una esteroidogénesis adrenal alterada (Baptiste *et al.*, 2010), una modificación en el metabolismo hepático (Hogg *et al.*, 2011), una masculinización o alteración en la arquitectura del tejido muscular (Corbould, 2008b) y una defeminización en la distribución y funcionalidad del tejido adiposo (Diamanti-Kandarakis and Dunaif, 2012). A pesar de los antecedentes mencionados anteriormente, no se

presentaron variaciones importantes en los índices de sensibilidad a la insulina tras la administración crónica de testosterona en hembras ooforectomizadas postpuberales.

### **Efectos sobre la estructura y funcionalidad del páncreas endocrino**

A las 38 semanas de edad, el peso absoluto del páncreas fue similar entre los grupos. Al determinar el porcentaje del peso corporal que representa el páncreas (relación entre el peso del páncreas y el peso vivo) este correspondió al 0,12% del peso corporal y coincide con lo informado por Guilloteau *et al.* (2012) para los rumiantes y otros reportes previos para la especie (Guilloteau *et al.*, 2009b).

Al analizar la histología pancreática, el tamaño, área fraccional y la densidad de los islotes fue similar en ambos grupos. Sin embargo, el número de islotes fue significativamente mayor en las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona, lo que se caracterizó por la aparición de muchos islotes de pequeño tamaño y con una alta inmunorreactividad a insulina. No obstante, a pesar de todo esto, el área y perímetro de los islotes fue similar entre los grupos. Estos resultados coinciden con los reportados por Nicol *et al.* (2014) en un modelo de exposición prenatal a un exceso de testosterona en primates no humanos. De la misma forma que en este estudio, no se produciría una adaptación compensatoria de los islotes similar a la que han reportado otros autores previamente y que se caracteriza por una hipertrofia de estos (Rosmalen *et al.*, 2001; Badawoud, 2006; Weir y Bonnes-Weir, 2013; Roat *et al.*, 2014). En cambio, en este modelo, esta compensación se caracterizaría por un aumento en el número de islotes pequeños, sin variaciones en el área fraccional de estos en la arquitectura pancreática. Similarmente, en estos primates, los islotes de menor tamaño se caracterizan por un gran número de células altamente inmunorreactivas para insulina en su interior, lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

Una importante diferencia entre ambos modelos, es que en este estudio el área inmunorreactiva para insulina es significativamente menor en los islotes de las ovejas postpuberales expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona, sin modificaciones en el área inmunorreactiva para glucagón o somatostatina. Adicionalmente, al correlacionar el

área de los islotes con la proporción de estos que es ocupada por las células inmunorreactivas a insulina, si bien existe una correlación positiva tanto en hembras-C como en hembras-T, esta correlación es menor en las hembras EPT ya que en los islotes de mayor tamaño aumenta el número de células que no presentan inmunorreactividad para insulina, glucagón o somatostatina.

Estos antecedentes contrastan con los resultados evidenciados en los test de tolerancia a glucosa endovenosa, ya que en ellos las hembras-T secretan más insulina, ante la misma carga de glucosa, que las hembras-C, lo que coincide con los estudios previos de Hopcroft *et al.* (1985) que demuestran que los islotes de mayor tamaño sintetizan y secretan mayor cantidad de insulina que los islotes pequeños, al estandarizarlos por área. Por ello, al parecer existiría alguna estrategia compensatoria en el páncreas endocrino que permite, a pesar de las alteraciones antes mencionadas, secretar una mayor cantidad de insulina permitiendo, de esta forma, mantener adecuadamente la homeostasis de la glucosa a pesar de la resistencia que pudiera presentarse en otros órganos o estructuras que participan en la mantención de la homeostasis de la glucosa.

Si bien no hay alteraciones en la morfometría de los islotes (área y perímetro), la distribución de las células en el interior de estos se modifica considerablemente. En relación a esto, la distribución de los distintos tipos celulares en los islotes pancreáticos se describe que está constituida por una parte central ocupada por las células  $\beta$ , que representan las células más abundantes en el interior de los islotes, las que se encuentran rodeadas por un manto de células  $\alpha$  y  $\delta$ , que representan el 30% y 1-2%, respectivamente (Reddy *et al.*, 1988; Steiner *et al.*, 2010). En los islotes de las hembras-T se produce una alteración en la distribución de los distintos tipos celulares, evidenciándose un desplazamiento de las células  $\beta$  hacia la periferia y algunas células  $\alpha$  y  $\delta$  hacia la parte central. Antiguos estudios en roedores han demostrado que la sangre, en el interior de los islotes, fluye desde el centro hacia la periferia y que, la distribución normal de las células en el interior de los islotes, es clave para el funcionamiento correcto de éstos, principalmente en lo que respecta a la capacidad de las células  $\beta$  de responder adecuadamente a la concentración de glucosa circulante (Kelly *et al.*, 2011, Samols *et al.*, 1988; Hopcroft *et al.*, 1985b).

Kostromina *et al.* (2013) indican que la secreción de insulina es un proceso altamente regulado y depende principalmente de dos procesos: la capacidad secretora de las células  $\beta$  y la microcirculación del páncreas endocrino. Por ello, esta organización única de los islotes asegura una capacidad efectiva de sensor los niveles circulantes de glucosa, lo que permite una secreción adecuada de insulina para que pueda llegar a los órganos blanco. Es así que una alteración en la arquitectura normal de los islotes tendría como consecuencia una disfunción en las células  $\beta$ , lo que es compensado por otros mecanismos moleculares o celulares que finalmente podrían incidir en el agotamiento de estas células (Gustavsson y Han, 2009). Asimismo, se ha demostrado que el contacto célula  $\beta$ -célula  $\beta$  es enormemente importante para la funcionalidad de ellas, ya que este permite generar una actividad eléctrica robusta que permite una secreción eficiente de insulina (Kilimnik *et al.*, 2011), por lo que la disgregación del “core” de células  $\beta$ , presente en el centro de los islotes de los ovinos, alteraría este mecanismo y, con ello, la correcta secreción de insulina.

En individuos diabéticos, se ha descrito una característica común manifestada por la disminución del número de islotes grandes (diámetro  $>600\mu\text{m}$ ), acompañado de una reducción en la fracción de células  $\beta$  (48%), disminuyendo significativamente la frecuencia de islotes de gran área y aumentando el número de islotes pequeños (Deng *et al.*, 2004), lo que coincide con los hallazgos evidenciados en este estudio. Asimismo, la consecuencia de esto sería una menor secreción de insulina ya que aumenta el umbral de estimulación de las células  $\beta$ , lo que podría contribuir a comprometer el control glicémico en individuos diabéticos. Sin embargo, en el grupo de hembras-T, la secreción de insulina es mayor tras la infusión de glucosa, lo que podría deberse al efecto de la administración crónica de testosterona sobre la producción y secreción de insulina en islotes provenientes de hembras androgenizadas. Esto surge de reportes en los que se indica, que se produciría una masculinización de los islotes por la exposición prenatal a un exceso de testosterona, ya que en machos que padecen hipogonadismo la testosterona aumenta la secreción de insulina estimulada por glucosa (Xu *et al.*, 2019). Es por ello que, por efecto de la androgenización que sufren las hembras-T, la administración crónica de testosterona aumentaría la capacidad de las células  $\beta$  de producir y secretar insulina (Morimoto *et al.*, 2001b; Morimoto *et al.*, 2010; Morimoto *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2019). Sin embargo, las consecuencias de esta adaptación, probablemente con fines compensatorios, podría incidir

en los efectos que se observan en la estructura de los islotes y la distribución de los distintos tipos celulares en estas hembras.

Adicionalmente, la expresión del ARNm de glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina no presentó diferencias entre los grupos, lo que coincide con varios reportes que indican que el contenido pancreático y la secreción de estas hormonas no se alteraría en individuos con DM2 o con resistencia a la insulina (Deng *et al.*, 2004; Henquin *et al.*, 2017). No obstante, Prentki y Nolan (2006) establecen que entre las compensaciones que se producirían, para incrementar la secreción de insulina ante la mayor demanda sistémica de ella, se encuentran una expansión de la masa de células  $\beta$ , un aumento en la síntesis de insulina y un aumento en la sensibilidad de estas células a los nutrientes. Esto es diferente a lo que observamos en este modelo, ya que si bien aumenta la secreción de insulina, el área que ocupan las células  $\beta$  dentro de los islotes de las hembras-T es menor al compararlas con las hembras-C y hay una tendencia a que la expresión del ARNm de insulina en el tejido pancreático total sea menor. Sin embargo, a pesar de la disminución del área inmunorreactiva a insulina en el interior de los islotes más grandes, esto se compensaría por el fenómeno de neogénesis de células  $\beta$  y la generación de nuevos islotes, ya que aumenta el número de islotes pequeños compuestos principalmente por estas células, los que podrían ser responsables de esta mayor capacidad secretora.

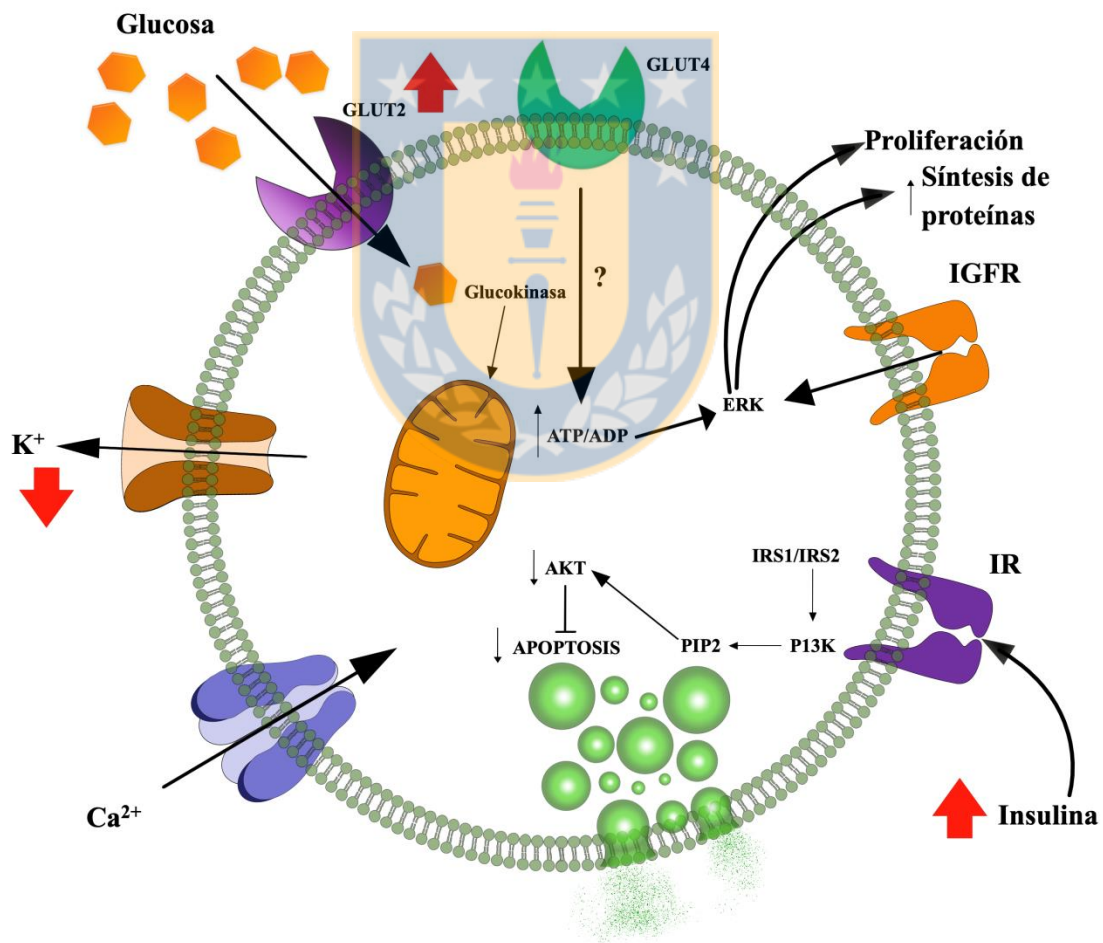
La expresión de los genes SLC2A2 (GLUT2), glucokinasa, el canal de calcio tipo L activado por voltaje y la subunidad KIR6.2 (KCNJ11) del canal de potasio regulado por ATP se han identificado como determinantes claves de la función de las células  $\beta$  (Laukkanen *et al.*, 2005; Doi *et al.*, 2007; Vaxillaire *et al.*, 2008; Gutford *et al.*, 2008). Respecto a esto, la expresión del ARNm para glucokinasa (GKC), subunidad 1D del canal de calcio sensible al voltaje (CACNA1D) y la proteína reguladora del canal de potasio sensible al ATP (SUR1) fue similar entre los grupos, pero la expresión del ARNm del transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2) aumentó significativamente en el grupo de hembras-T lo que podría contribuir a generar un aumento en la sensibilidad de las células  $\beta$  a la glucosa (Figura 10). Esto coincide con los reportes de Prentki y Nolan (2006), quienes indican que uno de los mecanismos compensatorios que se generarían en el páncreas endocrino sería el aumento en la expresión de las proteínas o actividad de las enzimas

involucradas en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Además, la expresión del ARNm de la subunidad que forma el poro del canal de potasio sensible al ATP (KCNJ11) disminuyó significativamente en el grupo de hembras-T, lo que podría contribuir a este fenómeno, ya que se ha reportado que mutaciones o pérdidas de función de esta proteína generarían un aumento en la secreción de insulina, independiente de la concentración plasmática de glucosa (Asli-Bala *et al.*, 2017), en forma similar a lo que sucedería ante una menor expresión del ARNm para esta proteína. La función de este canal es regular la secreción de insulina acoplado los cambios en el metabolismo de la célula  $\beta$ , con cambios en la actividad eléctrica de las mismas (Loechner *et al.*, 2011). Por ello, si la expresión del ARNm se relaciona directamente con la síntesis de la proteína, una disminución en la expresión del ARNm de KCNJ11, asociada a un aumento en la expresión del ARNm de GLUT2, incrementaría la secreción de insulina estimulada por glucosa, que finalmente es lo que se evidencia en el grupo de hembras-T. Prentki y Nolan (2006) describen que otro mecanismo compensatorio que genera el páncreas endocrino ante una alteración en la homeostasis de la glucosa, es una variación en la actividad de la glucoquinasa, es decir, a pesar que la expresión de la enzima sea similar, la actividad de la misma puede ser modificada, lo que podría ser también uno de los mecanismos compensatorios para evitar la progresión hacia una DM2 (Regazzi *et al.*, 2014; Araújo *et al.*, 2013); no obstante, este mecanismo no fue evaluado en este estudio.

En un modelo ovino de restricción del crecimiento intrauterino, por remoción de las carúnculas endometriales, se evidenció una disminución en la masa del páncreas y un aumento en el número de células  $\beta$  por islote, junto a una tendencia a incrementar la expresión del ARNm de GLUT2, una disminución en la expresión de CACNA1D, sin cambios en la expresión de glucocinasa y KCNJ11. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en este modelo experimental y a la vez discrepan, ya que en él se produciría un aumento en la capacidad de sentir la concentración plasmática de glucosa, pero la secreción de insulina disminuiría por la menor expresión de la subunidad del canal de calcio sensible al voltaje, lo que se compensaría con un aumento en el número de células  $\beta$  (Gatford *et al.*, 2008). Sin embargo, ambos estudios coinciden en que, a pesar de las alteraciones inducidas por distintos mecanismos reprogramadores, se generarían en el páncreas endocrino mecanismos compensatorios con distintas características morfológicas

y moleculares, para mantener la homeostasis de la glucosa. No obstante, la capacidad que alberga este órgano u otros sistemas de órganos, de mantener por largo tiempo estos mecanismos compensatorios, podría haber sido negativamente modificada por otros mecanismos desarrollados tempranamente y que programaron una estructura y funcionalidad diferente en estos órganos.

Figura 10: Modelo de los efectos de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa y la síntesis de insulina estimulada por glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas de ovejas adultas.



La expresión de los factores de transcripción que son claves para la adquisición y mantención de los distintos fenotipos celulares presentes en los islotes, no presentó

diferencias entre los grupos. La expresión del ARNm de FOXO1 y NGN3 fue similar entre los grupos. La función de FOXO1 es regular la expansión de las células  $\beta$ , se expresa abundantemente en el páncreas adulto y es exclusivamente producido por las células  $\beta$  (Ackermann y Gannon, 2007; Al-Masri *et al.*, 2010). La transcripción de este factor es negativamente regulada por la producción de insulina y su activación depende de la vía de transducción de señales estimulada por los factores de crecimiento por medio de la vía PI3K-Akt (Martinez *et al.*, 2006; Glauser y Schlegel, 2007).

Adicionalmente, FOXO1 es un factor clave en el efecto autocrino que genera la insulina sobre las células  $\beta$ , preservando la masa de estas células bajo condiciones de estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2016; Kitamura *et al.*, 2005; Kitamura y Kitamura, 2007). La expresión de este factor refuerza la mantención del fenotipo terminal de las células  $\beta$  permitiéndoles retener las características de células terminalmente diferenciadas (Talchai y Accili, 2015). En este estudio, la expresión de NGN3 no presentó diferencias entre los grupos experimentales, estableciendo que existe un equilibrio, a pesar de los efectos de la administración crónica de testosterona y los efectos reprogramatorios de la exposición prenatal a un exceso de este andrógeno, entre la mantención del fenotipo funcional de las células endocrinas maduras y el pool de progenitores de estas células en este órgano, lo que demuestra la enorme capacidad compensatoria que presenta este órgano, a pesar de las diversas noxas que influyen sobre su actividad.

Sin embargo, es evidente que en los islotes de las hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona se presenta una des-diferenciación en las células (Balaji *et al.*, 2018), probablemente en mayor medida en las células  $\beta$ , como uno de los fenómenos compensatorios que se generaría en estas células para evitar la vía apoptótica, mientras se sobreponen a las enormes demandas funcionales a las que se encuentran sometidas bajo estas condiciones (Brereton *et al.*, 2016; Talchai *et al.*, 2012; Hunter y Stein, 2017).

Wang *et al.* (2009) indican que la expresión de NGN3 se produce en los islotes adultos y aumenta en condiciones de regeneración, lo que no pudo evidenciarse bajo estas condiciones experimentales. Sin embargo, no debe desestimarse la disminución del número de células  $\beta$  presentes en los islotes y un aumento en el número de islotes de menor área, los que serían factores que podrían incidir en el que no se pudieran determinar diferencias,



ya que una mayor expresión de estos factores en islotes más pequeños y con menor cantidad de células  $\beta$ , compensaría los efectos generados en la condición control.

La expresión de otros factores de transcripción relacionados con la diferenciación, desde precursores indiferenciados, hacia un fenotipo celular maduro fue similar entre los grupos. Respecto a ello, una vez que una célula se ha especificado, para adquirir uno de los distintos fenotipos celulares presentes en los islotes, es clave la regulación de la expresión de dos factores: PAX4 que permite la diferenciación hacia una célula productora de insulina y ARX que reprime la expresión de varios factores de transcripción, cambia la estructura de la cromatina e induce la diferenciación hacia una célula productora de glucagón.

La expresión de PAX4 fue similar entre los grupos experimentales. Sin embargo, de la misma forma que se indicó anteriormente, la menor proporción que ocupan en el interior de los islotes las células  $\beta$ , asociado a que algunas de éstas cambian su fenotipo hacia un estado de menor diferenciación, podría dar cuenta de la inexistencia de diferencias al comparar la expresión de este factor de transcripción. En relación a la expresión de ARX, este no presentó diferencias entre los grupos lo que concuerda con los resultados de la cuantificación del área inmunorreactiva a glucagón determinada en los islotes de este estudio.

Una vez que una célula endocrina desvía su ruta de desarrollo hacia la expresión de insulina, los factores de transcripción importantes para la producción y secreción de esta hormona son MAFA, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD1 y PDX1 (Green *et al.*, 2010). Durante el desarrollo fetal la especificación de las células, que les permite posteriormente formar parte del tejido pancreático, depende de la expresión de PDX1, ya que este permite la expresión de varios genes importantes para la adquisición del fenotipo exocrino y endocrino, siendo esencial para el desarrollo pancreático (Kaneto *et al.*, 2009).

Una vez que las células se han diferenciado hacia los precursores pancreáticos, la expresión de PDX1 se restringe sólo a las células endocrinas, principalmente las células  $\beta$  (Guz *et al.*, 1995). En relación a esto, la expresión de PDX1 sólo presentó una tendencia a disminuir en el grupo de hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona. Estudios previos indican que la administración de testosterona en hembras provoca un estado

proinflamatorio (Crisosto *et al.*, 2017) y aumenta el estrés oxidativo sistémico (Liu *et al.*, 2010) lo que, asociado a una menor disponibilidad de antioxidantes en las células de las hembras-T, podría generar este efecto ya que, ante condiciones de estrés, la expresión de PDX1 disminuye.

Kaneto *et al.* (2009) indican que bajo condiciones de estrés oxidativo la expresión del gen de insulina disminuye, lo que se debería a una menor expresión de PDX1 y MAFA, entre otros. De la misma forma, esta podría ser la causa por la cual, la expresión del ARNm de insulina, presentó una tendencia a disminuir en el grupo de hembras tratadas. Por ello, a pesar de los distintos factores, noxas o alteraciones que incidirían en la funcionalidad del páncreas endocrino, bajo las condiciones de este estudio, estas hembras aún no presentan una descompensación o una hiperglicemia, ambos fenómenos que caracterizan una DM2, sin dejar de considerar que se evidencia una menor sensibilidad a la insulina en el grupo de hembras-T. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en un modelo de ratas sometidas a reprogramación intrauterina por desnutrición, en el que la expresión de PDX1 e insulina disminuyeron significativamente (Xu *et al.*, 2011), indicando que la reducción en la expresión de PDX1 se ha considerado una de las causas de esta patología (Brissova *et al.*, 2005; Holland *et al.*, 2005), asociada a una alteración en la mantención de la masa de células  $\beta$  y la homeostasis de la glucosa.

A pesar de la tendencia a disminuir la expresión de PDX1, la expresión del ARNm de NKX6.1, presentó una tendencia a aumentar en las hembras-T. Este factor de transcripción es exclusivamente detectable en las células  $\beta$  y su rol es crítico en el acoplamiento entre el metabolismo, la expresión del gen y síntesis de insulina, junto con la mantención de la capacidad proliferativa de estas células (Schaffer *et al.*, 2013). Adicionalmente, previene la especificación de las células  $\alpha$  lo que permitiría mantener la identidad de las células  $\beta$  y evita que estas células puedan cambiar su fenotipo funcional hacia otro tipo de célula endocrina o la des-diferenciación de estas. Por ello, la tendencia al incremento en la expresión de este gen mantendría la funcionalidad de las células  $\beta$  evitando la progresión hacia una disfuncionalidad de ellas (Taylor *et al.*, 2013). Este fenómeno se refuerza por la inexistencia de diferencias en la expresión de factores de transcripción relacionados con la mantención del fenotipo funcional  $\alpha$  (MAFB, ARX).

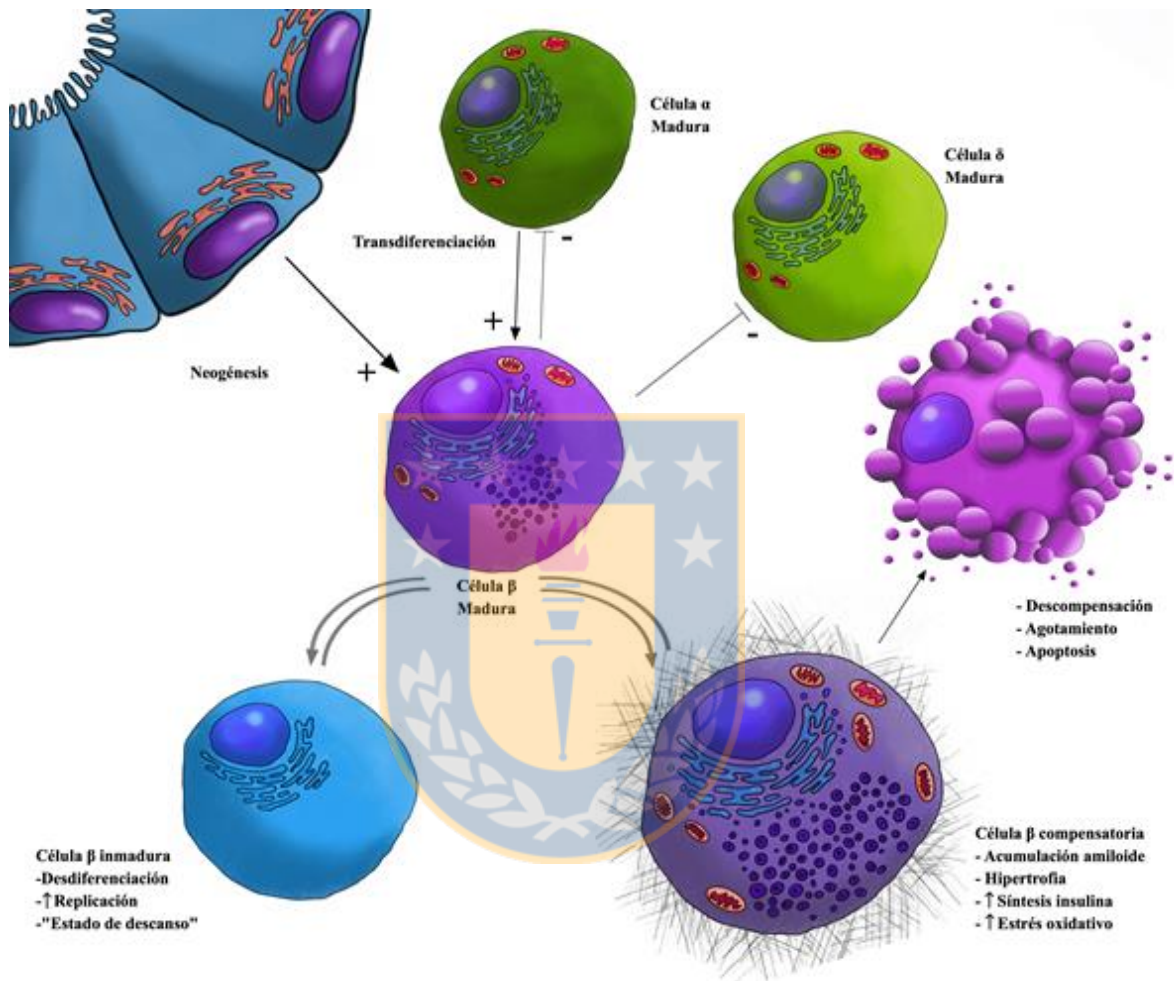
De esta forma una posible hipótesis respecto a los mecanismos que pudieran estar generándose en el páncreas endocrino es que pudieran existir, al menos, dos poblaciones de células  $\beta$ . Una población que sobre-expresa el ARNm de los factores de transcripción y proteínas involucradas en la capacidad de las células  $\beta$  de sensar la concentración plasmática de glucosa (GLUT2) y acoplar ésta con el metabolismo y otros procesos, incluyendo la síntesis y secreción de insulina (NKX6.1), permitiendo responder a las mayores demandas sistémicas de esta hormona y que, una vez que se agotan los mecanismos y sistemas intracelulares que les permiten compensar esta mayor demanda, siguen una de dos vías, la des-diferenciación o la muerte celular (Figura 11). La segunda población, correspondería a células  $\beta$  que han perdido el fenotipo funcional y cambian el patrón de expresión de genes hacia otros que representan un estado menos diferenciado (NGN3) que les permitiría recuperarse de la sobre-exigencia metabólico-funcional y dividirse, renovando la población de células que se pierde a través de la vía apoptótica. Esta hipótesis concuerda con lo mencionado por Talchai *et al.* (2012) quienes indican que la DM2 es gatillada por la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, lo que se asocia con una expansión de la masa de células  $\beta$ , el agotamiento de estas células y finalmente, la pérdida gradual de la masa funcional de células  $\beta$  a través de desdiferenciación y/o muerte celular. Así, se generarían distintas poblaciones de células  $\beta$  que difieren en su morfología, capacidad de responder a la glucosa, secreción de insulina, capacidad de proliferación y estado de maduración (Roscioni *et al.*, 2016; Salomon y Meda, 1986; Stefan *et al.*, 1987; Heimberg *et al.*, 1993; Katsuta *et al.*, 2012). Las diferencias entre estas células radicaría en su microambiente, en la arquitectura de los islotes y los distintos orígenes de las células  $\beta$  (Tritschler *et al.*, 2017). Esta hipótesis coincidiría con lo reportado por Dorrel *et al.* (2016) que establecen que existirían al menos 4 subtipos de células  $\beta$  que se diferenciarían por su secreción basal de insulina, la secreción de insulina estimulada por glucosa, la expresión de genes involucrados en la secreción de insulina, entre otros. La hipótesis que estos autores indican es que las diferentes poblaciones servirían para crear cambios suaves, más que agudos, en la secreción de insulina en respuesta a varios estímulos, esto aseguraría que no se provoquen cambios rápidos en la concentración plasmática de glucosa. No obstante, no estaría claro el origen de estas células considerando las diferentes vías de desarrollo que pueden dar lugar a ellas (replicación, neogénesis y/o transdiferenciación) o si son diferentes

estados funcionales e interconvertibles de un solo tipo de célula  $\beta$  (Talchai *et al.*, 2012; Dorrel *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2017).

De esta forma, la mantención de un estado apropiado de diferenciación de las células  $\beta$ , la estabilidad de los mecanismos dinámicos que regulan la expresión de los factores de transcripción en una secuencia y temporalidad adecuada, junto con una estructura adecuada de los islotes es clave para la síntesis y secreción de insulina a nivel pancreático, sumado a una respuesta fisiológica de los tejidos sensibles a la insulina para evitar el establecimiento y la progresión de una diabetes mellitus (Ackermann y Gannon, 2007). Sin embargo, en ciertas situaciones, la compensación funcional por parte de las células  $\beta$  parece ser insuficiente o está tan deteriorada, que incrementaría el trabajo y el estrés sobre estas células, resultando en un agotamiento funcional, desdiferenciación y finalmente la muerte de las células  $\beta$  (Chen *et al.*, 2017), produciéndose una variación en el proteoma en individuos que padecen DM2, caracterizado por un aumento en la expresión de proteínas involucradas en los procesos de arresto celular, apoptosis, proliferación y producción exagerada de citoquinas (Nyblom *et al.*, 2009).

La secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  no sólo tiene como rol fundamental la mantención de la concentración plasmática de glucosa, sino también es capaz de regular, en las células  $\beta$ , varios procesos celulares entre los que se encuentran la transcripción de genes (Leibiger *et al.*, 1998), la traducción (Leibiger *et al.*, 2000), el flujo de calcio (Xu *et al.*, 2000), la secreción de insulina (Aspinwall *et al.*, 2000; Leibiger *et al.*, 2002) y la sobrevivencia (Kwon *et al.*, 1999). De esta forma, múltiples señales provenientes de distintas fuentes garantizan un adecuado funcionamiento de las células  $\beta$  entre las que se pueden considerar factores humorales (hormonas, vitaminas, nutrientes, iones, etc.), estímulos neurógenos, así como también factores producidos y liberados dentro del islote (Leibiger *et al.*, 2002).

Figura 11: Modelo propuesto del efecto de exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la estructura de los islotes pancreáticos y las alteraciones que se producen sobre las células  $\beta$  pancreáticas en ovejas adultas.



Así, la insulina liberada actúa en forma autocrina regulando la producción y secreción de más insulina por parte de las células  $\beta$  (Leibiger *et al.*, 2002). El primer paso en la activación de la cascada de señalización es la unión de la insulina con su receptor, el que también puede ser activado por IGF-I e IGF-II, pero estas hormonas presentan una menor afinidad por este receptor. La unión de la insulina con su receptor permite el reordenamiento de la estructura interna de éste provocando la autofosforilación en residuos de tirosina, permitiendo el reclutamiento de los sustratos del receptor de insulina (IRS1 e IRS2), los que activan una vía de transducción de señales similar a la existente en los

tejidos sensibles a la insulina (Persaud *et al.*, 2008; Rhodes *et al.*, 2013). La activación de esta cascada de señalización interna provoca un aumento en la producción de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), producto de la enzima fosfatidilinositol 3-kinasa (Aspinwall *et al.*, 2000). Finalmente, uno de los efectores más importantes río abajo corresponde a la proteína quinasa B (PKB) o Akt. De esta forma, la insulina provocaría un efecto positivo sobre su propia síntesis al generar un cambio en el metabolismo de la célula que favorece la translocación de Pdx1 desde el citoplasma al núcleo, permitiendo la expresión del gen de insulina y glucocinasa, que sirve como el sensor, al interior de la célula  $\beta$ , para detectar cambios en la concentración plasmática de glucosa y favorece el movimiento de Foxo1 desde el núcleo al citoplasma, lo que disminuye la expresión de factores proapoptóticos, aumentando la sobrevivencia de estas células (Bouche *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2006; White, 2006). De la misma forma, la insulina aumentaría su propia secreción al incrementar el movimiento intracelular de calcio desde el retículo endoplasmático, lo que facilitaría el movimiento de las vesículas y la exocitosis de la insulina (Aspinwall *et al.*, 2000).

Estudios en individuos que padecen DM2 han demostrado que hay una disminución en la expresión del receptor de insulina, IRS2 y AKT lo que reduciría la activación de las señales mencionadas anteriormente (Gunton *et al.*, 2005). Esto coincide parcialmente con los resultados de este estudio, ya que la expresión de AKT fue significativamente menor en el grupo de hembras-T al compararlas con las hembras control, lo que podría indicar una alteración en los mecanismos intrapancreáticos que regulan la secreción de insulina, factor que ha sido implicado en la disfunción de las células  $\beta$ , ya que contribuiría negativamente a los mecanismos compensatorios que deben generarse para evitar la progresión de esta patología (Zarrouki *et al.*, 2014). Sin embargo, si bien no hay un aumento significativo en la expresión de IRS2, IR, IRS1 y PI3K en las hembras-T, el incremento podría indicar que se produce un mecanismo compensatorio que favorecería la activación de la vía de señalización insulínica en el interior de las células  $\beta$ . Respecto a esto, se ha indicado que la activación de IRS2 jugaría un rol fundamental en la compensación, por parte de las células  $\beta$ , ante una resistencia a la insulina (Rhodes *et al.*, 2013), ya que la activación selectiva de esta proteína modularía el crecimiento, proliferación y división de las células  $\beta$  (Bringhenti *et al.*, 2016; Ou *et al.*, 2016), favoreciendo el proceso de hipertrofia e hiperplasia que debe

generarse en el páncreas endocrino para contrarrestar la resistencia a la insulina (Jiang *et al.*, 2018).

La secreción de insulina es bifásica, presentando una secreción aguda (primeros 30 minutos) que es importante para mantener la tolerancia a la glucosa, por el rol que cumple ésta en suprimir la producción endógena de glucosa y regular la sensibilidad de los tejidos sensibles a esta hormona y una secreción crónica (120 minutos posteriores), responsable de regular la producción de glucosa entre comidas (Bouche *et al.*, 2010; Tokarz *et al.*, 2018). En individuos con DM2 la secreción aguda de insulina disminuye (Eriksson *et al.*, 1989), lo que incidiría en la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina, pero también en la señalización de la insulina (acoplamiento entre la producción y secreción de insulina estimulada por insulina) en el interior del páncreas endocrino, provocando una resistencia a la insulina en las mismas células  $\beta$ , lo que podría acelerar la disfunción de éstas como lo observado en la DM2 (Leibiger *et al.*, 2002).

En las células clásicamente conocidas como sensibles a la insulina, la activación del receptor de insulina provoca la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) desde vesículas intracelulares hacia la membrana plasmática, aumentando la velocidad de transporte de este azúcar hacia el interior de las células. Varios estudios han demostrado la expresión del ARNm y la presencia de la proteína Glut4 en el tejido pancreático de ratones, ratas y humanos (Bähr *et al.*, 2012; Brant *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 2004). Asimismo, se ha evidenciado que en individuos que padecen DM2 disminuye la expresión del ARNm de GLUT4, como así también la translocación de este transportador hacia la membrana limitando su funcionalidad y la respuesta de estos tejidos a la insulina (Ndisang *et al.*, 2009; Desrois *et al.*, 2004; Corbould, 2007).

En hembras expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona, tras la administración crónica de testosterona, disminuye significativamente la expresión de GLUT4 en el tejido pancreático total en comparación con las hembras-C, lo que coincide con los antecedentes anteriormente mencionados. Esto es similar a lo publicado por Bähr *et al.* (2012) quienes demostraron que al incubar células INS1, en condiciones de hiperglicemia e hiperinsulinemia, disminuye significativamente la expresión de este transportador. En cambio en una línea de células  $\alpha$ TC1.9, en condiciones de hiperinsulinemia, la expresión de

este transportador aumenta. Sin embargo, en el mismo estudio, al evaluar la expresión de este transportador en tejido pancreático en ratas y humanos diabéticos, la expresión aumenta significativamente. El mecanismo por el cual se generaría esto se desconoce, pero se postula que la insulina mediaría el efecto inhibitorio sobre las células  $\alpha$ , al modular la captación de glucosa a través del Glut4.

El resultado final de la expresión de los genes involucrados en la secreción de insulina estimulada por glucosa, la síntesis y secreción de insulina estimulada por insulina y de los factores de transcripción que mantienen el fenotipo funcional de las células  $\beta$  inciden en el contenido de insulina y Pdx1 en el interior de las células. Sin embargo, la expresión de estos ARNm y la síntesis de la proteína es altamente regulada a nivel transcripcional y traduccional (Talchai *et al.*, 2012). Por ello, a pesar que en las hembras-T hay una tendencia a disminuir la expresión del ARNm de insulina y PDX1, no hay diferencias en el contenido de Pdx1 e insulina al compararlas con las hembras-C. Esto se debería a que, a pesar de la tendencia a disminuir la expresión de PDX1, el contenido intracelular de esta proteína es similar entre los grupos, pero en el grupo de hembras-T hay una mayor abundancia de ésta en el interior del núcleo, al compararlas con las hembras-C.

Pdx1 es un factor de transcripción que puede encontrarse en el citoplasma o en el núcleo de las células  $\beta$  pancreáticas. La ubicación depende de la estrecha comunicación entre el metabolismo de la célula  $\beta$  y la concentración plasmática de glucosa. Al aumentar la concentración plasmática de glucosa, el contenido de ATP en el interior de la célula  $\beta$  aumenta y PDX1 transloca al núcleo en donde participa transactivando el gen de insulina y otros genes involucrados en la capacidad de sensor la concentración plasmática de glucosa y el metabolismo de esta, entre ellos GLUT2 y glucocinasa (Kaneto *et al.*, 2009). De esta forma, la mayor abundancia de Pdx1 en el núcleo se relacionaría con el aumento en la expresión del ARNm de GLUT2 y finalmente, en un contenido de insulina similar entre los grupos.

Limesand *et al.* (2006), en un modelo ovino de restricción del crecimiento intrauterino debido a estrés por calor, demostraron que se produce una alteración en la capacidad de oxidar glucosa en los islotes, una disminución en la síntesis y en el contenido de insulina, pero una mayor capacidad de secretar insulina, a pesar de una menor síntesis, debido a que



los islotes son más eficientes en la secreción de insulina, pero éste es incapaz de compensar completamente la disminución en el contenido de insulina. Esto se asemeja a los resultados obtenidos en este estudio; no obstante, en el estudio mencionado no se indica cuál es el mecanismo implicado en la compensación que se produciría. Finalmente, todo esto refuerza que en estos modelos se produciría una alteración en el acoplamiento entre el estímulo-secreción y estímulo-biosíntesis de insulina por el defecto generado ante los distintos eventos reprogramatorios.

De esta forma, a pesar de los mecanismos reprogramatorios que sufran los individuos durante su desarrollo y los nuevos insultos a los que se someta posteriormente durante la vida adulta, por ejemplo una hiperandrogenemia crónica, éste desarrollará varios mecanismos compensatorios para aumentar su probabilidad de sobrevivencia. Sin embargo, cuando su vía normal de desarrollo fetal se altera, parte de estos mecanismos se agotarían tempranamente, limitando su habilidad de adaptarse ante condiciones ambientales que no siempre se asemejan a aquellas sensadas *in utero*, lo que se traduciría en una desventaja evolutiva. A pesar de esto, lo interesante del fenómeno es la enorme versatilidad que tienen los distintos individuos y modelos animales ya que, sin importar cuál sea el insulto al que se someta, éstos desarrollan varios mecanismos diferentes ante una misma patología o condición; por ejemplo, disminución de la sensibilidad a la insulina para compensar las alteraciones homeostáticas producidas, pero con una reprogramación de su funcionalidad que limita cuantitativa y cualitativamente la capacidad de mantener estos mecanismos funcionando por periodos prolongados. Finalmente, el resultado de esto es el aumento en su susceptibilidad a padecer una serie de patologías entre las cuales se encuentra la DM2 que, al parecer, es la vía final común a una diversidad de insultos (Langley-Evans, 2015; Barker, 1997).

### **Perspectivas futuras**

En las décadas recientes se ha observado un rápido aumento en los desórdenes metabólicos en la población humana a nivel mundial, lo que representa un desafío significativo en salud pública (Alfaradhi y Ozanne, 2011). El aumento en la prevalencia de éstos se ha atribuido a los cambios en el estilo de vida y la dieta, con un aumento en el consumo de alimentos y

una disminución en el gasto energético que provoca el almacenamiento del exceso de energía a la forma de grasa (Lönn *et al.*, 2010; Mannerås-Holm *et al.*, 2011). Varios factores genéticos han sido asociados a esta condición; sin embargo, en la actualidad se reconoce que las influencias medioambientales tendrían un rol fundamental en la expresión de la DM2 y en la susceptibilidad a padecerla. La consecuencia del aumento del peso es un aumento en la predisposición a padecer diabetes mellitus, reconociéndose que la génesis de esta patología es multifactorial. En mujeres adultas fértiles, el síndrome de ovario poliquístico es una patología que, por las características fisiopatológicas del cuadro, aumentaría seriamente el riesgo a padecer DM2 (Legro *et al.*, 2010; Dunaif, 1995).

El síndrome de ovario poliquístico es una enfermedad multifacética que incluye desórdenes reproductivos, metabólicos y endocrinos; sin embargo, en la actualidad la etiología y fisiopatología de este cuadro aún no se comprende completamente (Abbott *et al.*, 2007). Este síndrome corresponde a la endocrinopatía más común en mujeres durante su vida reproductiva (Ehrmann *et al.*, 1995; Dunaif, 1997), con una prevalencia del 6-7% (Azziz *et al.*, 2004; Ezeh *et al.*, 2013) y es una de las patologías que genera mayores problemas a la salud pública e individual, pues conduce generalmente a DM2 en las mujeres que lo padecen (Arslanian *et al.*, 2001; Peppard *et al.*, 2001). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 116 millones de mujeres (3-4% de la población mundial) padece este síndrome (Kabel *et al.*, 2016), pero la prevalencia a nivel global varía altamente, estimándose que iría desde el 2,2% hasta un 26% en India, considerándose que en promedio el 10% de las mujeres padece esta patología (Bharathi *et al.*, 2017).

Este síndrome tiene un origen fuertemente hereditario y un 67-93% de las hijas nacidas de mujeres con SOP desarrollan esta enfermedad durante su vida adulta (Legro, 1995). Las manifestaciones clínicas y bioquímicas del SOP provienen principalmente del exceso de andrógenos en estas mujeres (Legro *et al.*, 1998). Un gran número de estudios han demostrado que existiría una base genética para el SOP lo que generaría diferentes características de este síndrome y que dan lugar a la alta variabilidad observada en la manifestación clínica de esta patología (Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2012). Sin embargo, la heterogeneidad fenotípica observada en hermanas que padecen SOP ha sugerido que, además de la contribución genética, existirían otros factores en la presentación de esta

patología, entre ellos los medioambientales (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2006). Esto es consistente con el establecimiento del rol de los disruptores endocrinos en la etiología del SOP, como así también de la obesidad, diabetes mellitus, disfunción endotelial y enfermedades cardiovasculares (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Teede *et al.*, 2010).

El costo económico asociado al SOP excede los varios millones de dólares anualmente en Estados Unidos (Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2011). Sin embargo, a pesar de esto, un enorme porcentaje de mujeres que padece SOP no responden a los protocolos de inducción de ovulación, e incluso, si la ovulación se produce, las tasas de concepción son bajas y un alto porcentaje de los embarazos termina con abortos espontáneos. Un riesgo asociado es que estas mujeres presentan alto riesgo de hiperestimulación ovárica y gestaciones múltiples (Messinis, 2005; Tummon *et al.*, 2005; Boomsma *et al.*, 2008). Finalmente, una consecuencia importante de esto es que muchas de estas mujeres desarrollan diabetes gestacional y preeclampsia (Janssen *et al.*, 2008; Himelein y Tatcher, 2006).

Se ha estimado que cerca del 70% de estas mujeres manifiestan resistencia a la insulina (Dunaif, 1997) y también aumenta considerablemente en ellas el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, dislipidemia, hipertensión y cáncer endometrial (Hoffman y Ehrmann, 2008; Navaratnarajah *et al.*, 2008; Perciaccante, 2009; Escobar-Morreale *et al.*, 2011). Todo esto enfatiza la necesidad de no sólo abordar los problemas de infertilidad asociados a este síndrome, sino también prevenir las alteraciones debilitantes a largo plazo y, aún más importante, la transferencia transgeneracional de ésta, y otras alteraciones no deseadas, a la descendencia.

Actualmente, evidencia creciente sugiere que las disfunciones que se manifiestan en la vida adulta pueden resultar de una programación anormal de los sistemas fisiológicos que se están desarrollando durante la vida intrauterina (Dumesic *et al.*, 2007; Davies y Norman, 2002; Lillycrop y Burdge, 2011). Por ello, el establecimiento y la generación de modelos animales que permitan el estudio de esta y otras patologías programadas *in utero*, ha aumentado el conocimiento al respecto de la fisiopatología de estas condiciones (Abbott *et al.*, 2006). El empleo de modelos animales ha provisto información invaluable acerca de los mecanismos involucrados en la reprogramación del desarrollo, debido a que las condiciones a las cuales los fetos son expuestos, pueden ser controladas y posteriormente,

en la vida pre y postnatal, múltiples muestras de plasma y tejidos pueden obtenerse desde la madre, la placenta, los fetos o de las crías en varias etapas del desarrollo de un individuo (Alfaradhi y Ozanne, 2011) o inmediatamente tras la exposición a un insulto reprogramador (Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2013a,b). El desarrollo y la aplicación de estos modelos animales del SOP provee una valiosa fuente de información acerca de los mecanismos etiológicos y patofisiológicos temporales que son complejos o difíciles de llevar a cabo en humanos (Abbott *et al.*, 2007; Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2012). Sin embargo, como cada especie tiene sus diferencias en la funcionalidad de sus sistemas orgánicos, deben considerarse algunas limitaciones al compararlas con los humanos. Por ello, es necesario considerar estas diferencias cuando los hallazgos de las distintas aproximaciones experimentales sean aplicados a la clínica o en medicina translacional (Abbott *et al.*, 2004).

Interesantemente, la mayoría de los modelos animales parecen converger a un fenotipo común en la cría caracterizado por hiperfagia, aumento del depósito de tejido adiposo, hipertensión y resistencia a la insulina (Alfaradhi y Ozanne, 2011). De esta forma, a pesar que la reprogramación es un proceso indudablemente multifactorial, la enorme diversidad de modelos comparten características fenotípicas similares, lo que sugiere la existencia de vías mecanicísticas comunes en las consecuencias de ellos (Alfaradhi y Ozanne, 2011). Así, los diversos modelos animales presentan un enorme desafío al determinar qué componente o componentes y en qué momento causan los efectos adversos en la cría y que, posteriormente, condicionan en ellas un aumento del riesgo a padecer DM2.

Los modelos animales de reprogramación fetal permiten determinar el momento preciso durante la gestación, en el que los cambios cruciales en la funcionalidad de órganos y sistemas específicos resultan últimamente en defectos específicos provocados por el SOP. Además, permiten determinar las disfunciones a nivel transcripcional, traduccional o postraduccional que pueden ser blanco de intervención terapéutica durante la pre y post-concepción (Abbott *et al.*, 2007).

A pesar de que el modelo ovino no permite determinar directamente la causalidad del SOP, una ventaja considerable es que este modelo permitiría determinar la contribución de los andrógenos y estrógenos al fenómeno de reprogramación; determinar los periodos críticos del desarrollo de cada órgano y su contribución particular al fenotipo generado; estimar el

rol de la exposición a químicos disruptores endocrinos u otras sustancias durante el desarrollo temprano; determinar los distintos mediadores neurales, metabólicos y endocrinos en la reprogramación; y determinar los mecanismos epigenéticos involucrados en las consecuencias metabólicas y/o reproductivas que manifiesta la descendencia, entre otros (Padmanabhan *et al.*, 2012).

Adicionalmente y específicamente a nivel pancreático, el empleo de este y otros modelos de exposición prenatal y postnatal temprana a diversas sustancias con efectos reprogramatorios es clave para comprender los mecanismos involucrados en el aumento en la predisposición a padecer resistencia a la insulina y DM2. Hales y Barker (2001) señalan que una consecuencia común a varios insultos que puede sufrir un individuo durante su desarrollo es el bajo peso al nacer lo que provoca un estado metabólico conocido como “fenotipo ahorrativo”. Comúnmente, éste se caracteriza por un aumento en el depósito de tejido adiposo en regiones donde normalmente se produce acumulación de grasa en las distintas especies y que es un factor que se relaciona con resistencia a la insulina. Adicionalmente, el aumento del tejido adiposo produce depósitos ectópicos de grasa en el músculo esquelético, cardíaco y en el hígado, afectando su funcionalidad, lo que contribuye a la resistencia a la insulina, pero también se producen depósitos anormales de tejido adiposo en el páncreas endocrino y en el interior de las células  $\beta$ , lo que contribuiría al riesgo a padecer DM2, primeramente al condicionar la respuesta de los tejidos a la insulina y, secundariamente, al comprometer la funcionalidad del órgano y las células que producen insulina.

La ventaja que ofrece este estudio es la determinación de algunos de los factores que incidirían en el efecto reprogramatorio resultante de la administración de testosterona a la hembra gestante; las consecuencias metabólicas y endocrinas en la descendencia; la variación en la sensibilidad de los tejidos a la insulina durante las distintas etapas de desarrollo somático; el efecto de los esteroides endógenos y el efecto del exceso agudo o crónico de esteroides exógenos anómalos. Finalmente, define los mecanismos compensatorios a nivel pancreático y de los islotes de Langerhans para compensar las alteraciones previamente inducidas por los efectos reprogramatorios de la exposición prenatal a un exceso de testosterona.

## 6. CONCLUSIONES

- El protocolo de administración de testosterona en ovejas gestantes produce una hiperandrogenemia sostenida durante el periodo en el que se inyecta esta hormona.
- La administración de testosterona en ovejas gestantes provoca un aumento en la concentración plasmática de testosterona y una disminución de la concentración de progesterona. En fetos, aumenta la concentración plasmática de testosterona y estradiol y disminuye la concentración de insulina, IGF-II y adiponectina, junto con una masculinización del genital externo del feto hembra ovino a los 120 días de gestación.
- La exposición prenatal a un exceso de testosterona no produce alteraciones en la sensibilidad a la insulina en ovejas peripuberales enteras de 26 semanas de edad.
- La exposición prenatal a un exceso de testosterona no modifica la sensibilidad a la insulina en hembras ovinas durante la postpubertad temprana, 30 semanas de edad, pero provoca alteraciones en el metabolismo tisular de la glucosa.
- La exposición prenatal a un exceso de testosterona no induce una alteración en la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina en hembras ovinas ooforectomizadas de 30 semanas de edad
- En ovejas EPT enteras la administración crónica de testosterona disminuye la sensibilidad de los tejidos a la insulina durante la postpubertad tardía.
- La administración aguda de testosterona en ovejas EPT ooforectomizadas, de 38 semanas de edad, altera la sensibilidad de los tejidos a la insulina, evidenciándose una disfunción en la capacidad de sensor la concentración plasmática de glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas.
- La administración crónica de testosterona en hembras ovinas ooforectomizadas no induce alteraciones en la sensibilidad de los tejidos a la insulina, pero se evidencian alteraciones en el metabolismo de la glucosa en los tejidos a las 38 semanas de edad.
- La administración crónica de testosterona en ovejas adultas EPT provoca una alteración en la arquitectura de los islotes de Langerhans, caracterizada por una disminución del área

ocupada por las células  $\beta$  y una distribución anormal de los distintas células endocrinas del islote. Sin embargo, se presentan mecanismos compensatorios moleculares que podrían compensar las alteraciones morfológicas evidenciadas en los islotes y sus potenciales consecuencias sobre la homeostasis de la glucosa.



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. 2005b. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update* 11(4): 357-374.
- Abbott DH, Bruns CM, Barnett DK, Dumesic DA. 2006. Fetal programming of polycystic ovary syndrome. In: Kovacs WG y RL Norman, eds. *Polycystic Ovary Syndrome*, 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Abbott DH, Bruns CR, Barnett DK, Dunaif A, Goodfriend TL, Dumesic DA, Tarantal AF. 2010. Experimentally induced gestational androgen excess disrupts glucoregulation in rhesus monkey dams and their female offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299(5): E741-E745.
- Abbott DH, Dumesic DA, Levine JE, Dunaif A, Padmanabhan V. 2007. Animal models and fetal programming of the polycystic ovary syndrome. In: Azziz R, JE Nestler & D Dewailly, eds. *Androgen excess disorders in women: polycystic ovary syndrome and other disorders*. 2nd. ed. New Jersey, EEUU, Humana Press.
- Abbott DH, Foong SC, Barnett DK, Dumesic DA. 2004. Nonhuman primates contribute unique understanding to anovulatory infertility in women. *ILAR J* 45(2): 116-131.
- Abbott DH, Nicol LE, Levine JE, Xu N, Goodarzi MO, Dumesic DA. 2013. Nonhuman primate models of polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 373(1-2):21-28.
- Abbott DH, Zhou R, Bird IM, Dumesic DA, Conley AJ. 2008. Fetal programming of adrenal androgen excess: lessons from a nonhuman primate model of polycystic ovary syndrome. *Endocr Dev* 13: 145-158.
- Abi Salloum B, Herkimer C, Lee JS, Veiga-Lopez A, Padmanabhan V. 2012. Developmental programming: prenatal and postnatal contribution of androgens and insulin in the reprogramming of estradiol positive feedback disruptions in prenatal testosterone-treated sheep. *Endocrinology* 153(6): 2813-2822.
- Ackermann AM, Gannon M. 2007. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* 38(1-2): 193-206.
- Adrian TE, Bloom SR, Hermansen K, Iversen J. 1978. Pancreatic polypeptide, glucagon and insulin secretion from the isolated perfused canine pancreas. *Diabetologia* 14: 413-417.
- Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H. 1997. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385: 257-260.
- Alarcón C, Wicksteed B, Rhodes CJ. 2002. Regulation of the production and secretion of insulin. *Av Diabetol* 18: 168-174.
- Alfaradhi MZ, Ozanne SE. 2011. Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Front Genet* 2: 27. doi: 10.3389/fgene.2011.00027.



- Al-Masri M, Krishnamurthy M, Li J, Fellows GF, Dong HH, Goodyer CG, Wang R. 2010. Effect of forkhead box O1 (FOXO1) on beta cell development in the human fetal pancreas. *Diabetologia* 53(4): 699-711.
- Araújo TG, Oliveira AG, Saad MJ. 2013. Insulin-resistance-associated compensatory mechanisms of pancreatic Beta cells: a current opinion. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 146. doi: 10.3389/fendo.2013.00146
- Arslanian SA, Lewy VD, Danadian K. 2001. Glucose intolerance in obese adolescents with polycystic ovary syndrome: roles of insulin resistance and beta-cell dysfunction and risk of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 66-71.
- Artner I, Hang Y, Mazur M, Yamamoto T, Guo M, Lindner J, Magnuson MA, Stein R. 2010. MafB regulate genes critical to beta-cells in a unique temporal manner. *Diabetes* 59: 2530–2539.
- Ashcroft FM, Rorsman R. 2012. Diabetes mellitus and the  $\beta$  cell: the last ten years. *Cell* 148: 1160-1171.
- Asli-Bala K, Demir N, Tuncer O, Kocaman S, Flanagan SE. 2017. Congenital Hyperinsulinism: A Novel Mutation in the KCNJ11 Gene. *JOP (J Pancreas)* 18(2): 151-153.
- Aspinwall CA, Qian WJ, Roper MG, Kulkarni RN, Kahn CR, Kennedy RT. 2000. Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in insulin-stimulated insulin secretion in beta-cells. *J Biol Chem* 275(29): 22331-22338
- Awasthi YC, Yang Y, Tiwari NK, Patrick B, Sharma A, Li J, Awasthi S. 2004. Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases. *Free Radic Biol Med* 37(5): 607-619.
- Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. 2004. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2745-2749.
- Azziz R. 2003. Androgen excess is the key element in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 80(2): 252-254.
- Badawoud MH. 2006. The effect of maternal diabetes on pancreatic islets in newborn rats: a quantitative and immunocytochemical study. *Folia Morphol (Warsz)* 65(2): 152-156.
- Bähr I, Bazwinsky-Wutschke I, Wolgast S, Hofmann K, Streck S, Mühlbauer E, Wedekind D, Peschke E. 2012. GLUT4 in the endocrine pancreas--indicating an impact in pancreatic islet cell physiology? *Horm Metab Res* 44(6): 442-450.
- Balaji S, Napolitano T, Silvano S, Friano ME, Garrido-Utrilla A, Atlíja J, Collombat P. 2018. Epigenetic control of pancreatic regeneration in diabetes. *Genes (Basel)* 9(9). pii: E448. doi: 10.3390/genes9090448.

- Baptista R, de Souza A, Krause W, de Assis W, Rodrigues R, Anaruma, Gama E. 2017. Effects of resistance training on liver structure and function of aged rats. *The Aging Male* 20(2): 134-137.
- Baptiste CG, Battista MC, Trottier A, Baillargeon JP. 2010. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122(1-3): 42-52.
- Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. 2002. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 31: 1235-1239.
- Barker DJ, Larsen G, Osmond C, Thornburg KL, Kajantie E, Eriksson JG. 2012. The placental origins of sudden cardiac death. *Int J Epidemiol* 41(5): 1394-1399.
- Barker DJ. 1994. Programming the baby. In: *Mothers, babies and disease in later life*. London: BMJ Publishing Group. pp. 14-36.
- Barker DJ. 1995. Fetal origins of coronary heart diseases. *Brit Med J* 311: 171-174.
- Barker DJ. 1997a. The long-term outcome of retarded fetal growth. *Clin Obstet Gynecol* 40(4): 853-863.
- Barker DJ. 1997b. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition* 13(9): 807-813.
- Barnes RB, Rosenfield RL, Burstein S, Ehrmann DA. 1989. Pituitary-ovarian responses to nafarelin testing in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 320(9): 559-565.
- Bateson P. 2005. The return of the whole organism. *J Biosci* 30: 31–39.
- Beckett EM, Astapova O, Steckler TL, Veiga-Lopez A, Padmanabhan V. 2014. Developmental programming: impact of testosterone on placental differentiation. *Reproduction* 148(2): 199-209.
- Beeson M, Sajan MP, Dizon M, Grebenev D, Gomez-Daspert J, Miura A, Kanoh Y, Powe J, Bandyopadhyay G, Standaert ML, Farese RV. 2003. Activation of protein kinase C- $\zeta$  by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise. *Diabetes* 52(8): 1926-1934.
- Ben-Othman N, Courtney M, Vieira A, Pfeifer A, Druelle N, Gjernes E, Faurite B, Avolio F, Collombat P. 2013. From pancreatic islet formation to beta-cell regeneration. *Diabetes Res Clin Pract* 101(1): 1-9.
- Berends LM, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Cripps RL, Ozanne SE. 2013. Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 37(8): 1051-1057.
- Bharathia RV, Swetha S, Neerajaa J, Madhavica JV, Janani DM, Rekha SN, Ramya S, Usha B. 2017. An epidemiological survey: Effect of predisposing factors for PCOS in Indian urban and rural population. *Middle East Fertil Soc J* 22: 313-316.

- Blouin K, Nadeau M, Perreault M, Veilleux A, Drolet R, Marceau P, Mailloux J, Luu-The V, Tchernof A. 2010. Effects of androgens on adipocyte differentiation and adipose tissue explant metabolism in men and women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 72: 176-188.
- Boomsma CM, Fauser BC, Macklon NS. 2008. Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med* 26(1): 72-84.
- Bouche C, Lopez X, Fleischman A, Cypess AM, O'Shea S, Stefanovski D, Bergman RN, Rogatsky E, Stein DT, Kahn CR, Kulkarni RN, Goldfine AB. 2010. Insulin enhances glucose-stimulated insulin secretion in healthy humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(10): 4770-4775.
- Bouche C, Lopez X, Fleischman A, Cypess AM, O'Shea S, Stefanovski D, Bergman RN, Rogatsky E, Stein DT, Kahn CR, Kulkarni RN, Goldfine AB. 2010. Insulin enhances glucose-stimulated insulin secretion in healthy humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(10): 4770-4775.
- Boujendar S, Arany E, Hill D, Remacle C, Reusens B. 2003. Taurine supplementation of a low protein diet fed to rat dams normalizes the vascularization of the fetal endocrine pancreas. *J Nutr* 133(9): 2820-2825.
- Boujendar S, Reusens B, Merezak S, Ahn MT, Arany E, Hill D, Remacle C. 2002. Taurine supplementation to a low protein diet during foetal and early postnatal life restores a normal proliferation and apoptosis of rat pancreatic islets. *Diabetologia* 45(6): 856-866.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brant AM, McCoid S, Thomas HM, Baldwin SA, Davies A, Parker JC, Gibbs EM, Gould GW. 1992. Analysis of the glucose transporter content of islet cell lines: implications for glucose-stimulated insulin release. *Cell Signal* 4(6): 641-650.
- Brereton MF, Rohm M, Ashcroft FM. 2016.  $\beta$ -Cell dysfunction in diabetes: a crisis of identity? *Diabetes Obes Metab* 18 (Suppl 1): 102-109.
- Bringhenti I, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. 2016. The insulin signaling pathway of the pancreatic islet is impaired in adult mice offspring of mothers fed a high-fat diet. *Nutrition* 32(10): 1138-1143.
- Brissova M, Blaha M, Spear C, Nicholson W, Radhika A, Shiota M, Charron MJ, Wright CV, Powers AC. 2005. Reduced PDX-1 expression impairs islet response to insulin resistance and worsens glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(4): E707-E714.
- Brolén GK, Heins N, Edsbacke J, Semb H. 2005. Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells. *Diabetes* 54(10): 2867-2874.
- Bruce AW. 2013. Generating different genetic expression patterns in the early embryo: insights from the mouse model. *Reprod Biomed Online* 27(6): 586-592.

- Butler AE, Janson S, Bonner-Weir R, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102-110.
- Butler E, Dhawan S. 2015.  $\beta$ -Cell identity in type 2 diabetes: lost or found? *Diabetes* 64: 2698-2700.
- Cabello, P. 2006. Estudio de la sensibilidad a la insulina en machos ovinos de 5-10-20 y 30 semanas de edad expuestos a un exceso de testosterona in utero. Memoria de título Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán.
- Cardoso R, Veiga-Lopez A, Moeller J, Beckett E, Pease A, Keller E, Madrigal V, Chazenbalk G, Dumesic D, Padmanabhan V. 2016. Developmental programming: impact of gestational steroid and metabolic milieu on adiposity and insulin sensitivity in prenatal testosterone-treated female sheep. *Endocrinology* 157(2): 522–535.
- Cardoso RC, Padmanabhan V. 2019. Prenatal Steroids and Metabolic Dysfunction: Lessons from Sheep. *Annu Rev Anim Biosci* 15(7): 337-360.
- Cardoso RC, Puttabyatappa M, Padmanabhan V. 2015. Steroidogenic versus metabolic programming of reproductive neuroendocrine, ovarian and metabolic dysfunctions. *Neuroendocrinology* 102(3): 226-237.
- Carlsen SM, Jacobsen G, Romundstad P. 2006. Maternal testosterone levels during pregnancy are associated with offspring size at birth. *Eur J Endocrinol* 155(2): 365-370.
- Chan SJ, Keim P, Steiner DF. 1976. Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 1964-1968.
- Chandra R, Liddle RA. 2014. Recent advances in the regulation of pancreatic secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 30(5): 490-494.
- Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, Bozsak R, Speier S. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Metab* 6(9): 943-957.
- Chen J, Shen S, Tan Y, Xia D, Xia Y, Cao Y, Wang W, Wu X, Wang H, Yi L, Gao Q, Wang Y. 2015. The correlation of aromatase activity and obesity in women with or without polycystic ovary syndrome. *J Ovarian Res* 8: 11. doi: 10.1186/s13048-015-0139-1.
- Chiu SL, Cline HT. 2010. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev*. 5:7. doi: 10.1186/1749-8104-5-7.
- Ciaraldi TP, el-Roeiy A, Madar Z, Reichart D, Olefsky JM, Yen SS. 1992. Cellular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 577-583.
- Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, Cooper GJ, Holman RR, Turner RC. 1988. Islet amyloid, increased  $\alpha$ -cells, reduced  $\beta$ -cells and

- exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9: 151-159.
- Clarke IJ, Scaramuzzi RJ, Short RV. 1976. Sexual differentiation of the brain: endocrine and behavioural responses of androgenized ewes to oestrogen. *J Endocrinol* 71(1): 175-176.
- Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Broccoli V, Krull J, Ponte I, Mundiger T, Smith J, Gruss P, Serup P, Mansouri A. 2005. The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development* 132: 2969-2980.
- Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Mansouri A. 2006. Specifying pancreatic endocrine cell fates. *Mech Dev* 123: 501-512.
- Corbould A. 2007. Chronic testosterone treatment induces selective insulin resistance in subcutaneous adipocytes of women. *J Endocrinol* 192(3): 585-594.
- Corbould A. 2008a. Effects of androgens on insulin action in women: is androgen excess a component of female metabolic syndrome? *Diabetes Metab Res Rev* 24(7): 520-532.
- Corbould A. 2008b. Insulin resistance in skeletal muscle and adipose tissue in polycystic ovary syndrome: are the molecular mechanisms distinct from type 2 diabetes? *Panminerva Med* 50(4): 279-294.
- Costes S, R Langen, T Gurlo, AV Matveyenko, PC Butler. 2013. B-Cell failure in type 2 diabetes: a case of asking too much of too few? *Diabetes* 62: 327-335.
- Couzin-Frankel J, 2013. How Does Fetal Environment Influence Later Health? *Science* 340: 1160-1161.
- Crews D, McLachlan JA. 2006. Epigenetics, evolution, endocrine disruption, health, and disease. *Endocrinology* 147(6 Suppl): S4-S10.
- Crisosto N, Flores C, Maliqueo M, Echiburú B, Vásquez J, Maluenda F, Sir-Petermann T. 2017. Testosterone increases CCL-2 expression in visceral adipose tissue from obese women of reproductive age. *Mol Cell Endocrinol* 444: 59-66.
- Csaba Z, Dournaud P. 2001. Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides* 35: 1-23.
- Davies MJ, Norman RJ. 2002. Programming and reproductive functioning. *Trends Endocrinol Metab* 13(9): 386-392.
- De Blasio MJ, Dodic M, Jefferies AJ, Moritz KM, Wintour EM, Owens JA. 2006. Maternal exposure to dexamethasone or cortisol in early pregnancy differentially alters insulin secretion and glucose homeostasis in adult male sheep offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(1): E75-E82.
- de Moura EG, Lisboa PC, Passos MC. 2008. Neonatal programming of neuroimmunomodulation- role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation* 15: 176-188.

- Dell R, S Holleran, R Ramakrishnan. 2002. Sample size determination. *ILAR Journal* 43(2): 207-213.
- Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, Doliba N, Lian MM, Frank A, Velidedeoglu E, Desai NM, Koeberlein B, Wolf B, Barker CF, Naji A, Matschinsky FM, Markmann JF. 2004. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 53(3): 624-32.
- Desrois M, Sidell RJ, Gauguier D, King LM, Radda GK, Clarke K. 2004. Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. *Cardiovasc Res* 61(2): 288-296.
- Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. 2012. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev* 33(6): 981-1030.
- Diamanti-Kandarakis E, Kandaraki E, Christakou C, Panidis D. 2009. The effect of pharmaceutical intervention on lipid profile in polycystic ovary syndrome. *Obes Rev* 10(4): 431-441.
- Diamanti-Kandarakis E, Paterakis T, Kandarakis HA. 2006. Indices of low-grade inflammation in polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1092: 175-186.
- Diamond MP, Grainger D, Diamond MC, Sherwin RS, Defronzo RA. 1998. Effects of methyltestosterone on insulin secretion and sensitivity in women. *J Clin Endocrinol Metab* 83(12): 4420-4425.
- Doi Y, Kubo M, Ninomiya T, Yonemoto K, Iwase M, Arima H, Hata J, Tanizaki Y, Iida M, Kiyohara Y. 2007. Impact of Kir6.2 E23K polymorphism on the development of type 2 diabetes in a general Japanese population: The Hisayama Study. *Diabetes* 56(11): 2829-2833.
- Dorrell C, Schug J, Canaday PS, Russ HA, Tarlow BD, Grompe MT, Horton T, Hebrok M, Streeter PR, Kaestner KH, Grompe M. Human islets contain four distinct subtypes of  $\beta$  cells. *Nat Commun* 7: 11756. doi: 10.1038/ncomms11756.
- Dumesic DA, Abbott DH, Padmanabhan V. 2007. Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. *Rev Endocr Metab Disord* 8: 127-141.
- Dumortier M, Brandou F, Perez-Martin A, Fedou C, Mercier J, Brun JF. 2003. Low intensity endurance exercise targeted for lipid oxidation improves body composition and insulin sensitivity in patients with the metabolic syndrome. *Diabetes Metab* 29(5): 509-518.
- Dumortier O, Blondeau B, Duvill   B, Reusens B, Br  ant B, Remacle C. 2007. Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. *Diabetologia* 50(12): 2495-2503.
- Dunaif A, Xia J, Book CB, Schenker E, Tang Z. 1995. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 96(2): 801-810.

- Dunaif A. 1995. Hyperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 98(1A): 33S-39S.
- Dunaif A. 1997. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 18(6): 774-800.
- Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL. 1995. Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocr Rev* 16(3): 322-353.
- Ehrmann DA, Cavaghan MK, Imperial J, Sturis J, Rosenfield RL, Polonsky KS. 1997. Effects of metformin on insulin secretion, insulin action, and ovarian steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82(2): 524-530.
- Ehrmann DA, Rosenfield RL, Barnes RB, Brigell DF, Sheikh Z. 1992. Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. *N Engl J Med* 327(3): 157-162.
- Eisner JR, Dumesic DA, Kemnitz JW, Abbott DH. 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.
- Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. 2008. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29(1):42-61.
- Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widén E, Schalin C, Groop L. 1989. Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 321(6): 337-343.
- Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, González F. 2011. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril* 95(3): 1048-1058.e1-2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.11.036.
- Ezeh U, Pall M, Mathur R, Dey D, Berman D, Chen IY, Dumesic DA, Azziz R. 2013. Effects of endogenous androgens and abdominal fat distribution on the interrelationship between insulin and non-insulin-mediated glucose uptake in females. *J Clin Endocrinol Metab* 98(4): 1541-1548.
- Fall C, Osmond C. 2013. Commentary: The developmental origins of health and disease: an appreciation of the life and work of Professor David J.P. Barker, 1938-2013. *Int J Epidemiol* 42(5): 1231-1232.
- Farese RV, Sajan MP, Standaert ML. 2005. Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)* 230(9): 593-605.
- Fernández-Real JM, Pickup JC. 2008. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 19: 10-16.

- Ferrando AA, Sheffield-Moore M, Paddon-Jones D, Rolfe RR, Urban RJ. 2003. Differential anabolic effects of testosterone and amino acid feeding in older men. *J Clin Endocrinol Metabol* 88(1): 358-362.
- Ferrando AA, Tipton KD, Doyle D, Phillips SM, Cortiella J, Wolfe RR. 1998. Testosterone injection stimulates net protein synthesis but not tissue amino acid transport. *Am J Physiol* 275(5): E864-E871.
- Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. 2010. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 303(3): 235-241.
- Ford S.P., Odhiambo J.F. 2017. Maternal Obesity and Implications for Fetal Programming. In: Rajendram R., Preedy V., Patel V. (Eds) *Diet, Nutrition, and Fetal Programming. Nutrition and Health*. Humana Press, Cham. pp. 171-184.
- Frayling TM. 2007. Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nat Rev Genet* 8(9): 657-662.
- Fu Z, ER Gilbert, D Liu. 2013. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic b-cell dysfunction in diabetes. *Current Diabetes Reviews* 9: 25–53.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114(12): 1752-1761.
- Gallagher EJ, LeRoith D. 2011. Minireview: IGF, insulin, and cancer. *Endocrinology* 152(7): 2546-2551.
- Gardner DS, Buttery PJ, Daniel Z, Symonds ME. 2007. Factors affecting birth weight in sheep: maternal environment. *Reproduction* 133(1): 297-307.
- Garmendia ML, Lera L, Sánchez H, Uauy R, Albala C. 2009. Homeostasis model assessment (HOMA) values in Chilean elderly subjects. *Rev Med Chil* 137(11): 1409-1416.
- Gatford KL, Mohammad SN, Harland ML, De Blasio MJ, Fowden AL, Robinson JS, Owens JA. 2008. Impaired beta-cell function and inadequate compensatory increases in beta-cell mass after intrauterine growth restriction in sheep. *Endocrinology* 149(10): 5118-5127.
- Gatford KL, Mohammad SN, Harland ML, De Blasio MJ, Fowden AL, Robinson JS, Owens JA. 2008. Impaired beta-cell function and inadequate compensatory increases in beta-cell mass after intrauterine growth restriction in sheep. *Endocrinology* 149(10): 5118-5127.
- Gispén WH, Biessels GJ. 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends in Neurosciences* 23(11): 542–549.
- Glauser DA, Schlegel W. 2007. The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic beta cells. *J Endocrinol* 193(2): 195-207.
- Goff LA, Groff AF, Sauvageau M, Traves-Gibson Z, Sanchez-Gomez DB, Morse M, Martin RD, Elcavage LE, Liapis SC, Gonzalez-Celeiro M, Plana O, Li E, Gerhardinger



- C, Tomassy GS, Arlotta P, Rinn JL. 2015. Spatiotemporal expression and transcriptional perturbations by long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(22): 6855-6862.
- González F, Nair KS, Daniels JK, Basal E, Schimke JM. 2012. Hyperandrogenism sensitizes mononuclear cells to promote glucose-induced inflammation in lean reproductive-age women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(3): E297-E306.
- Goodarzi MO, Erickson S, Port SC, Jennrich RI, Korenman SG. 2005. beta-cell function: a key pathological determinant in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90(1): 310-315.
- Goosse K, Bouckennooghe T, Balteau M, Reusens B, Remacle C. 2009. Implication of nitric oxide in the increased islet-cells vulnerability of adult progeny from protein-restricted mothers and its prevention by taurine. *J Endocrinol* 200(2): 177-187.
- Gopalakrishnan K, Mishra JS, Chinnathambi V, Vincent KL, Patrikeev I, Motamedi M, Saade GR, Hankins GD, Sathishkumar K. 2016. Elevated Testosterone Reduces Uterine Blood Flow, Spiral Artery Elongation, and Placental Oxygenation in Pregnant Rats. *Hypertension* 67(3): 630-639.
- Gouzi M, Kim YH, Katsumoto K, Johansson K, Grapin-Botton A. 2011. Neurogenin3 initiates stepwise delamination of differentiating endocrine cells during pancreas development. *Dev Dyn* 240: 589-604.
- Goy RW, Uno H, Sholl SA. 1988. Psychological and anatomical consequences of prenatal exposure to androgens in female rhesus. In Mori T and Nagasawa H (Eds) *Toxicity of Hormones in Perinatal Life*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp 127-142.
- Green AS, PJ Rozance, SW Limesand. 2010. Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. *J Endocrinol* 205: 211-224.
- Grulet H, Durlach V, Hecart AC, Gross A, Leutenegger M. 1993. Study of the rate of early glucose disappearance following insulin injection: insulin sensitivity index. *Diabetes Res Clin Pract* 20: 201-207.
- Gu C, Stein GH, Pan N, Goebbels S, Hornberg H, Nave KA, Herrera P, White P, Kaestner KH, Sussel L, Lee JE. 2010. Pancreatic beta cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity. *Cell Metab* 11: 298-310.
- Guardado-Mendoza R, Davalli AM, Chavez AO, Hubbard GB, Dick EJ, Majluf-Cruz A, Tene-Perez CE, Goldschmidt L, Hart J, Perego C, Comuzzie AG, Tejero ME, Finzi G, Placidi C, La Rosa S, Capella C, Halff G, Gastaldelli A, DeFronzo RA, Folli F. 2009. Pancreatic islet amyloidosis, beta-cell apoptosis, and alpha-cell proliferation are determinants of islet remodeling in type-2 diabetic baboons. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(33):13992-13997.
- Guilloteau P, Zabielski R, Blum JW. 2009b. Gastrointestinal tract and digestion in the young ruminant: ontogenesis, adaptations, consequences and manipulations. *J Physiol Pharmacol* 60 (Suppl 3): 37-46.

- Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC. 2009a. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. *J Physiol Pharmacol* 60 (Suppl 3): 17-35.
- Guilloteau P, Vitari F, Metzinger-Le Meuth V, Le Normand L, Romé V, Savary G, Delaby L, Domeneghini C, Morisset J. 2012. Is there adaptation of the exocrine pancreas in wild animal? The case of the Roe deer. *BMC Vet Res* 8: 70. doi: 10.1186/1746-6148-8-70.
- Gunton JE, Kulkarni RN, Yim S, Okada T, Hawthorne WJ, Tseng YH, Roberson RS, Ricordi C, O'Connell PJ, Gonzalez FJ, Kahn CR. 2005. Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 122(3): 337-349.
- Gustavsson N, Han W. 2009. Calcium-sensing beyond neurotransmitters: functions of synaptotagmins in neuroendocrine and endocrine secretion. *Biosci Rep* 29(4): 245-259.
- Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CV, Teitelman G. 1995. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 121(1): 11-18.
- Hales CN, Barker DJ. 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35(7): 595-601.
- Hales CN, Barker DJ. 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60: 5-20.
- Harding JE, Bloomfield FH. 2004. Prenatal treatment of intrauterine growth restriction: Lessons from the sheep model. *Pediatric Endocrinology Reviews* 2: 182-192.
- Heimberg H, De Vos A, Vandercammen A, Van Schaftingen E, Pipeleers D, Schuit F. 1993. Heterogeneity in glucose sensitivity among pancreatic beta-cells is correlated to differences in glucose phosphorylation rather than glucose transport. *EMBO J* 12(7): 2873-2879.
- Henquin JC, Ibrahim MM, Rahier J. 2017. Insulin, glucagon and somatostatin stores in the pancreas of subjects with type-2 diabetes and their lean and obese non-diabetic controls. *Sci Rep* 7(1): 11015. doi: 10.1038/s41598-017-10296-z.
- Henquin JC. 2009. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52(5): 739-751.
- Herbosa CG, Wood RI, Foster DL. 1995. Prenatal androgens modify the reproductive response to photoperiod in the developing sheep. *Biol Reprod* 52(1): 163-169.
- Himelein MJ, Thatcher SS. 2006. Depression and body image among women with polycystic ovary syndrome. *J Health Psychol* 11(4): 613-625.
- Hoffman DI, Klove K, Lobo RA. 1984. The prevalence and significance of elevated dehydroepiandrosterone sulfate levels in anovulatory women. *Fertil Steril* 42(1): 76-81.
- Hoffman LK, Ehrmann DA. 2008. Cardiometabolic features of polycystic ovary syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4(4): 215-222.

- Hoffman PL, Cutfield WS, Robinson EM, Bergman RN, Menon RK, Sperling MA, Gluckman PD. 1997. Insulin resistance in short children with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 82(2): 402-406.
- Hogg K, Wood C, McNeilly AS, Duncan WC. 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(9): e24877. doi: 10.1371/journal.pone.0024877.
- Hogg K, Young JM, Oliver EM, Souza CJ, McNeilly AS, Duncan WC. 2012. Enhanced thecal androgen production is prenatally programmed in an ovine model of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 153(1): 450-461.
- Hogg, K, Wood C, McNeilly AS, Duncan WC. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0024877.
- Holland AM, Góñez LJ, Naselli G, Macdonald RJ, Harrison LC. 2005. Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of beta-cells in the adult pancreas. *Diabetes* 54(9): 2586-2595.
- Holly JM, Smith CP, Dunger DB, Howell RJ, Chard T, Perry LA, Savage MO, Cianfarani S, Rees LH, Wass JA. 1989. Relationship between the pubertal fall in sex hormone binding globulin and insulin-like growth factor binding protein-I. A synchronized approach to pubertal development? *Clin Endocrinol (Oxf)* 31(3): 277-284.
- Holmäng A, Brzezinska Z, Björntorp P. 1993. Effects of hyperinsulinemia on muscle fiber composition and capitalization in rats. *Diabetes* 42(7): 1073-1081.
- Holmäng A, Jennische E, Björntorp P. 1995. The effects of long-term hyperinsulinaemia on insulin sensitivity in rats. *Acta Physiol Scand* 153(1): 67-73.
- Holmäng A, Larsson BM, Brzezinska Z, Björntorp P. 1992. Effects of short-term testosterone exposure on insulin sensitivity of muscles in female rats. *Am J Physiol* 262(6Pt1): E851-E855.
- Holmäng A, Mimura K, Lönnroth P. 2002. Involuntary leg movements affect interstitial nutrient gradients and blood flow in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 92(3): 982-988.
- Holmäng A, Svedberg J, Jennische E, Björntorp P. 1990. Effects of testosterone on muscle insulin sensitivity and morphology in female rats. *Am J Physiol* 259(4Pt1): E555-E560.
- Hopcroft DW, Mason DR, Scott RS. 1985a. Structure-function relationships in pancreatic islets: support for intraislet modulation of insulin secretion. *Endocrinology* 117(5): 2073-2080.
- Hopcroft DW, Mason DR, Scott RS. 1985b. Insulin secretion from perfused rat pancreatic pseudoislets. *In Vitro Cell Dev Biol* 21(8): 421-427.

- Hosokawa YA, Leahy JL. 1997. Parallel reduction of pancreas insulin content and insulin secretion in 48-h tolbutamide-infused normoglycemic rats. *Diabetes* 46(5): 808-813.
- Hosseini E, Shahhoseini M, Afsharian P, Karimian L, Ashrafi M, Mehraein F, Afatoonian R. 2019. Role of epigenetic modifications in the aberrant CYP19A1 gene expression in polycystic ovary syndrome. *Arch Med Sci* 15(4): 887-895.
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. 1996. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271(5249): 665-668.
- Hsieh MH, Breyer BN, Eisenberg ML, Baskin LS. 2008. Associations among hypospadias, cryptorchidism, anogenital distance, and endocrine disruption. *Curr Urol Rep* 9: 137-142.
- Hua XG, Hu R, Hu CY, Li FL, Jiang W, Zhang XJ. 2018. Associations between hypospadias, cryptorchidism and anogenital distance: Systematic review and meta-analysis. *Andrologia* 50(10): e13152. doi: 10.1111/and.13152.
- Huang XF, Arvan P. 1994. Formation of the insulin-containing secretory granule core occurs within immature beta-granules. *J Biol Chem* 269(33): 20838-20844.
- Hubbard SR. 2013. The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(3): a008946. doi: 10.1101/cshperspect.a008946.
- Hunter CS, Stein RW. 2017. Evidence for loss in identity, de-differentiation, and trans-differentiation of islet  $\beta$ -cells in type 2 diabetes. *Front Genet* 8: 35. doi: 10.3389/fgene.2017.00035.
- Jaenisch R, Bird A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33(Suppl): 245-254.
- Janssen OE, Hahn S, Tan S, Benson S, Elsenbruch S. 2008. Mood and sexual function in polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med* 26(1): 45-52.
- Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* 293(5532): 1074-1080.
- Jiang AT, Rowe N, Sener A, Luke P. 2014. Simultaneous pancreas-kidney transplantation: the role in the treatment of type 1 diabetes and end-stage renal disease. *Can Urol Assoc J* 8(3-4): 135-138.
- Jiang Z, Shi D, Tu Y, Tian J, Zhang W, Xing B, Wang J, Liu S, Lou J, Gustafsson JÅ, Hua X, Ma X. 2018. Human proislet peptide promotes pancreatic progenitor cells to ameliorate diabetes through FOXO1/Menin-mediated epigenetic regulation. *Diabetes* 67(7): 1345-1355.
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. 1994. Insulin-promoter factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371: 606-609.
- Jost A. 1970. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 259(828): 119-130.

- Kabel AM. 2016. Polycystic ovarian syndrome: insights into pathogenesis, diagnosis, prognosis, pharmacological and non-pharmacological treatment. *Pharm Bioprocess* 4(1): 7-12.
- Kahn I, Dekou V, Hanson M, Poston L, Taylor P. 2004. Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring. *Circulation* 110(9): 1097-1102.
- Kahn, C. R. 1985. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med* 36: 429-451.
- Kajantie E, Strang-Karlsson S, Hovi P, Wehkalampi K, Lahti J, Kaseva N, Järvenpää AL, Räikkönen K, Eriksson JG, Andersson S. 2015. Insulin sensitivity and secretory response in adults born preterm: the Helsinki Study of Very Low Birth Weight Adults. *J Clin Endocrinol Metab* 100(1): 244-250.
- Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. 2006. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 281(36): 26602-26614.
- Kaneto H, Matsuoka TA, Kawashima S, Yamamoto K, Kato K, Miyatsuka T, Katakami N, Matsuhisa M. 2009. Role of MafA in pancreatic beta-cells. *Adv Drug Deliv Rev* 61(7-8): 489-496.
- Katsuta H, Aguayo-Mazzucato C, Katsuta R, Akashi T, Hollister-Lock J, Sharma AJ, Bonner-Weir S, Weir GC. 2012. Subpopulations of GFP-marked mouse pancreatic  $\beta$ -cells differ in size, granularity, and insulin secretion. *Endocrinology* 153(11): 5180-5187.
- Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV. 2002. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 32: 128-134.
- Kelly C, McClenaghan NH, Flatt PR. 2011. Role of islet structure and cellular interactions in the control of insulin secretion. *Islets* 3(2): 41-47.
- Kemp DM, Thomas MK, Habener JF. 2003. Developmental aspects of the endocrine pancreas. *Rev Endocr Metab Dis* 4: 5-17.
- Kilimnik G, Zhao B, Jo J, Periwal V, Witkowski P, Misawa R, Hara M. 2011. Altered islet composition and disproportionate loss of large islets in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 6(11): e27445. doi: 10.1371/journal.pone.0027445.
- Kitamura T, Kitamura Y. 2007. Role of FoxO proteins in pancreatic beta cells. *Endocr J* 54(4): 507-15.
- Kitamura YI, Kitamura T, Kruse JP, Raum JC, Stein R, Gu W, Accili D. 2005. FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab* 2(3): 153-163.

- Kobayashi H, Mitsui T, Nomura S, Ohno Y, Kadomatsu K, Muramatsu T, Nagasaka T, Mizutani S. Expression of glucose transporter 4 in the human pancreatic islet of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 314(4): 1121-1125.
- Koleganova N, Piecha G, Ritz E. 2009. Prenatal causes of kidney disease. *Blood Purif* 27(1): 48-52.
- Komatsu M, M Takei, H Ishii, Y Sato. 2014. Glucose-stimulated insulin secretion: a newer perspective. *J Diabetes Invest* 4(6): 511-516.
- Kostromina E, Wang X, Han W. 2013. Altered islet morphology but normal islet secretory function in vitro in a mouse model with microvascular alterations in the pancreas. *PLoS One* 8(7): e71277. doi: 10.1371/journal.pone.0071277.
- Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazzer S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. 2008. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26: 443-452.
- Kumar P, Magon N. 2012. Hormones in pregnancy. *Niger Med J* 53(4): 179-183.
- Kuo Z-Y. 1967. The dynamics of behavior development: an epigenetic view. New York: Random House.
- Kupfer SR, Wilson EM, French FS. 1994. Androgen and glucocorticoid receptors interact with insulin degrading enzyme. *J Biol Chem* 269(32): 20622-20628.
- Kwon G, Xu G, Marshall CA, McDaniel ML. 1999. Tumor necrosis factor alpha-induced pancreatic beta-cell insulin resistance is mediated by nitric oxide and prevented by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and aminoguanidine. A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation and inos expression. *J Biol Chem* 274(26): 18702-18708.
- Lachelin GC, Judd HL, Swanson SC, Hauck ME, Parker DC, Yen SS. 1982. Long term effects of nightly dexamethasone administration in patients with polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 55(4): 768-773.
- Langley-Evans SC. 2015. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *J Hum Nutr Diet* 28(Suppl1): 1-14.
- Lau C, Rogers JM. 2004. Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. *Birth Defects Res C Embryo Today* 72: 300-312.
- Lau J, Hebrok M. 2010. Hedgehog signaling in pancreas epithelium regulates embryonic organ formation and adult beta-cell function. *Diabetes* 59: 1211-1221.
- Laukkanen O, Lindström J, Eriksson J, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Tuomilehto J, Uusitupa M, Laakso M; Finnish Diabetes Prevention Study. 2005. Polymorphisms in the SLC2A2 (GLUT2) gene are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* 54(7): 2256-2260.

- Legro RS, Driscoll D, Strauss JF 3rd, Fox J, Dunaif A. 1998. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(25): 14956-14960.
- Legro RS, Roller RL, Dodson WC, Stetter CM, Kunselman AR, Dunaif A. 2010. Associations of birthweight and gestational age with reproductive and metabolic phenotypes in women with polycystic ovarian syndrome and their first-degree relatives. *J Clin Endocrinol Metab* 95(2): 789-799.
- Legro RS. 1995. The genetics of polycystic ovary syndrome. *Am J Med* 98(1A): 9S-16S.
- Leibiger B, Wahlander K, Berggren PO, Leibiger IB. 2000. Glucose-stimulated insulin biosynthesis depends on insulin-stimulated insulin gene transcription. *J Biol Chem* 275(39): 30153-30156.
- Leibiger IB, B Leibiger, PO Berggren. 2002. Minireview: insulin feedback action on pancreatic  $\beta$ -cell function. *FEBS Letters* 532: 1-6.
- Leibiger IB, Leibiger B, Moede T, Berggren PO. 1998. Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM kinase pathways. *Mol Cell* 1(6): 933-938.
- Leng J, Hay J, Liu G, Zhang J, Wang J, Liu H, Yang X, Liu J. 2016. Small-for-gestational age and its association with maternal blood glucose, body mass index and stature: a perinatal cohort study among Chinese women. *BMJ Open* 6(9): e010984. doi: 10.1136/bmjopen-2015-010984.
- Levy J, Atkinson AB, Bell PM, McCance DR, Hadden DR. 1998. Beta-cell deterioration determines the onset and rate of progression of secondary dietary failure in type 2 diabetes mellitus: the 10-year follow-up of the Belfast Diet Study. *Diabet Med* 15(4): 290-296.
- Lewontin RC. 2000. *The triple helix: gene, organism and environment*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. 2005. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev* 6(1): 13-21.
- Lillycrop KA, Burdge GC. 2011. The effect of nutrition during early life on the epigenetic regulation of transcription and implications for human diseases. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 4(5): 248-260.
- Limesand SW, Rozance PJ, Zerbe GO, Hutton JC, Hay WWJr. 2006. Attenuated insulin release and storage in fetal sheep pancreatic islets with intrauterine growth restriction. *Endocrinology* 147(3): 1488-1497.
- Liu S, Navarro G, Mauvais-Jarvis F. 2010. Androgen excess produces systemic oxidative stress and predisposes to beta-cell failure in female mice. *PLoS One* 5(6): e11302. doi: 10.1371/journal.pone.0011302.
- Loechner KJ, Akrouh A, Kurata HT, Dionisi-Vici C, Maiorana A, Pizzoferro M, Rufini V, de Ville de Goyet J, Colombo C, Barbetti F, Koster JC, Nichols CG. 2011. Congenital

- hyperinsulinism and glucose hypersensitivity in homozygous and heterozygous carriers of Kir6.2 (KCNJ11) mutation V290M mutation: K(ATP) channel inactivation mechanism and clinical management. *Diabetes* 60(1): 209-217.
- Lönn M, K Mehlig, C Bengtsson, L Lissner. 2010. Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women. *FASEB J* 24: 326-331.
- Louey S, Thornburg KL. 2005. The prenatal environment and later cardiovascular disease. *Early Hum Dev* 81(9): 745-751.
- Luense LJ, Veiga-Lopez A, Padmanabhan V, Christenson LK. 2011. Developmental programming: gestational testosterone treatment alters fetal ovarian gene expression. *Endocrinology* 152(12): 4974-4983.
- Lupi R, Del Prato S. 2008. Beta-cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences. *Diabetes Metab* 34(Suppl2): S56-S64.
- MacDonald PE, Rorsman P. 2007. The ins and outs of secretion from pancreatic beta-cells: control of single-vesicle exo- and endocytosis. *Physiology (Bethesda)* 22: 113-121.
- Magoffin D.A., Agarwal S.K., Jakimiuk A.J. 1996 Suppression of Aromatase Activity in Polycystic Ovary Syndrome. In: Chang R.J. (Ed.) *Polycystic Ovary Syndrome*. Serono Symposia USA. Springer, New York, NY. pp. 208-222.
- Maliqueo M, Echiburú B, Crisosto N. 2013. Sex Steroids Modulate Uterine-Placental Vasculature: Implications for Obstetrics and Neonatal Outcomes. *Front Physiol* 7: 152. doi: 10.3389/fphys.2016.00152.
- Maliqueo M, Galgani JE, Pérez-Bravo F, Echiburú B, de Guevara AL, Crisosto N, Sir-Petermann T. 2012. Relationship of serum adipocyte-derived proteins with insulin sensitivity and reproductive features in pre-pubertal and pubertal daughters of polycystic ovary syndrome women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 161(1): 56-61.
- Manikkam M, Crespí EJ, Doop DD, Herkimer C, Lee JS, Yu S, Brown MB, Foster DL, Padmanabhan V. 2004. Fetal programming: prenatal testosterone excess leads to fetal growth retardation and postnatal catch-up growth in sheep. *Endocrinology* 145(2): 790-798.
- Mannerås-Holm L, Leonhardt H, Kullberg J, Jennische E, Odén A, Holm G, Hellström M, Lönn L, Olivecrona G, Stener-Victorin E, Lönn M. 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.
- Marmorstein R, Trievel RC. 2009. Histone modifying enzymes: Structures, mechanism, and specificities. *Biochim Biophys Acta* 1789(1): 58-68.
- Marshak S, Leibowitz G, Bertuzzi F, Socci C, Kaiser N, Gross DJ, Cerasi E, Melloul D. 1999. Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes* 48(6): 1230-1236.



- Martinez SC, Cras-Méneur C, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA. 2006. Glucose regulates Foxo1 through insulin receptor signaling in the pancreatic islet beta-cell. *Diabetes* 55(6): 1581-1591.
- Matsuda M, DeFronzo RA. 1999. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 22: 1462-1470.
- McDermott NJ, Gandelman R, Reinisch JM. 1978. Contiguity to male fetuses influences ano-genital distance and time of vaginal opening in mice. *Physiol Behav* 20(5): 661-663.
- Meier JJ. 2009. Linking the genetics of type 2 diabetes with low birth weight: a role for prenatal islet maldevelopment? *Diabetes* 58(6): 1255-1256.
- Merezak S, Hardikar AA, Yajnik CS, Remacle C, Reusens B. 2001. Intrauterine low protein diet increases fetal beta-cell sensitivity to NO and IL-1 beta: the protective role of taurine. *J Endocrinol* 171(2): 299-308.
- Messinis IE. 2005. Ovulation induction: a mini review. *Hum Reprod* 20(10): 2688-2697.
- Miller KK, Biller BM, Schaub A, Pulaski-Liebert K, Bradwin G, Rifai N, Klibanski A. 2007. Effects of testosterone therapy on cardiovascular risk markers in androgen-deficient women with hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 92(7): 2474-2479.
- Monroe AK, Dobs AS. 2013. The effect of androgens on lipids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 20(2): 132-139.
- Morimoto S, Cerbón MA, Alvarez-Alvarez A, Romero-Navarro G, Díaz-Sánchez V. 2001a. Insulin gene expression pattern in rat pancreas during the estrous cycle. *Life Sci* 68(26): 2979-2985.
- Morimoto S, Fernandez-Mejia C, Romero-Navarro G, Morales-Peza N, Díaz-Sánchez V. 2001b. Testosterone effect on insulin content, messenger ribonucleic acid levels, promoter activity, and secretion in the rat. *Endocrinology* 142(4): 1442-1447.
- Morimoto S, Jiménez-Trejo F, Cerbón M. 2011. Sex steroids effects in normal endocrine pancreatic function and diabetes. *Curr Top Med Chem* 11(13): 1728-1735.
- Morimoto S, Morales A, Zambrano E, Fernandez-Mejia C. 2010. Sex steroids effects on the endocrine pancreas. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122(4): 107-113.
- Muller D, Jones PM, Persaud SJ. 2006. Autocrine anti-apoptotic and proliferative effects of insulin in pancreatic beta-cells. *FEBS Lett* 580(30): 6977-6980.
- Musingarimi P. 2009. Obesity in the UK: a review and comparative analysis of policies within the devolved administrations. *Health Policy* 91(1): 10-16.
- Nada SE, Thompson RC, Padmanabhan V. 2010. Developmental programming: differential effects of prenatal testosterone excess on insulin target tissues. *Endocrinology* 151: 5165-5173.

- Navaratnarajah R, Pillay OC, Hardiman P. 2008. Polycystic ovary syndrome and endometrial cancer. *Semin Reprod Med* 26(1): 62-71.
- Ndisang JF, Lane N, Jadhav A. 2009. Upregulation of the heme oxygenase system ameliorates postprandial and fasting hyperglycemia in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(5): E1029-E1041.
- Neri C, Edlow AG. 2016. Effects of maternal obesity on fetal programming: molecular approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(2): a026591. doi: 10.1101/cshperspect.a026591.
- Nestler JE. 1997. Insulin regulation of human ovarian androgens. *Hum Reprod* 12 (Suppl 1): 53-62.
- Newgard CB, McGarry JD. 1995. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 64: 689-719.
- Newsholme P, Krause M. 2012. Nutritional regulation of insulin secretion: implications for diabetes. *Clinical Biochemist Reviews* 33: 35-47.
- Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ. 2010. Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467(7318): 963-966.
- Nicol LE, O'Brien TD, Dumesic DA, Grogan T, Tarantal AF, Abbott DH. 2014. Abnormal infant islet morphology precedes insulin resistance in PCOS-like monkeys. *PLoS One* 9(9): e106527. doi: 10.1371/journal.pone.0106527.
- Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF- $\alpha$ . *Arch Physiol Biochem* 114(3): 183-194.
- Nishikawa T, Kukidome D, Sonoda K, Fujisawa K, Matsuhisa T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E. 2007. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract* 77(Suppl 1): S161-S164.
- Nishimura W, Kondo T, Salameh T, El Khattabi I, Dodge R, Bonner-Weir S, Sharma A. 2006. A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic beta-cells. *Dev Biol* 293: 526-539.
- Nistala R, Hayden MR, Demarco VG, Henriksen EJ, Lackland DT, Sowers JR. 2011. Prenatal programming and epigenetics in the genesis of the cardiorenal syndrome. *Cardiorenal Med* 1(4): 243-254.
- Nugent BM, Tobet SA, Lara HE, Lucion AB, Wilson ME, Recabarren SE, Paredes AH. 2012. Hormonal programming across the lifespan. *Horm Metab Res* 44(8): 577-586.
- Nuyt AM, Szyf M. 2007. Developmental programming through epigenetic changes. *Circ Res* 100: 452-455.
- Nyblom HK, Bugliani M, Fung E, Boggi U, Zubarev R, Marchetti P, Bergsten P. 2009. Apoptotic, regenerative, and immune-related signaling in human islets from type 2 diabetes individuals. *J Proteome Res* 8(12): 5650-5656.

- Oben JA, Patel T, Muralidarane A, Samuelsson AM, Matthews P, Pombo J, Morgan M, McKee C, Soeda J, Novelli M, Poston L, Taylor P. 2010. Maternal obesity programmes offspring development of non-alcoholic fatty pancreas disease. *Biochem Biophys Res Commun* 394(1): 24-28.
- Oliver-Krasinski JM, Stoffers DA. 2008. On the origin of the beta cell. *Genes Dev* 22(15): 1998-2021.
- O'Meara NM, Blackman JD, Ehrmann DA, Barnes RB, Jaspan JB, Rosenfield RL, Polonsky KS. 1993. Defects in beta-cell function in functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 76(5): 1241-1247.
- Ou Y, Ren Z, Wang J, Yang X. 2016. Phycocyanin ameliorates alloxan-induced diabetes mellitus in mice: Involved in insulin signaling pathway and GK expression. *Chem Biol Interact* 247: 49-54.
- Padmanabhan V, Cardoso R, Puttabyatappa M. 2016. Developmental programming, a pathway to disease. *Endocrinology* 157(4): 1328 –1340.
- Padmanabhan V, Smith P, Veiga-Lopez A. 2012. Developmental programming: Impact of prenatal testosterone treatment and postnatal obesity on ovarian follicular dynamics. *J Dev Orig Health Dis* 3(4): 276-286.
- Padmanabhan V, Veiga-Lopez A, Abbott DH, Recabarren SE, 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(2): 595-605.
- Padmanabhan V, Veiga-Lopez A, Herkimer C, Abi Salloum B, Moeller J, Beckett E, Sreedharan R. 2015. Developmental programming: prenatal and postnatal androgen antagonist and insulin sensitizer interventions prevent advancement of puberty and improve LH surge dynamics in prenatal testosterone-treated sheep. *Endocrinology* 156(7): 2678-2692.
- Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. 2011. Developmental origin of reproductive and metabolic dysfunctions: androgenic versus estrogenic reprogramming. *Semin Reprod Med* 29(3): 173-186.
- Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. 2012. Sheep models of polycystic ovary syndrome phenotype. *Mol Cell Endocrinol* 373(1-2): 8-20.
- Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. 2013a. Animal models of the polycystic ovary syndrome phenotype. *Steroids* 78(8): 734-740.
- Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. 2013b. Sheep models of polycystic ovary syndrome phenotype. *Mol Cell Endocrinol* 373(1-2): 8-20.
- Padmanabhan V. 2009. Polycystic ovary syndrome-"A riddle wrapped in a mystery inside an enigma". *J Clin Endocrinol Metab* 94(6): 1883-1885.
- Palmer BF, Clegg DJ. 2016. The sexual dimorphism of obesity. *Mol Cell Endocrinol* 402: 113-119.

- Pan FC, Chen Y, Bayha E, Pieler T. 2007. Retinoic acid-mediated patterning of the prepancreatic endoderm in *Xenopus* operates via direct and indirect mechanisms. *Mech Dev* 124: 518-531.
- Pasquali R, Antenucci D, Casimirri F, Venturoli S, Paradisi R, Fabbri R, Melchionda N, Barbara L. 1987. Insulin as a factor of increased androgen production in women with obesity and polycystic ovaries. *J Endocrinol Invest* 10(6): 575-579.
- Peppard HR, Marfori J, Iuorno MJ, Nestler JE. 2001. Prevalence of polycystic ovary syndrome among premenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 24(6): 1050-1052.
- Perciaccante A. 2009. Insulin resistance as link between polycystic ovary syndrome and cardiovascular autonomic dysfunction. *Int J Cardiol* 135(3): e78-e79. doi: 10.1016/j.ijcard.2008.04.040.
- Pérez MJ, Cabrera W, Varela G, Garaulet M. 2010. Distribución regional de la grasa corporal. Uso de técnicas de imagen como herramienta de diagnóstico nutricional. *Nutr Hosp Madrid* 25(2): 207-223.
- Persaud SJ, Muller D, Jones PM. 2008. Insulin signalling in islets. *Biochem Soc Trans* 36(Pt3): 290-293.
- Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet JJ, Hill DJ. 1999. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* 140(10): 4861-4873.
- Pictet R, Rutter WJ, Geiger SR. 1972a. Development of the embryonic endocrine pancreas. In *Handbook of Physiology Endocrinology. Endocrine Pancreas. Section 7, Vol 1*, pp 25-66. Ed. S R Geiger. Washington, DC: American Physiological Society.
- Pictet RL, Clark WR, Williams RH, Rutter WJ. 1972b An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol* 29: 436-467.
- Polderman KH, Gooren LJ, Asscheman H, Bakker A, Heine RJ. 1994. Induction of insulin resistance by androgens and estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 79(1): 265-271.
- Prentki M, Nolan CJ. 2006. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116(7): 1802-1812.
- Puttabyatappa M, Ciarelli JN, Chatoff AG, Singer K, Padmanabhan V. 2020. Developmental programming: Adipose depot-specific changes and thermogenic adipocyte distribution in the female sheep. *Mol Cell Endocrinol* 503: 110691. doi: 10.1016/j.mce.2019.110691.
- Quitral, M. 2010. Determinación del índice de sensibilidad a la insulina durante la fase folicular y luteal en hembras ovinas adultas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona. Memoria de título Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción. Chillán.

- Radziuk J. 2014. Homeostatic model assessment and insulin sensitivity/resistance. *Diabetes* 63(6): 1850-1854.
- Rae M, Grace C, Hogg K, Wilson LM, McHaffie SL, Ramaswamy S, MacCallum J, Connolly F, McNeilly AS, Duncan C. 2013. The pancreas is altered by in utero androgen exposure: implications for clinical conditions such as polycystic ovary syndrome (PCOS). *PLoS One* 8(2): e56263. doi: 10.1371/journal.pone.0056263.
- Rakyan VK, Preis J, Morgan HD, Whitelaw E. 2001. The marks, mechanisms and memory of epigenetic states in mammals. *Biochem J* 356(Pt 1): 1-10.
- Ramaswamy S, Grace C, Mattei AA, Siemienowicz K, Brownlee W, MacCallum J, McNeilly AS, Duncan WC, Rae MT. 2016. Developmental programming of polycystic ovary syndrome (PCOS): prenatal androgens establish pancreatic islet  $\alpha/\beta$  cell ratio and subsequent insulin secretion. *Sci Rep* 6: 27408. doi: 10.1038/srep27408.
- Rattanatray L, MacLaughlin SM, Kleemann DO, Walker SK, Muhlhausler BS, McMillen IC. 2010. Impact of maternal periconceptional overnutrition on fat mass and expression of adipogenic and lipogenic genes in visceral and subcutaneous fat depots in the postnatal lamb. *Endocrinology* 151(11): 5195-5205.
- Recabarren M, Carrasco A, Sandoval D, Diaz F, Sir-Petermann T, Recabarren SE. 2019. Long-term testosterone treatment during pregnancy does not alter insulin or glucose profile in a sheep model of polycystic ovary syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 32(2): 173-178.
- Recabarren SE, Padmanabhan V, Codner E, Lobos A, Durán C, Vidal M, Foster DL, Sir-Petermann T. 2005. Postnatal developmental consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated prenatally with testosterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E801-E806.
- Recabarren SE, Rojas-García PP, Recabarren MP, Norambuena K, Sir-Petermann T. 2009. Impacto de la exposición prenatal a testosterona sobre parámetros biométricos y endocrinos en ovinos recién nacidos. *Arch Med Vet* 41: 43-51.
- Recabarren SE, Sir-Petermann T, Lobos A, Codner E, Rojas-García PP, Reyes V. 2005b. Response to the gonadotropin releasing hormone agonist leuprolide in immature female sheep androgenized in utero. *Biol Res* 38: 235-244.
- 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(1): 101-108.
- Reddy S, Bibby NJ, Elliott RB. 1988. An immunofluorescent study of insulin-, glucagon-, pancreatic polypeptide- and somatostatin-containing cells in the early ovine fetal pancreas. *Q J Exp Physiol* 73(2): 225-232.
- Regazzi R, Dalle S, Abderrahmani A. 2014. Compensatory mechanisms of pancreatic beta cells: insights into the therapeutic perspectives for diabetes. *J Diabetes Res* 2014: 217387. doi: 10.1155/2014/217387.

- Remacle C, Dumortier O, Bol V, Goosse K, Romanus P, Theys N, Bouckenooghe T, Reusens B. 2007. Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab* 9 (Suppl.2): 196-209.
- Reusens B, Sparre T, Kalbe L, Bouckenooghe T, Theys N, Kruhøffer M, Orntoft TF, Nerup J, Remacle C. 2008. The intrauterine metabolic environment modulates the gene expression pattern in fetal rat islets: prevention by maternal taurine supplementation. *Diabetologia* 51(5): 836-845.
- Reynolds CM, Segovia SA, Vickers MH. 2017. Experimental Models of Maternal Obesity and Neuroendocrine Programming of Metabolic Disorders in Offspring. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 8: 245. doi: 10.3389/fendo.2017.00245.
- Rhodes CJ, White MF, Leahy JL, Kahn SE. 2013. Direct autocrine action of insulin on  $\beta$ -cells: does it make physiological sense? *Diabetes* 62(7): 2157-2163.
- Riedel C, von Kries R, Fenske N, Strauch K, Ness AR, Beyerlein A. 2013. Interactions of genetic and environmental risk factors with respect to body fat mass in children: results from the ALSPAC study. *Obesity (Silver Spring)* 21(6): 1238-1242.
- Risal S, Pei Y, Lu H, Manti M, Fornes R, Pui HP, Zhao Z, Massart J, Ohlsson C, Lindgren E, Crisosto N, Maliqueo M, Echiburú B, Ladrón de Guevara A, Sir-Petermann T, Larsson H, Rosenqvist MA, Cesta CE, Benrick A, Deng Q, Stener-Victorin E. 2019. Prenatal androgen exposure and transgenerational susceptibility to polycystic ovary syndrome. *Nat Med* 25(12): 1894-1904.
- Rittmaster RS, Thompson DL. 1990. Effect of leuprolide and dexamethasone on hair growth and hormone levels in hirsute women: the relative importance of the ovary and the adrenal in the pathogenesis of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 70(4): 1096-1102.
- Roat R, Rao V, Doliba NM, Matschinsky FM, Tobias JW, Garcia E, Ahima RS, Imai Y. 2014. Alterations of pancreatic islet structure, metabolism and gene expression in diet-induced obese C57BL/6J mice. *PLoS One* 9(2): e86815. doi: 10.1371/journal.pone.0086815.
- Robertson R, H Zhou, T Zhang, JS Harmon. 2007. Chronic oxidative stress as a mechanism for glucose toxicity of the beta cell in type 2 diabetes. *Cell Biochem Biophys* 48: 139-146.
- Robinson JE, Forsdike RA, Taylor JA. 1999. In utero exposure of female lambs to testosterone reduces the sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network to inhibition by progesterone. *Endocrinology* 140(12): 5797-5805.
- Roland AV, Nunemaker CS, Keller SR, Moenter SM. 2010. Prenatal androgen exposure programs metabolic dysfunction in female mice. *J Endocrinol* 207(2): 213-223.
- Roncoroni L, Violi V, Montanari M, Muri M. 1983. Effect of somatostatin on exocrine pancreas evaluated on a total external pancreatic fistula of neoplastic origin. *Am J Gastroenterol* 78: 425-428.

- Rorsman P, Renström E. 2003. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46(8): 1029-1045.
- Rosas C, Oróstica L, Poblete C, Carvajal R, Gabler F, Romero C, Lavandero S, Vega M. 2016. Hyperandrogenism decreases GRP78 protein level and glucose uptake in human endometrial stromal cells. *Reprod Sci* 23(6): 761-770.
- Roscioni SS, Migliorini A, Gegg M, Lickert H. 2016 Impact of islet architecture on  $\beta$ -cell heterogeneity, plasticity and function. *Nat Rev Endocrinol* 12(12): 695-709.
- Rosenfeld L. 2002. Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem* 48(12): 2270–2288.
- Rosmalen JG, Pigmans MJ, Kersseboom R, Drexhage HA, Leenen PJ, Homo-Delarche F. 2001. Sex steroids influence pancreatic islet hypertrophy and subsequent autoimmune infiltration in nonobese diabetic (NOD) and NODscid mice. *Lab Invest* 81(2): 231-239.
- Royal-Thomas T, McGee D, Sinha D, Osmond C, Forrester T. 2015. Association of maternal blood pressure in pregnancy with blood pressure of their offspring through adolescence. *J Perinat Med* 43(6): 695-701.
- Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF. 2002. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* 51(11): 3176-3188.
- Salomon D, Meda P. 1986. Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual B cells. *Exp Cell Res* 162(2): 507-520.
- Saltiel AR y CR Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
- Samols E, Stagner JI, Ewart RB, Marks V. 1988. The order of islet microvascular cellular perfusion is B----A----D in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 82(1): 350-353.
- Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, Piersma AH, Ozanne SE, Twinn DF, Remacle C, Rowleson A, Poston L, Taylor PD. 2008. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 51(2): 383-392.
- Sander M, Neubuser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. 1997. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 11: 1662-1673.
- Sathishkumar K, Elkins R, Chinnathambi V, Gao H, Hankins GD, Yallampalli C. 2001. Prenatal testosterone-induced fetal growth restriction is associated with down-regulation of rat placental amino acid transport. *Reprod Biol Endocrinol* 9: 110. doi: 10.1186/1477-7827-9-110.
- Schaffer AE1, Taylor BL, Benthuisen JR, Liu J, Thorel F, Yuan W, Jiao Y, Kaestner KH, Herrera PL, Magnuson MA, May CL, Sander M. 2013. Nkx6.1 controls a gene regulatory network required for establishing and maintaining pancreatic Beta cell identity. *PLoS Genet* 9(1): e1003274. doi: 10.1371/journal.pgen.1003274.

- Schulingkamp RJ, TC Pagano, D Hung, RB Raffa. 2000. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 855-872.
- Schwitzgebel VM, Mamin A, Brun T, Ritz-Laser B, Zaiko M, Maret A, Jornayvaz FR, Theintz GE, Michielin O, Melloul D, Philippe J. 2003. Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4398-4406.
- Schwitzgebel VM, Scheel DW, Conners JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS. 2000. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127: 3533-3542.
- Sener A, Reusens B, Remacle C, Hoet JJ, Malaisse WJ. 1996. Nutrient metabolism in pancreatic islets from protein malnourished rats. *Biochem Mol Med* 59(1): 62-67.
- Shestopalov IA, Chen JK. 2011. Spatiotemporal control of embryonic gene expression using caged morpholinos. *Methods Cell Biol* 104: 151-172.
- Sir-Petermann T, Codner E, Pérez V, Echiburú B, Maliqueo M, Ladrón de Guevara A, Preisler J, Crisosto N, Sánchez F, Cassorla F, Bhasin S. 2009. Metabolic and reproductive features before and during puberty in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 94(6): 1923-1930.
- Sir-Petermann T, Ladrón de Guevara A, Codner E, Preisler J, Crisosto N, Echiburú B, Maliqueo M, Sánchez F, Perez-Bravo F, Cassorla F. 2012. Relationship between anti-Müllerian hormone (AMH) and insulin levels during different tanner stages in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci* 19(4): 383-390.
- Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Pérez-Bravo F, Recabarren SE. 2002. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum Reprod* 17: 2573-2579.
- Sir-Petermann T, Maliqueo M, Codner E, Echiburú B, Crisosto N, Pérez V, Pérez-Bravo F, Cassorla F. 2007. Early metabolic derangements in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 92(12): 4637-4642.
- Smith CJ, Ryckman KK. 2015. Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr Obes* 8: 295-302.
- Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ. 1990. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* 57(2): 107-118.
- Sohi G, A Revesz, DB Hardy. 2011. Parmanent implications of intrauterine growth restriction on cholesterol homeostasis. *Semin Reprod Med* 29(3): 266-276.
- Sørensen K, Aksglaede L, Munch-Andersen T, Aachmann-Andersen NJ, Petersen JH, Hilsted L, Helge JW, Juul A. Sex hormone-binding globulin levels predict insulin sensitivity, disposition index, and cardiovascular risk during puberty. *Diabetes Care* 32(5): 909-914.



- Sørensen K, Andersson AM, Skakkebaek NE, Juul A. 2007. Serum sex hormone-binding globulin levels in healthy children and girls with precocious puberty before and during gonadotropin-releasing hormone agonist treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 92(8): 3189-3196.
- Srinivasan BT, Jarvis J, Khunti K, Davies MJ. 2008. Recent advances in the management of type 2 diabetes mellitus: a review. *Postgrad Med J* 84(996): 524-531.
- Steckler T, Wang J, Bartol FF, Roy SK, Padmanabhan V. 2005. Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. *Endocrinology* 146(7): 3185-3193.
- Stefan Y, Meda P, Neufeld M, Orci L. 1987. Stimulation of insulin secretion reveals heterogeneity of pancreatic B cells in vivo. *J Clin Invest* 80(1): 175-183.
- Stefani G, Slack FJ. 2008. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3): 219-230.
- Steiner DF. 1998. The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol* 2(1): 31-39.
- Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M. 2010. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* 2(3): 135-145.
- Symonds ME, Stephenson T, Gardner DS, Budge H. 2007. Longterm effects of nutritional programming of the embryo and fetus: mechanisms and critical windows. *Reprod Fertil Dev* 19: 53-63.
- Talchai C, S Xuan, HV Lin, L Sussel, D Accili. 2012. Pancreatic  $\beta$  cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic  $\beta$  cell failure. *Cell* 150: 1223-1234.
- Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. 2012. Pancreatic  $\beta$  cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic  $\beta$  cell failure. *Cell* 150(6): 1223-1234.
- Talchai SC, Accili D. 2015. Legacy Effect of Foxo1 in Pancreatic Endocrine Progenitors on Adult  $\beta$ -Cell Mass and Function. *Diabetes* 64(8): 2868-2879.
- Tang EI, Mruk DD, Cheng CY. 2013. MAP/microtubule affinity-regulating kinases, microtubule dynamics, and spermatogenesis. *J Endocrinol* 217(2): R13-R23.
- Tang WY, R Newbold, K Mardilovich, W Jefferson, RY Cheng, M Medvedovic, SM Ho. 2008. Persistent hypomethylation in the promoter of nucleosomal binding protein 1 (Nsbp1) correlates with overexpression of Nsbp1 in mouse uteri neonatally exposed to diethylstilbestrol or genistein. *Endocrinology* 149: 5922-5931.
- Taniguchi CM, B Emanuelli, CR Kahn. 2006. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85-96.
- Taylor BL, Liu FF, Sander M. 2013. Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. *Cell Rep* 4(6): 1262-1275.
- Teede H, Deeks A, Moran L. 2010. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med* 8: 41. doi: 10.1186/1741-7015-8-41.

- Theys N, Ahn MT, Bouckenooghe T, Reusens B, Remacle C. 2011. Maternal malnutrition programs pancreatic islet mitochondrial dysfunction in the adult offspring. *J Nutr Biochem* 22(10): 985-994.
- Theys N, Bouckenooghe T, Ahn MT, Remacle C, Reusens B. 2009. Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1516-R1525.
- Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. 2018. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol* 217(7): 2273-2289.
- Tritschler S, Theis FJ, Lickert H, Böttcher A. 2017. Systematic single-cell analysis provides new insights into heterogeneity and plasticity of the pancreas. *Mol Metab* 6(9): 974-990.
- Tummon I, Gavrilova-Jordan L, Allemand MC, Session D. 2005. Polycystic ovaries and ovarian hyperstimulation syndrome: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 84(7): 611-616.
- Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Morioka K, Maruyama N, Kitagawa N, Tanaka T, Hori Y, Nakatani K, Yano Y, Adachi Y. 2003. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab* 88(10): 4673-4676.
- Utiger RD. 1996. Insulin and the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 335(9): 657-658.
- van Assche FA, De Prins F, Aerts L, Verjans M. 1977. The endocrine pancreas in small-for-dates infants. *J Obstet Gynaecol* 84(10): 751-753.
- van der Zijl NJ, Goossens GH, Moors CC, van Raalte DH, Muskiet MH, Pouwels PJ, Blaak EE, Diamant M. 2011. Ectopic fat storage in the pancreas, liver, and abdominal fat depots: impact on  $\beta$ -cell function in individuals with impaired glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 96(2): 459-467.
- van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thörne A, Hoffstedt J, Lönnqvist F, Arner P. 1998. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* 47(6): 913-917.
- Vaxillaire M, Veslot J, Dina C, Proença C, Cauchi S, Charpentier G, Tichet J, Fumeron F, Marre M, Meyre D, Balkau B, Froguel P; DESIR Study Group. 2008. Impact of common type 2 diabetes risk polymorphisms in the DESIR prospective study. *Diabetes* 57(1): 244-254.
- 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. *Biol Reprod* 84(1): 87-96
- Vodo S, Bechi N, Petroni A, Muscoli C, Aloisi AM. 2013. Testosterone-induced effects on lipids and inflammation. *Mediators Inflamm* 2013: 183041. doi: 10.1155/2013/183041.

- Walker MD. 2008. Role of MicroRNA in pancreatic beta-cells: where more is less. *Diabetes* 57(10): 2567-2568.
- Wallen K & Baum MJ (2002) Masculinization and defeminization in altricial and precocial mammals: comparative aspects of steroid hormone action. In Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, and Rubin RT (Eds) *Hormones, Brain and Behavior*, Vol 4. Academic Press, San Diego, pp 385–423.
- Wang GS, Kauri LM, Patrick C, Bareggi M, Rosenberg L, Scott FW. 2010. Enhanced islet expansion by beta-cell proliferation in young diabetes-prone rats fed a protective diet. *J Cell Physiol* 224(2): 501-508.
- Wang H, X Wang, Y Zhu, F Chen, Y Sun, X Han. 2015. Increased androgen levels in rats impair glucose-stimulated insulin secretion through disruption of pancreatic beta cell mitochondrial function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 154: 254-266.
- Wang S, Jensen JN, Seymour PA, Hsu W, Dor Y, Sander M, Magnuson MA, Serup P, Gu G. 2009. Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(24): 9715-9720.
- Waterland RA. 2006. Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *J Pediatr* 149: S137-S142.
- Waterland RA. 2014. Epigenetic mechanisms affecting regulation of energy balance: many questions, few answers. *Annu Rev Nutr* 34: 337-355.
- Weir GC, Bonner-Weir S. 2013. Islet  $\beta$  cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann N Y Acad Sci* 1281: 92-105.
- Weiss MA. 2009. Proinsulin and the genetics of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 284(29): 19159-19163.
- Wells LJ & van Wagenen G. 1954. Androgen-induced female pseudohermaphroditism in the monkey (*Macaca mulatta*): anatomy of the reproductive organs. *Contrib Embryol* 235: 95-106.
- West-Eberhard MJ. 1998. Evolution in the light of developmental and cell biology, and vice versa. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8417– 8419.
- West-Eberhard MJ. 2003. *Developmental plasticity and evolution*. New York: Oxford University Press.
- Westermarck P. 1972. Quantitative studies on amyloid in the islets of Langerhans. *Ups J Med Sci* 77(2): 91-94.
- Westwell-Roper CY, JA Ehse, CB Verchere. 2014. Resident macrophages mediate islet amyloid polypeptide-induced islet IL-1 $\beta$  production and  $\beta$ -cell dysfunction. *Diabetes* 63(5): 1698-1711.
- White MF. Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. *Can J Physiol Pharmacol* 84(7): 725-737.

- Whitelaw NC, Whitelaw E. 2006. How lifetimes shape epigenotype within and across generations. *Hum Mol Genet* 15 (Spec No2): R131-R137.
- Wickramatilake CM, Mohideen MR, Pathirana C. 2013. Association of serum testosterone with lipid abnormalities in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Indian J Endocrinol Metab* 17(6): 1061-1065.
- Wikstrom JD, Katzman SM, Mohamed H, Twig G, Graf SA, Heart E, Molina AJ, Corkey BE, de Vargas LM, Danial NN, Collins S, Shirihai OS. 2007. beta-Cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels. *Diabetes* 56(10): 2569-2578.
- Wilkstrom JD, Sm Katzman, H Mohamed, G Twig, SA Graf, E. Heart, AJ Molina, BE Corkey, LM de Vargas, NN Danial, S Collins, OS Shirihai. 2007. Beta-Cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels. *Diabetes* 56(10): 2569-2578.
- Xita N, Tsatsoulis A. 2010. Fetal origins of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1205: 148-155.
- Xu GG, Gao ZY, Borge PD Jr, Jegier PA, Young RA, Wolf BA. 2000. Insulin regulation of beta-cell function involves a feedback loop on SERCA gene expression, Ca(2+) homeostasis, and insulin expression and secretion. *Biochemistry* 39(48): 14912-14919.
- Xu N, Kwon S, Abbott DH, Geller DH, Dumesic DA, Azziz R, Guo X, Goodarzi MO. 2011. Epigenetic mechanism underlying the development of polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotypes in prenatally androgenized rhesus monkeys. *PLoS One* 6(11): e27286. doi: 10.1371/journal.pone.0027286.
- Xu W, Morford J, Mauvais-Jarvis F. 2019. Emerging role of testosterone in pancreatic  $\beta$ -cell function and insulin secretion. *J Endocrinol* pii: JOE-18-0573.R1. doi: 10.1530/JOE-18-0573.
- Yang F, Ruan Y, Yang Y, Wang K, Liang S, Han Y, Teng X, Yang J. 2015. Follicular hyperandrogenism downregulates aromatase in luteinized granulosa cells in polycystic ovary syndrome women. *Reproduction* 150(4): 289-29
- Zang H, Carlström K, Arner P, Hirschberg AL. 2006. Effects of treatment with testosterone alone or in combination with estrogen on insulin sensitivity in postmenopausal women. *Fertil Steril* 86(1): 136-144.
- Zarrouki B, Benterki I, Fontés G, Peyot ML, Seda O, Prentki M, Poitout V. Epidermal growth factor receptor signaling promotes pancreatic  $\beta$ -cell proliferation in response to nutrient excess in rats through mTOR and FOXM1. *Diabetes* 63(3): 982-993.
- Zeng C, Mulas F, Sui Y, Guan T, Miller N, Tan Y, Liu F, Jin W, Carrano AC, Huisin MO, Shirihai OS, Yeo GW, Sander M. 2017. Pseudotemporal ordering of single cells reveals metabolic control of postnatal  $\beta$  cell proliferation. *Cell Metab* 25(5): 1160-1175.e11. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.014.
- Zhang J, Zhang F, Didelot X, Bruce KD, Cagampang FR, Vatish M, Hanson M, Lehnert H, Ceriello A, Byrne CD. 2009. Maternal high fat diet during pregnancy and lactation

alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. *BMC Genomics* 10: 478. doi: 10.1186/1471-2164-10-478.

Zhang T, Kim DH, Xiao X, Lee S, Gong Z, Muzumdar R, Calabuig-Navarro V, Yamauchi J, Harashima H, Wang R, Bottino R, Alvarez-Perez JC, Garcia-Ocaña A, Gittes G, Dong HH. 2016. FoxO1 plays an important role in regulating  $\beta$ -cell compensation for insulin resistance in male mice. *Endocrinology* 157(3): 1055-1070.

Zhang Y, Johansson E, Miller ML, Jänicke RU, Ferguson DJ, Plas D, Meller J, Anderson MW. 2011. Identification of a conserved anti-apoptotic protein that modulates the mitochondrial apoptosis pathway. *PLoS One* 6(9): e25284. doi: 10.1371/journal.pone.0025284.

Ziemke F, Mantzoros CS. 2010. Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr.* 91(1): 258S-261S. doi: 10.3945/ajcn.2009.28449C.



## 8. ANEXOS

Anexo 1: Carta de aprobación de los manejos animales y procedimientos experimentales del Comité de Bioética.



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Comité de Bioética

CBE-49-2013  
Chillán, 31 de Julio de 2013

Ref.: Aprobación bioética  
Proyecto Sr. S. Recabarren

Sr. Sergio Recabarren M.  
Investigador  
PRESENTE

De nuestra consideración,

En relación a su solicitud de **revisión** por parte de este comité del proyecto titulado: *"FETAL REPROGRAMMING. EFFECT OF PRENATAL TESTOSTERONE EXPOSURE ON INSULIN SENSITIVITY TISSUES AND BETA CELL FUNCTION: A NOVEL APPROACH"*, que Ud. presenta como Investigador Responsable al Concurso Regular de FONDECYT 2014, puedo informar lo siguiente:

Teniendo en cuenta que en los procedimientos experimentales indicados en el Protocolo del proyecto sometido a nuestra consideración y habiendo constatado que las observaciones planteadas por los miembros del comité, incluyendo aquellas referidas a los principios de las tres "R" de Russel y Burch, han sido favorablemente resueltas en documento anexo que se acompaña, este comité estima que el proyecto **no** contiene elementos que transgredan las normas bioéticas vigentes en nuestra Institución.

Saluda atentamente a Ud.,

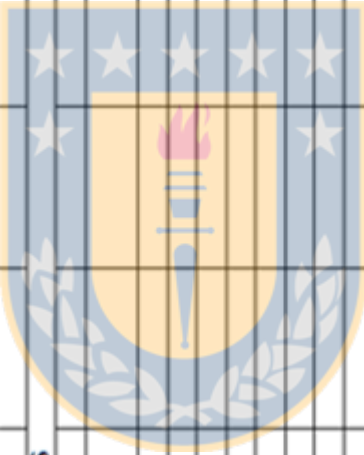
Dr. Rubén Pérez Fernández  
Presidente  
Comité Bioética



CC - Archivo  
RPF/rpf.-

Anexo N°2: Hoja de registro del protocolo de supervisión ovino.

HOJA DE PUNTUACION. PROTOCOLO SUPERVISION OVINO									
Responsable Supervisión/N° Procedimiento:									
N° Identificación Animal									
<b>PESO CORPORAL*</b>									
Normal o disminución <5%									0
Disminución 5-10 / 10-15 / 15-20%									2/4/10
Disminución >20%									19
<b>RESPUESTA AL MANEJO</b>									
Normal									0
Ligeramente disminuido/aumentado									2
Muy disminuido/aumentado, agresivo									4
<b>COMPORTAMIENTO, APARIENCIA Y SIGNOS CLINICOS</b>									
Rechazo alimento <5% / >5 %									0/3
Conducta de alimentación (buena/regular/mala)									0/1/3
Agresividad con compañeros									1
Separación del rebaño									1
Esterotipias									3
Postración									2
Depresión									3
Salivación									3
Lesión nasal/ocular									5
Ruido de dientes (dolor)									5
Convulsiones, diarrea, coma (**)									8 (19)
Distrés respiratorio severo									19
Deshidratación severa***									19
<b>TOTAL</b>									



**Puntuación:**

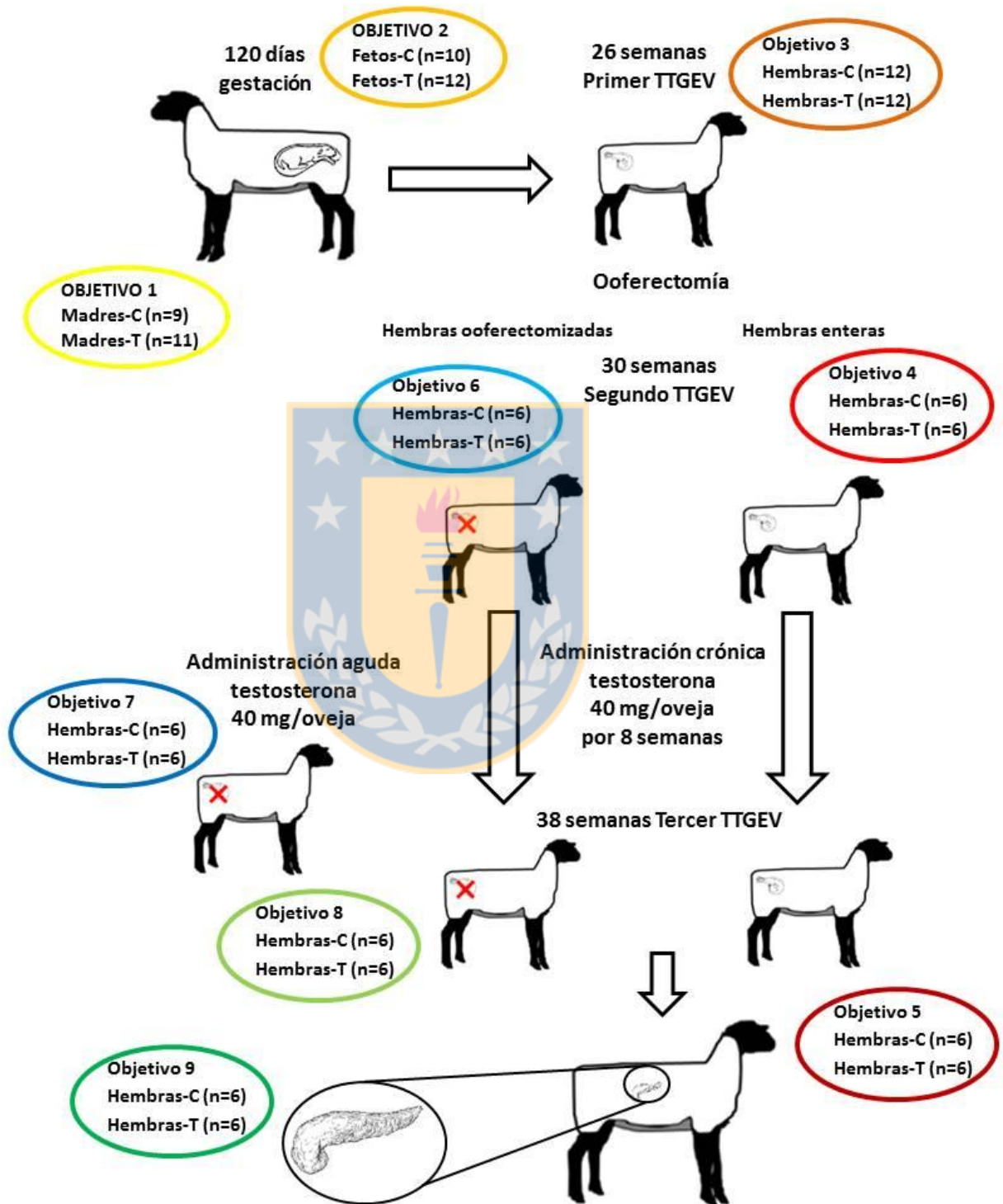
- 0 a 4 Normal
- 5 a 9 Aumente la frecuencia de revisiones del animal
- 10 a 18 Consulte al veterinario
- > 18 Sacrificio obligatorio

\* Considerando incremento de 100 grs/día

\*\* Si persiste alguno de estos síntomas: Sacrificio

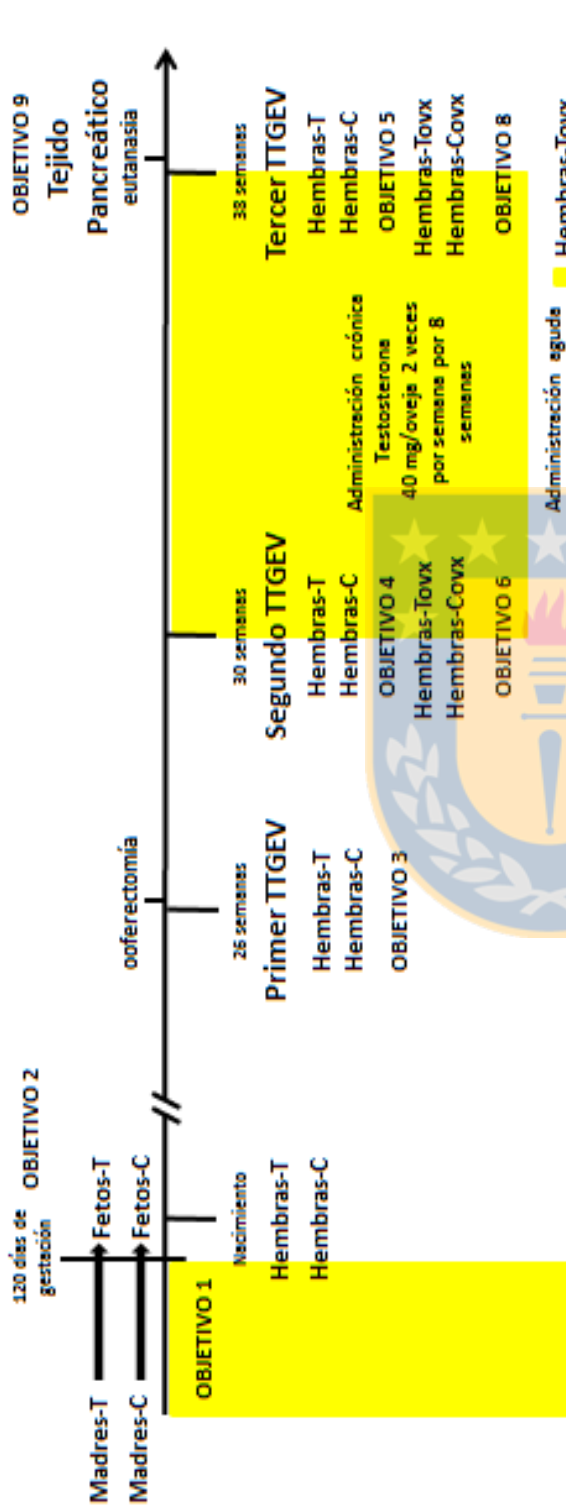
\*\*\* Consumo ideal 350 ml/Kg/día

Anexo N°3: Esquema de los experimentos durante las diferentes etapas de desarrollo somático.





Anexo N°4: Esquema de los experimentos durante las diferentes etapas de desarrollo somático y objetivos específicos asociados.



**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar los efectos de la administración de testosterona sobre algunas variables endocrinas y metabólicas durante la gestación en ovejas.
2. Correlacionar los efectos de la administración de testosterona en ovejas gestantes con algunas variables metabólico-endocrinas y registros zométricos en fetos hembra ovinos de 120 días de gestación.
3. Evaluar el efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la sensibilidad a insulina en ovejas peripuberales de 26 semanas de edad.
4. Cuantificar el efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en ovejas postpuberales tempranas de 30 semanas de edad.
5. Evaluar el efecto de la administración crónica de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en ovejas adultas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona de 38 semanas de edad.
6. Evaluar la sensibilidad a la insulina en hembras ovinas ooforectomizadas postpuberales expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 30 semanas de edad.
7. Evaluar el efecto de la administración aguda de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en hembras ooforectomizadas adultas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona a las 38 semanas de edad.
8. Determinar el efecto de la administración crónica de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina en hembras ooforectomizadas adultas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona de 38 semanas de edad.
9. Evaluar el efecto de la administración crónica de testosterona sobre la estructura del páncreas endocrino y la expresión del IARNm de las proteínas involucradas en la secreción y producción de insulina estimulada por glucosa y la mantención del fenotipo celular endocrino maduro.

## 9. LISTA DE PUBLICACIONES

Del trabajo realizado en esta tesis y en el laboratorio se desprenden una serie de publicaciones y presentaciones las cuales se listan a continuación.

### Revistas científicas revisadas por pares

Rojas-García P.P., M.P. Recabarren, S. Palma, M. Maliqueo, A. Carrasco, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2014. Morfometría ovárica y expresión del ARN mensajero de hormona antimülleriana (AMH), receptor de FSH (FSHR) y factor nuclear kappa b (NFκB) en folículos en crecimiento de borregas expuestas prenatalmente a testosterona. Arch Med Vet 46(1): 13-21. Artículo publicado.

Recabarren S.E., M.P. Recabarren, D. Sandoval, A. Carrasco, V. Padmanabhan, R. Rey, H.G. Richter, C.C. Perez-Marin, T. Sir-Petermann, P.P. Rojas-García. 2017. Puberty arises with testicular alterations and defective AMH expression in rams prenatally exposed to testosterone. Domest Anim Endocrinol. 61: 100-107. Artículo publicado.

Recabarren M.P., A. Carrasco, D. Sandoval, F. Díaz, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2019. Long-term testosterone treatment during pregnancy does not alter insulin or glucose profile in a sheep model of polycystic ovary syndrome. J Matern Fetal Neonatal Med 32(2): 173-178. Artículo publicado.

Cox J.F., F. Navarrete, A. Carrasco, J. Dorado, F. Saravia. 2019. Effect of bST administration on plasma concentrations of IGF-I and follicular dynamics and ovulation during the interovulatory cycle of sheep and goats. Theriogenology 123: 159-166. Artículo publicado.

Carrasco A., M.P. Recabarren, P.P. Rojas-García, M. Gutiérrez, K. Morales, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2020. Prenatal testosterone exposure disrupts insulin secretion and promotes insulin resistance. Scientific Reports 10: 404; doi: 10.1038/s41598-019-57197-x. Artículo publicado.

Carrasco A., M.P. Recabarren, P.P. Rojas-García, N. Silva, J. Fuenzalida, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2020. Insulin sensitivity in male sheep born to mothers

exposed to testosterone during pregnancy. Journal of Developmental Origins of Health and Disease. Artículo aceptado.

**Carrasco A.**, P.P. Rojas-García, M.P. Recabarren, S. Palma-Vera, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2020. Prenatal testosterone excess impairs insulin sensitivity independently of the estrous cycle phase in adult female sheep. BMJ Open Diabetes and Research Care. Artículo enviado.

**Carrasco A.**, M.P. Recabarren, P.P. Rojas-García, F. Díaz, J. Fuenzalida, J. Montalbán, M. Gutiérrez, D. Sandoval, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. Fetal programming: chronic testosterone administration decreases insulin sensitivity (IS) in adult female sheep borned from testosterone treated mothers. Artículo en preparación para Endocrinology.

**Carrasco A.**, D. Sandoval, M.P. Recabarren, J. Montalban, S. Bellalta, M. Castillo-Blasco, P.P. Rojas-García, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. Impact of fetal exposure to testosterone on fetal insulin sensitivity tissues in sheep: a morphological and molecular approach. Artículo en preparación.

**Carrasco A.**, M. Castillo-Blasco, D. Sandoval, M.P. Recabarren, S. Bellalta, P.P. Rojas-García, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. Dual behaviour of visceral and subcutaneous adipose tissue during pubertal life in response to pre and postnatal testosterone exposure. Artículo en preparación.

**Carrasco A.**, P.P. Rojas-García, M.P. Recabarren, D. Sandoval, D. Rojas, F. Díaz, M. Maliqueo, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. Chronicle of programmed diabetes. Manuscrito en redacción para Diabetes.

### **Presentaciones en congresos**

**Carrasco A.**, M.P. Recabarren, P.P. Rojas-García, D. Sandoval, C. Acevedo, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2014. Reprogramación fetal: efecto de la administración aguda de estradiol o DHT sobre la dinámica insulina-glucosa en ovejas ovariectomizadas expuestas prenatalmente a testosterona. XXV Reunión Anual de la SChRD, Valdivia, Chile (Póster).

Silva P., P. Puentes, P.P. Rojas-García, D. Sandoval, **A. Carrasco**, M.P. Recabarren, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2014. Reprogramación fetal: alteración de parámetros testiculares en machos prepúberes nacidos de madres expuestas a testosterona durante la preñez. XXV Reunión Anual de la SChRD, Valdivia, Chile (Póster).

Sandoval D., **A. Carrasco**, M.P. Recabarren, P.P. Rojas-García, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2014. Efecto de la exposición prenatal a testosterona en las características morfológicas del músculo esquelético en ovinos. XXV Reunión Anual de la SChRD, Valdivia, Chile (Póster).

Recabarren M.P., **A. Carrasco**, K. Morales, P.P. Rojas-García, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2014. MON-0090: Acute testosterone administration aggravates the insulin resistance of ovariectomized sheep prenatally exposed to excess testosterone. Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo, Chicago, EE.UU. (Póster).

Rojas-García P.P., D. Sandoval, M.E. Chaucón, **A. Carrasco**, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2014. MON-0095: Abnormal programming of germ cells and Sertoli cells in prepubertal male sheep by excess prenatal exposure to testosterone. Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo, Chicago, EE.UU. (Póster).

Rojas-García P.P., D. Sandoval, M.P. Recabarren, **A. Carrasco**, T. Sir-Petermann and S.E. Recabarren. 2014. MON-0102: 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. Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo, Chicago, EE.UU. (Póster).

**Carrasco A.**, M.P. Recabarren, D. Sandoval, D. Assman, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2015. Respuesta del páncreas y de la insulina fetal a una exposición materna con testosterona. XXVI Reunión Anual SChRD, Antofagasta, Chile (Póster).

Sandoval D., M.P. Recabarren, **A. Carrasco**, A. Montalbán, D. Rojas, D. Assman, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2015. Efectos de la exposición prenatal a testosterona en el tejido muscular esquelético e islotes pancreáticos en ovinos fetales. XXVI Reunión Anual SChRD, Antofagasta, Chile (Póster).

Recabarren M.P., D. Sandoval, **A. Carrasco**, D. Rojas, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2015. Hypothalamic response of GLUT4 and insulin receptors to hyperandrogenic environment in ovine fetus. The IWNE, Mendoza, Argentina (Póster).

Recabarren S.E., M.P. Recabarren, P.P. Rojas-García, D. Sandoval, **A. Carrasco**, T. Sir-Petermann. 2015. Testosterone programming of insulin sensitivity (IS) in male sheep. 13th Annual Meeting of the Androgen Excess Society and PCOS. Siracusa, Italia (Póster).

**Carrasco A.**, M.P. Recabarren, D. Sandoval, A. Montalbán, M. Gutiérrez, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2016. Sensibilidad a la insulina en ovejas ooforectomizadas expuestas prenatalmente a testosterona. XXVII Reunión Anual de la SChRD, Antofagasta, Chile (Póster).

Sandoval D., **A. Carrasco**, M.P. Rojo, M.J. González, M.P. Recabarren, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2016. El microambiente hiperandrogénico intrauterino impacta el desarrollo y funcionalidad de las células beta pancreáticas fetales en hembras ovinas. XXVII Reunión Anual de la SChRD, Antofagasta, Chile (Póster).

Sandoval D., M.P. Recabarren, **A. Carrasco**, D. Rojas, A. Montalbán, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2016. Impact of fetal exposure to testosterone on fetal insulin sensitivity tissues – a morphological and molecular approach. 18th European Congress of Endocrinology (ECE) of European Society of Endocrinology, Munich, Alemania (Póster).

**Carrasco A.**, F. Díaz, M. Gutiérrez, J. Fuenzalida, A. Montalbán, D. Sandoval, M.P. Recabarren, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2017. Evaluación del efecto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona (EPT) sobre parámetros morfométricos y la concentración de hormonas y glucosa plasmática en fetos ovinos hembra de 120 días de gestación. XXVIII Reunión Anual de la SChRD, Concón, Chile (Póster).

**Carrasco A.**, M.P. Recabarren, A. Montalbán, M. Gutiérrez, D. Sandoval, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren 2017. Evaluación del efecto de la administración crónica de testosterona sobre la sensibilidad a la insulina (SI) en ovejas ooforectomizadas adultas expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona. XXVIII Reunión Anual de la SChRD, Concón, Chile (Póster).

**Carrasco A.**, M.P. Recabarren, A. Montalbán, M. Gutiérrez, D. Sandoval, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2017. Testosterone administration decreases insulin sensitivity (IS) in adult female sheep born to pregnant testosterone treated mothers. XXVIII Reunión Anual de la SChRD, Concón, Chile (Póster).

Gutiérrez M., D. Sandoval, D. Rojas, **A. Carrasco**, F. Díaz, M.P. Recabarren, S.E. Recabarren 2017. Efectos de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre el desarrollo estructural y maduración del tejido pulmonar en fetos ovinos hembras a los 120 días de gestación. XXVIII Reunión Anual de la SChRD, Concón, Chile (Póster).

**Carrasco A.**, M.P. Recabarren, A. Montalbán, M. Gutiérrez, D. Sandoval, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2017. Testosterone treatment decreases the insulin sensitivity in adult female sheep born to pregnant testosterone treated mothers. Endocrine Abstracts (2017): 49 Guided Poster GP135. 19th European Congress of Endocrinology (ECE 2017) of European Society of Endocrinology, Lisboa, Portugal (Póster).

Sandoval D., M.P. Recabarren, **A. Carrasco**, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2017. Differential pattern of insulin signaling in adipose tissue and skeletal muscle in adult female sheep exposed prenatally to testosterone. Endocrine Abstracts (2017): 49 e-Poster EP636. 19th European Congress of Endocrinology (ECE 2017) of European Society of Endocrinology, Lisboa, Portugal (Póster).

Sandoval D., M.P. Recabarren, J. Montalbán, S. Bellalta, **A. Carrasco**, M. Castillo-Blasco, P.P. Rojas-García, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2018. Impact of fetal exposure to testosterone on insulin sensitivity tissues in pubertal female sheep: a morphological and molecular approach. Endocrine Abstracts 56 GP167. European Society of Endocrinology, Barcelona, España Póster).

Cox J.F., F. Navarrete, **A. Carrasco**, J. Dorado, F. Saravia. 2018. Effect of a single bST administration on follicular dynamics and ovulation during an interovulatory cycle in sheep”. Sección Tecnologías Reproducción Asistida. International Ruminant Reproduction Symposium, Foz do Iguaçu, Brasil (Póster).

Bellalta S., D. Sandoval, D. Rojas, M. Castillo-Blanco, **A. Carrasco**, S.E. Recabarren. 2018. Efectos de la exposición prenatal a testosterona sobre parámetros estructurales del

tejido adiposo en hembras ovinas. Invest Cienc Anim 2: 580-581. Sección Biotecnología. XX Congreso Chileno de Medicina Veterinaria, Chillán, Chile (Póster).

Saravia F., F. Navarrete, **A. Carrasco**, J. Dorado, J.F. Cox. 2018. Efecto de la administración única de bST en la competencia folicular para crecimiento y ovulación en ovejas. Invest. Cienc. Anim. 2: 544-545. Sección: Tecnologías Reproductivas. XX Congreso Chileno de Medicina Veterinaria, Chillán, Chile (Póster).

Dorado J., P. Vera, F. Navarrete, **A. Carrasco**, F. Saravia, J.F. Cox. 2018. Efecto de la hCG en el desarrollo folicular terminal y ovulación en ovejas sincronizadas con PGF2 $\alpha$ -GnRH durante la estación reproductiva. Invest. Cienc. Anim. 2: 546-547. Sección: Tecnologías Reproductivas. XX Congreso Chileno de Medicina Veterinaria, Chillán, Chile (Póster).

Fuenzalida J., **A. Carrasco**, F. Díaz, M. Gutiérrez, J. Montalbán, M.P. Recabarren, P.P. Rojas-García, D. Rojas, D. Sandoval and S.E. Recabarren. 2018. Programación Fetal: Efecto de la administración de testosterona en ovejas gestantes sobre parámetros morfológicos, metabólicos y endocrinos en fetos ovinos. Invest. Cienc. Anim. 2: 542-543. Sección: Tecnologías Reproductivas. XX Congreso Chileno de Medicina Veterinaria, Chillán, Chile (Presentación oral).

Bellalta S., D. Sandoval, D. Rojas, M. Castillo-Blasco, **A. Carrasco**, S.E. Recabarren. 2019. Efectos de la exposición prenatal a testosterona sobre parámetros estructurales y moleculares del tejido adiposo en modelo ovino para SOP. XXXIV Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas (SCHCF), Santa Cruz, Chile (Póster).

**Carrasco A.**, P.P. Rojas-García, D. Rojas, J. Fuenzalida, J. Sanhueza-Vega, A. Caurapán-Montero, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2019. La exposición prenatal a un exceso de testosterona altera la morfología de los tejidos insulino-sensibles en machos ovinos postpuberales enteros y castrados. Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH), Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHRD), Sociedad de Gametología y Andrología Chilena (SAGACH) Congreso Latinoamericano Conjunto de Reproducción, Santiago, Chile (Póster).

Rojas-García P.P., M. Maliqueo, B. Echiburú, T. Sir-Peterman, **A. Carrasco**, S. Sharbati, R. Einspanier, S.E. Recabarren. 2019. Reduced germ cell number due to a disruption in the expression of genes related to lactate production and transport in Sertoli cells in males prenatally exposed to an excess of testosterone. Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH), Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR), Sociedad de Gametología y Andrología Chilena (SAGACH) Congreso Latino Americano Conjunto de Reproducción, Santiago, Chile (Póster).

**Carrasco A.**, R. González-Moya, M. San Martín-Romero, J. Suárez-Cabrera, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2019. Evaluación del impacto de la exposición prenatal a un exceso de testosterona sobre el desarrollo orgánico y somático en fetos ovinos. XLIV Congreso de la Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA), Chillán, Chile (Presentación oral).

**Carrasco A.**, D. Rojas, F. Díaz, J. Fuenzalida, F. de la Fuente, V. Aravena, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2019. La hiperandrogenemia crónica disminuye la sensibilidad a la insulina y provoca alteraciones en el páncreas endocrino en ovejas postpuberales expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona. IV Jornada Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), Santiago, Chile (Presentación oral).

**Carrasco A.**, D. Rojas, F. Díaz, J. Fuenzalida, F. de la Fuente, V. Aravena, T. Sir-Petermann, S.E. Recabarren. 2020. La hiperandrogenemia crónica disminuye la sensibilidad a la insulina y provoca alteraciones en el páncreas endocrino en ovejas postpuberales expuestas prenatalmente a un exceso de testosterona. XXX Congreso de la Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes (SOCHED), Viña del Mar, Chile (Presentación oral).