

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**LA ADMINISTRACIÓN DE GLUCOCORTICOIDES Y SU EFECTO SOBRE LA  
EXPRESIÓN DE LA ENZIMA 3 BETA HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA  
DURANTE EL DESARROLLO TESTICULAR EN OVINOS**

“por”

Ana Cecilia PINO WALLER  
Guillermo Iván SANGUINETTI DI PAULO

TESIS DE GRADO presentada como uno  
de los requisitos para obtener el título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias.  
Orientación: Medicina Veterinaria.

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2014**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

TRABAJO FINAL aprobado por:

Presidente de Mesa: \_\_\_\_\_

Segundo Miembro (Tutor): \_\_\_\_\_  
Graciela Pedrana

Tercer Miembro: \_\_\_\_\_

Cotutor: \_\_\_\_\_  
Helen Viotti

Fecha: \_\_\_\_\_

Autores: \_\_\_\_\_  
Ana Cecilia Pino

\_\_\_\_\_  
Guillermo Sanguinetti

## **AGRADECIMIENTOS**

- 1.** A las Dras. Graciela Pedrana y Helen Viotti (Facultad de Veterinaria) quienes nos guiaron en esta investigación, y sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible.
- 2.** Al Dr. Alejandro Bielli (Cátedra de Histología Embriología y Desarrollo) por permitirnos trabajar en el laboratorio y en el Laboratorio de Análisis de imágenes, Área de Histología, Facultad de Veterinaria.
- 3.** A la Técnica en Laboratorio Mónica Viqueira por su apoyo en el trabajo histológico.
- 4.** A la Dra. Raquel Correa Luna por su colaboración en la parte estadística.
- 5.** Al personal de Biblioteca de la Facultad de Veterinaria y Facultad de Medicina.
- 6.** A mis familiares y amigos que de una u otra manera colaboraron con la realización de esta tesis.
- 7.** Y, a todas las personas, que directa o indirectamente nos ayudaron.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1. Programación fetal y glucocorticoides.....	3
1.2. Efectos de los glucocorticoides a nivel del testículo.....	3
1.3. Esteroidogénesis testicular.....	3
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1. Programación fetal.....	5
2.1.1 Factores de programación fetal.....	5
2.2. Glucocorticoides.....	6
2.2.1. Mecanismos de acción de los glucocorticoides.....	6
2.2.2. Efectos de los glucocorticoides en el organismo.....	6
2.2.3. Efectos de los glucocorticoides sobre la reproducción.....	6
2.2.4. Usos terapéuticos de los glucocorticoides exógenos <i>in utero</i> ....	7
2.2.5. Efectos de glucocorticoides en testículos de animales adultos....	7
2.3. Testículos en ovinos.....	8
2.3.1. Desarrollo testicular fetal en ovinos.....	8
2.3.2. Desarrollo testicular posnatal en ovinos .....	9
2.3.3. Anatomía testicular en animales adultos.....	10
2.3.4. Histología testicular.....	12
2.3.4.1. Túbulos seminíferos.....	12
2.3.4.1.1. Células somáticas de Sertoli .....	12
2.3.4.1.2. Células de la línea germinal.....	12
2.3.4.2. Intersticio testicular .....	12
2.3.4.2.1. Células de Leydig .....	13
2.4. Andrógenos testiculares.....	14
2.4.1. Rol de los andrógenos en la reproducción masculina.....	14
2.4.2. Esteroidogénesis testicular.....	15
2.4.3. Enzimas reguladoras de la esteroidogénesis:.....	15

2.4.3.1. Enzima proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR).....	16
2.4.3.2. Enzima P450 scc (side chain cleavage).....	16
2.4.3.3. Enzima 3 $\beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD).....	16
2.4.3.4. Enzima P450 17 $\alpha$ hidroxilasa/C17-20 liasa (P450c17).....	16
2.4.3.5. Enzima 17 $\beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD)....	16
2.4.3.6. Enzima 5 $\alpha$ reductasa.....	17
2.5. Acción de los glucocorticoides sobre la expresión de la 3 $\beta$ -HSD...	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
5.1. Diseño experimental.....	20
5.2. Animales.....	20
5.3. Procesamiento histológico.....	20
5.4. Técnica de inmunohistoquímica.....	20
5.5. Captura de imágenes de preparaciones de inmunohistoquímica...	21
5.6. Análisis digital de imágenes.....	21
5.7. Análisis estadístico.....	21
<b>6 RESULTADOS</b> .....	22
6.1 Resultados de inmunolocalización de la enzima 3 $\beta$ -HSD en el testículo de ovinos.....	22
6.2 Resultados de inmunoexpresión de la enzima 3 $\beta$ -HSD en células de Leydig.....	24
6.3 Resultados de inmunoexpresión de la enzima 3 $\beta$ -HSD en cordones sexuales/ túbulos seminíferos.....	25
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	26
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	27
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	28

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Figura 1. Ontogenia testicular:.....	10
Figura 2: Sección longitudinal de un testículo y epidídimo. ....	11
Figura 3: Esquema representativo de la histología del testículo de un animal adulto.....	14
Figura 4. Biosíntesis de testosterona en células de Leydig.....	17
Figura 5. Imágenes de inmunohistoquímica para la localización de la enzima 3 $\beta$ -HSD en el parénquima testicular de ovinos.....	23
Figura 6. Efectos de los glucocorticoides <i>in utero</i> sobre la expresión de la enzima 3 $\beta$ -HSD en células de Leydig durante el desarrollo testicular pre y posnatal en ovinos.....	24
Figura 7. Efectos de los glucocorticoides <i>in utero</i> sobre la expresión de la enzima 3 $\beta$ -HSD en cordones sexuales durante el desarrollo testicular pre y posnatal en ovinos.....	25

## RESUMEN

La enzima hidroxisteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD) es esencial para la esteroidogénesis. El estrés prenatal y los glucocorticoides se han descrito como factores de programación fetal. Por lo tanto testeamos si la administración prenatal de betametasona afecta la expresión de  $3\beta$ -HSD en células de Leydig durante el desarrollo. Ovejas Merino preñadas (n=42) fueron asignadas al azar para recibir 3 inyecciones de betametasona (grupo tratado) o solución salina (grupo de control) a los 104, 111 y 118 días de gestación (DG). Los fetos machos fueron sacrificados a los 121 y 132 DG, y los corderos a los 45 y 90 días posnatales (PD). Sus testículos se fijaron y procesaron para inmunohistoquímica. Se cuantificó el porcentaje de área e intensidad de inmunomarcación en células de Leydig. El porcentaje de área de  $3\beta$ -HSD tiende a aumentar en tratados frente a controles (P = 0,09) a los 121 DG. Se detectó una disminución en tratados del % de área a los 45 y 90 PD (P= 0,07, P=0,04) en comparación con tratados 121 DG. Entre controles no hubo diferencias entre fechas. La intensidad de  $3\beta$ -HSD en células de Leydig fue mayor en los tratados frente a los controles a los 90 PD (P = 0,03). Entre tratados se detectó una mayor intensidad de  $3\beta$ -HSD a los 90 PD en comparación con tratados a los 121DG (P=0,04), 132 DG (P=0,04) y 45 PD (P=0,03). Concluimos que los glucocorticoides regulan la expresión de la  $3\beta$ -HSD en células de Leydig a lo largo del desarrollo. Se sugiere que los glucocorticoides podrían comprometer el potencial secretor de testosterona en la célula de Leydig y por ende afectar el futuro reproductivo en la vida adulta.

## SUMMARY

The hydroxysteroid dehydrogenase enzyme ( $3\beta$ -HSD) is essential for steroidogenesis. Prenatal stress and glucocorticoids have been reported as factors for fetal programming. Therefore we tested whether administration of betamethasone prenatal affects  $3\beta$ -HSD expression in Leydig cells during development. Pregnant Merino sheep (n = 42) were randomized to receive 3 injections of betamethasone (treated group) or saline (control group) at 104, 111 and 118 days of gestation (DG). Fetuses males were slaughtered at 121 and 132 DG, and lambs at 45 and 90 days postnatal (PD). Their testis were fixed and processed for immunohistochemistry. The percentage area and intensity of immunostaining in Leydig cells was quantified. The percentage area of  $3\beta$ -HSD in Leydig tends to increase in treated versus control (P = 0.09) at 121 DG. A decrease in percentage area in treated at 45 and 90 PD (P = 0.07, P = 0.04) was detected compared to treated at 121 DG. Within controls, there were no differences between dates. The intensity of  $3\beta$ -HSD in Leydig cells was higher in treated versus controls at 90 PD (P = 0.03). Among treated a greater intensity of  $3\beta$ -HSD was detected at PD 90 compared with the 121DG (P = 0.04), 132 GD (P = 0.04) and 45 PD (P = 0.03). We conclude that glucocorticoids regulate expression of  $3\beta$ -HSD in Leydig cells during development. It is suggested that glucocorticoids may compromise the secretory potential of testosterone in the Leydig cell and therefore affect future reproductive in adulthood.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Programación fetal y glucocorticoides

Durante el desarrollo fetal existen factores que predisponen a alteraciones de la estructura y función de órganos y tejidos en adultos (Langley-Evans, 2006; Drake y col., 2007; Abbott y col., 2008). El concepto de "programación fetal o enfermedades originadas durante el desarrollo" refleja la posibilidad de la acción de factores intrauterinos durante un periodo sensible de la gestación, ejerciendo efectos organizativos que son evidentes en el futuro (Barker y col., 1993; Kotsampasi y col., 2009). Sin embargo los mecanismos de "programación" siguen siendo poco conocidos. En este sentido, se conoce que el aumento de los glucocorticoides prenatales predispone a enfermedades cardiovasculares y metabólicas en ratas adultas (O'Regan y Kenyon 2004). Asimismo en ovinos, los niveles excesivos de glucocorticoides durante la gestación disminuyen el peso al nacer (Sloboda y col., 2002). A nivel reproductivo el estrés agudo interfiere con los ejes hipotálamo-hipófiso-adrenal y el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Hardy y col., 2005).

## 1.2 Efectos de los glucocorticoides a nivel del testículo

A medida que el sistema reproductivo y sus sistemas de control hormonal se establecen durante la vida fetal, diversos factores ambientales nocivos pueden afectar posteriormente la función del eje reproductivo (Rhind, 2004). Estudios en ratas adultas determinaron que la administración de dexametasona inhibe los receptores de LH y la producción de testosterona en células de Leydig (Bambino y Hsueh, 1981; Welsh y col., 1982). Se ha observado también que el aumento de corticoides durante la gestación en ovinos modifica la expresión de enzimas apoptóticas como Bax, Bcl2 y caspasa-3 durante el desarrollo fetal y posnatal (Pedrana y col., 2013). Asimismo se ha demostrado que la exposición en adultos a la corticosterona aumenta la apoptosis en células de Leydig en ratas adultas (Gao y col., 2003) y disminuye la concentración de testosterona circulante (Hardy y col., 2002). También en ratas adultas cuyas madres han sido sometidas a estrés durante el parto se produce una inhibición de la actividad de esteroidogénesis, con disminución de las enzimas 17 $\alpha$ -hidroxilasa, 17, 20-liasa y 3 $\beta$ -HSD en las células de Leydig en la descendencia cuando adultas (Orr y Mann, 1992).

## 1.3 Esteroidogénesis testicular

La esteroidogénesis testicular consiste en la producción de hormonas esteroideas, como los andrógenos, sintetizados por las células de Leydig a nivel del compartimento intersticial del testículo (Stocco y McPhaul, 2006). En este proceso actúan diversas enzimas, como la enzima dimérica bifuncional 3 $\beta$ -HSD requerida para la biosíntesis de hormonas esteroideas como los glucocorticoides, progestágenos, andrógenos y estrógenos entre otros (Samuels y col., 1951).

La diferenciación sexual y esteroidogénesis ovinos se produce alrededor del día 30 de gestación, siendo los andrógenos requeridos para la expresión del fenotipo masculino (Quirke y col., 2001). Sin embargo, existen escasos datos sobre el

desarrollo de las gónadas, la ontogenia y la localización celular de la expresión de enzimas esteroideogénicas como la 3 $\beta$ -HSD hasta la etapa prepuberal.

Por otra parte se desconocen aún los efectos *in utero* de los glucocorticoides sobre la expresión de las enzimas esteroideogénicas testiculares durante el desarrollo fetal y posnatal temprano. Por lo tanto, el presente estudio determinó el efecto de la administración de glucocorticoides *in utero* sobre la expresión de la enzima 3 $\beta$ -HSD durante el desarrollo pre y posnatal en testículos en ovinos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Programación Fetal

La programación fetal puede ser definida como una respuesta del organismo de un mamífero a un desafío específico, durante un período crítico de tiempo que altera el desarrollo con efectos que persisten en la descendencia (Rabadan-Diehl y Nathanielsz, 2013). Durante el desarrollo fetal existen períodos críticos en donde ocurre la organogénesis y la diferenciación tisular (Langley-Evans, 2006). En estos períodos, un órgano o tejido específico puede ser programado por efecto de un factor con consecuencias adversas para su función en la vida posnatal, lo que se conoce como programación fetal (Recabarren y col., 2006). Los factores que inciden durante la vida fetal pueden “programar” el desarrollo de órganos o tejidos, predisponiendo a modificaciones que persisten durante la vida adulta (Kapoor y col., 2008).

#### 2.1.1. Factores de programación fetal

Dentro de los factores que pueden estar implicados en la programación fetal se han estudiado el estrés, la nutrición y los factores hormonales (Seckl, 2001). Como ejemplo de factores estresantes se estudió que el estrés perinatal disminuye el comportamiento masculino en los machos y retrasa la pubertad en las hembras (Squires, 2006).

Estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que la nutrición temprana tiene efectos a largo plazo sobre la susceptibilidad a la obesidad, a las enfermedades cardiovasculares y metabólicas, observándose que la desnutrición durante el desarrollo induce cambios en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa que difieren entre los tejidos y sexo dependiendo del período de restricción nutricional. (Poore y col., 2014).

Se ha estudiado en humanos, que fármacos administrados durante el período perinatal llegan al organismo en desarrollo en la fase vulnerable de histogénesis del cerebro y cito-diferenciación. Estos fármacos pueden interferir con los procesos de desarrollo del cerebro provocando anomalías que se hacen evidentes gradualmente durante la maduración o incluso en la edad adulta como desviaciones neuropsicológica de comportamiento (Benešová y col., 1989).

## 2.2. Glucocorticoides

Los glucocorticoides (GC) son hormonas esteroideas, producidas por las glándulas suprarrenales que regulan una variedad de procesos biológicos y ejercen influencias en muchas funciones fisiológicas. Están involucrados en el crecimiento, el desarrollo, y el mantenimiento de la homeostasis basal y se relacionan con el estrés (Charmandari y Chorusos, 2004). En medicina se utilizan como fármacos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores derivados del cortisol o hidrocortisona, hormona producida por la corteza adrenal esencial para la adaptación al estrés físico o emocional (Williams y Warwick, 1985).

### 2.2.1. Mecanismos de acción de los glucocorticoides

Los GC difunden en forma pasiva a través de la membrana celular, para unirse luego a proteínas receptoras solubles del citoplasma. Este complejo hormona-receptor se desplaza luego al núcleo y regula la transcripción de una cantidad limitada de genes diana. Otro mecanismo de acción consiste en modular la cascada de segundos mensajeros a través de vías no genómicas (Goodman, 1996). Estas hormonas ejercen sus efectos principalmente a través del receptor de glucocorticoides, un regulador transcripcional que puede activar o reprimir la expresión del gen diana (Schoneveld y Cidlowski, 2007).

### 2.2.2. Efectos generales de los glucocorticoides en el organismo

Los GC estimulan la gluconeogénesis hepática aumentando la síntesis de enzimas que actúan en la conversión de aminoácidos, glicerol y lactato en glucosa. También disminuyen el transporte y utilización de la misma por las células atribuyendo un efecto hipergluceante. Por otro lado, disminuyen la síntesis proteica en todos los tejidos excepto en el hígado y aumentan la movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo para su utilización como fuente de energía. Poseen acción antiinflamatoria e inmunosupresora y aumentan la secreción gástrica. (Squires, 2006).

### 2.2.3. Efectos de los glucocorticoides sobre la reproducción

Estas hormonas reducen la secreción de GnRh en el hipotálamo, interfiriendo en la síntesis de gonadotropina en la hipófisis, inhiben la producción de esteroides gonadales y reducen la sensibilidad de los tejidos diana a las hormonas sexuales. También reducen la liberación de LH inhibiendo la hidrólisis de fosfolípidos y liberando ácido araquidónico (Squires, 2006).

Estudios previos sugieren que los glucocorticoides prenatales reducen el crecimiento fetal de manera sexo específica, en las hembras hay más restricción en el crecimiento que en los machos (Miller y col., 2012). El estrés inducido por niveles altos de corticoesteroides parecen inhibir la esteroidogénesis por un mecanismo mediado por receptores de glucocorticoides, ya que las células de Leydig expresan receptores de glucocorticoides y pueden ser objeto de la inhibición directa de la esteroidogénesis por los GC (Haider, 2004).

En ratas se determinó que la administración de dexametasona *in vitro* inhibe la producción de andrógenos en células progenitoras de Leydig mediante la reducción de la expresión de la proteína reguladora de esteroidogénesis y de la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) (Xiao y col., 2010).

Por otro lado, se observó que el tratamiento *in vivo* con dexametasona cambia significativamente la expresión de los genes e induce la translocación nuclear de los receptores de glucocorticoides dependiente de ligando en las células epiteliales de epidídimo, lo que indica que los glucocorticoides son totalmente activos en este tejido participando en la regulación del epidídimo y de las hormonas esteroideas (Silva y col., 2010).

#### 2.2.4. Usos terapéuticos de los glucocorticoides exógenos *in utero*.

En mujeres gestantes con riesgo de parto prematuro, los tratamientos con GC son utilizados como terapia de rutina, produciendo efectos positivos en el recién nacido (Bishop, 1981) como ser evitar el síndrome de diestrés respiratorio (Ikegami y col., 1997). Sin embargo, se ha visto que los GC disminuyen el peso al nacer y predisponen a patologías cardiovasculares o metabólicas (Drake y col., 2007; Seckl, 2007).

También se estudió que en humanos la administración de glucocorticoides tienen efectos no pulmonares, incluyendo la reducción del cuerpo fetal y del crecimiento del cerebro (Miller y col., 2012).

En ratas, se vio que dosis bajas de dexametasona administradas durante la preñez reduce el peso al nacer, pero no afecta el tamaño de camada, a pesar de que más tarde provoca hipertensión, hiperglucemia e hiperinsulinemia (Braun y col., 2009). Otros investigadores, han demostrado que la exposición fetal a los GC *in utero* en ovinos conduce a la posterior aparición de trastornos cardiovasculares, especialmente la hipertensión (Dodic y col., 1998).

#### 2.2.5. Efectos de glucocorticoides en testículos de animales adultos

En el testículo los GC presentan un efecto inhibitorio sobre los receptores de LH y sobre la esteroidogénesis en adultos (Bambino y Hsueh, 1981; Welsh y col., 1982). Se observó también que las células de Leydig expresan receptores a GC (Ge y col., 1997) y por lo tanto son blanco de la inhibición directa de la esteroidogénesis por GC (Hardy y col., 2005; Xiao y col., 2010).

Otros resultados sugieren que durante el estrés los aumentos de GC en plasma de ratas macho actúan a través de receptores de glucocorticoides en las células intersticiales testiculares para suprimir la respuesta testicular a las gonadotropinas, y que la disminución de la producción de testosterona durante el estrés es en parte mediada por una acción directa de los GC sobre el testículo (Orr y Mann, 1992).

## 2.3 Testículos en ovinos

### 2.3.1. Desarrollo testicular fetal en ovinos

Durante la ontogenia testicular en ovinos ocurren diversos eventos fisiológicos y morfológicos que serán desarrollados brevemente (Figura 1). El desarrollo del aparato genital se produce a partir de las crestas genitales derivadas del mesonefros. A partir de los días 20 a 35 de gestación se inicia la formación de las crestas genitales en ovinos (Zambrano y col., 2014).

Las células primordiales germinales (PGC) derivadas de células del epiblasto (Lawson y Pederson, 1992) migran durante el desarrollo embrionario a la base del alantoides y a lo largo del intestino posterior para finalmente alcanzar las crestas genitales (De Rooij y Russell, 2000). Después de migrar a las crestas gonadales, las PGC se convierten en gonocitos a medida que quedan encerradas dentro de los cordones sexuales formados por las células precursoras de Sertoli y estas a su vez rodeadas por las células peritubulares (Sapsford, 1962).

La formación de cordones sexuales comienza a los 35 días de gestación, junto a la diferenciación de células de Leydig (Sapsford, 1962) e inicio de la secreción de testosterona (Zambrano y col., 2014). En los cordones sexuales las células germinales se conocen como gonocitos o pro-espermatogonias y ocupan una posición central en los mismos, y se van a ir diferenciando de forma paulatina. Los términos de gonocito o gonocito maduro, y pro-espermatogonia, se utilizan con respecto a las células germinales en maduración en carnero definidos por Sapsford (1964). Una vez que los gonocitos migran hacia la lámina basal de los cordones sexuales las células son morfológicamente y bioquímicamente distintas y se denominan espermatogonias de tipo A indiferenciada seguido de espermatogonias de tipo intermedia y luego de tipo B, clasificadas en base a la cantidad de heterocromatina nuclear (De Rooij y Russell, 2000).

Por otra parte, entre los cordones sexuales se localiza el tejido intersticial, compuesto entre otras por los precursores de las células de Leydig fetales (Parker y Schimmer, 2006). La expresión de la enzima  $3\beta$ -HSD y la AMH se observa en células de Leydig y Sertoli a partir de los 30, 40, 56, 70 y hasta los 130 días de gestación en ovinos (Sweeney y col., 1997; Zambrano y col., 2014). Esta morfología testicular se mantiene hasta el período posnatal, aunque la actividad mitótica de los testículos es importante durante el período fetal. El testículo crece en función del aumento del diámetro y longitud de los cordones sexuales desde el día 42 a 139-150 de gestación. Asimismo el peso testicular va aumentando de forma gradual. Entre los 43-45 días de gestación comienza la diferenciación de las glándulas anexas a las vías genitales masculinas (próstata, vesículas seminales), pene y descenso inguinoescrotal (Hochereau-De Reviere y col., 1995).

### 2.3.2. Desarrollo testicular posnatal en ovinos

Se ha demostrado que los patrones de asociación de las células de la línea espermatogénica son complejos y se desarrollan en el testículo inmaduro tal como en la espermatogénesis en el adulto. Los cordones sexuales fetales contienen espermatogonias de tipo A inmaduro o también llamadas As o stem cells spermatogonia (Rooij y Russell, 2000).

En animales posnatales se ha encontrado gonocitos o pro-espermatogonias (generalmente situadas en posición central dentro de los cordones sexuales/túbulos seminíferos) que alcanzan la lámina basal de los cordones sexuales. Existen similitudes citológicas entre los gonocitos y las células madre espermatogonias en el carnero adulto. Las células hijas de los gonocitos una vez que alcanzan la lámina basal de los cordones sexuales (futuros túbulos seminíferos) asumen el papel de célula madre espermatogonias (tipo As). Las capas de células de la línea germinal son características de la espermatogénesis de los túbulos en adulto, se fueron construyendo gradualmente. Mientras que este último cambio se produce, los núcleos de las espermatogonias de tipo A disminuyen de tamaño y su morfología es más aplanada contra la lámina basal (Sapsford, 1964).

El desarrollo de los cordones sexuales/ túbulos seminíferos entre los 25 y 100 días de edad, se incrementa en diámetro y en longitud. El número total de células de Sertoli por testículo se duplica aproximadamente entre los 25 y 40 días de edad en ovinos, y es constante a partir de entonces. De los 40 días en adelante sus tamaños celulares y nucleares aumentan significativamente en espermatogonias de tipo A, espermatoцитos primarios pre-leptoténicos (Sapsford, 1962).

En corderos 25 días de edad, están presentes sólo gonocitos, pero entre 40 y 70 días, aparecen progresivamente espermatogonias de tipo A0 y A1. A los 70 días de edad, en corderos cruza Romanov x Ile- de- France, los espermatoцитos primarios leptoténicos están presentes en un número reducido. A los 85 días de edad, están presentes espermatoцитos primarios leptoténicos en todos los animales, mientras que en algunos animales se observan espermátidas redondas. A 100 días de edad, la mayoría de los corderos producen espermátidas redondas (Monet-Kuntz y col., 1984).

En carneros adultos existe correlación positiva entre el número total de células de Sertoli y células germinales por testículo. La formación de espermatozoides, su motilidad y la capacidad de fertilizar ovocitos dependen entre otros factores, de los andrógenos y por lo tanto del número de células de Leydig y su actividad secretora (Hochereau-De Reviere y col., 1995).

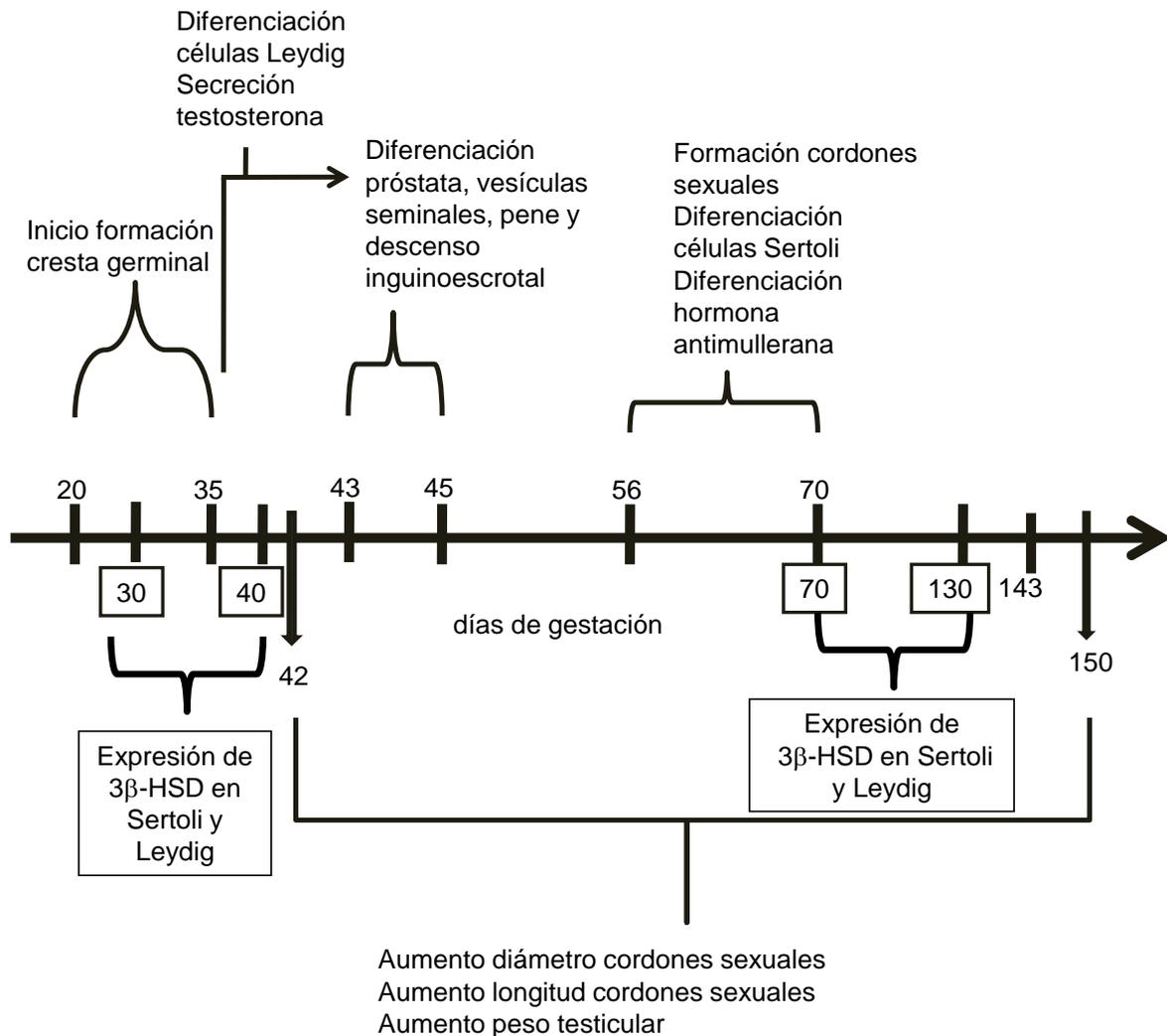


Figura 1. Ontogenia testicular: Eventos fisiológicos y morfológicos durante el desarrollo testicular en ovinos. La información referente a 3β-HSD fue extraída de Sweeney y col., 1997, y los aumentos de diámetro, longitud de cordones sexuales y peso testicular fueron extraídos de Hochereau- de Reviers y col., 1995. Esquema adaptado de Zambrano y col., 2014.

### 2.3.3. Anatomía testicular en animales adultos

Los testículos son órganos ovoides, pares que se encuentran fuera de la cavidad abdominal en ovinos adultos y cubiertos externamente por la piel denominada escroto. Internamente se encuentran unidos a una túnica vaginal que posee dos capas, una parietal que permanece adherida al escroto y una visceral el peritoneo que cubre los testículos y los epidídimos permaneciendo íntimamente asociada a la cápsula subyacente del testículo llamada túnica albugínea (Kerr y col., 2006). La túnica albugínea es una cápsula sólida de tejido conjuntivo denso e irregular, formada por fibras colágenas, fibras elásticas y fibras musculares. En su parte externa está rodeada de la túnica vaginal visceral y parietal derivadas del peritoneo. La túnica albugínea en su superficie interna está en contacto con vasos sanguíneos que en algunas especies forman una túnica vascular. De la albugínea se desprenden trabéculas de tejido conjuntivo llamadas septula testis que convergen hacia el mediastino testis para rodear los grandes vasos intratesticulares en la mayoría de los

animales domésticos (Wrobel y Dellman, 1993). Las trabéculas dividen al parénquima testicular en lobulillos testiculares que contienen cada uno de ellos de uno a cuatro túbulos seminíferos contorneados (Figura 2).

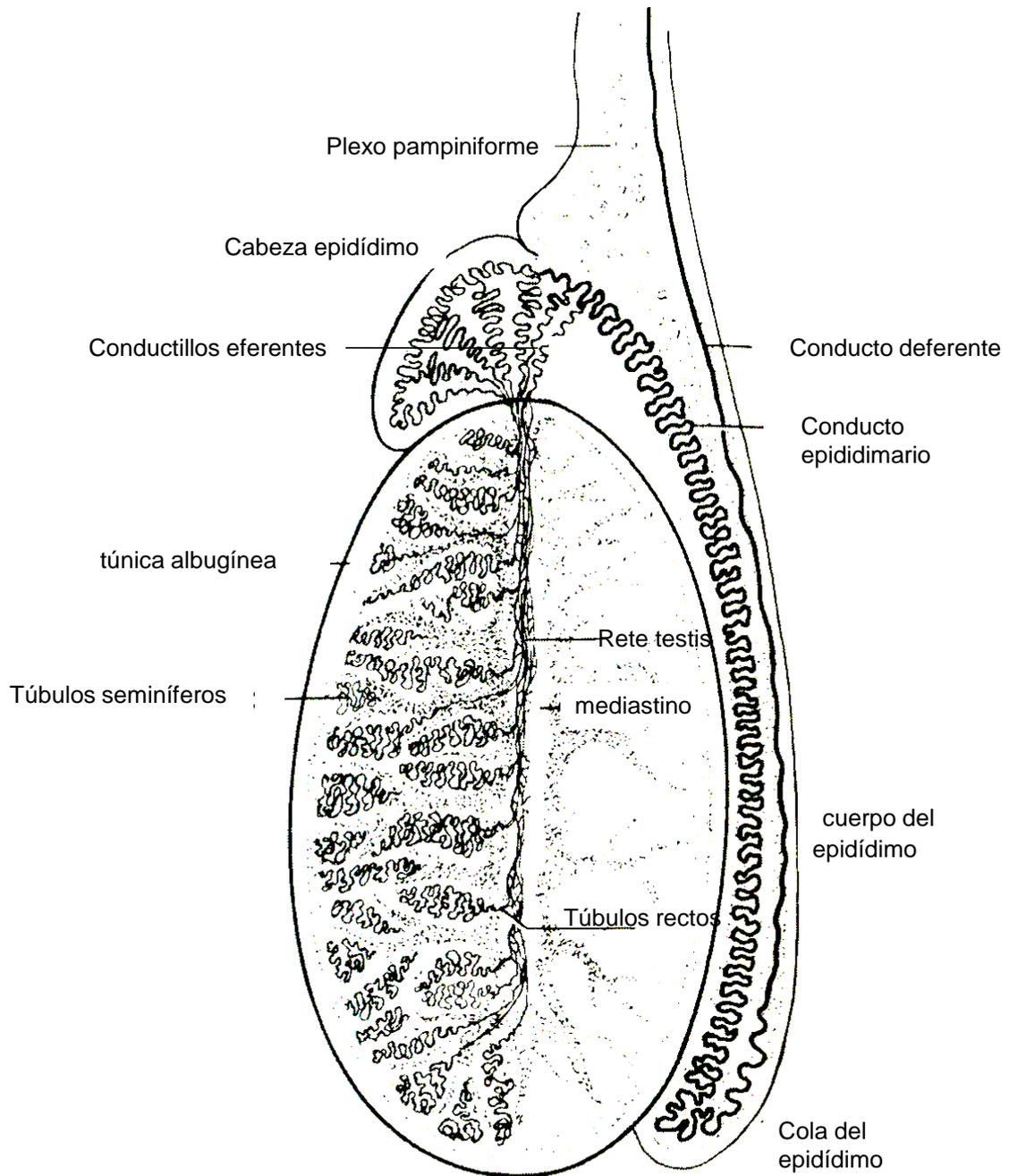


Figura 2: Sección longitudinal de un testículo y epidídimo. Adaptado de Dyce y col., 2007.

## 2.3.4. Histología testicular

### 2.3.4.1. Túbulos seminíferos

Histológicamente los túbulos seminíferos están compuestos por tres componentes: 1) una lámina propia que rodea al túbulo seminífero posee una lámina basal conectada a células peritubulares de morfología plana que al nacer parecen células mesenquimales y gradualmente se diferencian en células contráctiles. Estas células son las responsables de las contracciones tubulares participando también en la espermiación, 2) células somáticas de sostén o soporte denominadas células de Sertoli o *Epiteliocytus sustentans*, 3) células de la línea germinal (Wrobel y Dellman, 1993).

#### 2.3.4.1.1. Células somáticas de sostén o soporte denominadas células de Sertoli

Derivan del epitelio celómico, y son células de soporte, son mitóticamente activas en el testículo prepuberal y producen numerosas hormonas, entre las que se encuentra la hormona antimulleriana (AMH o Anti Mullerian Hormmone). Las células de sósten en el testículo adulto pierden el potencial mitótico y se vuelven elongadas y de perfil irregular. Las células de Sertoli desempeñan funciones nutritivas, de sostén y de soporte para las células espermatogénicas, participando en la espermiación y modulación de la actividad de la FSH y testosterona en células germinales (Wrobel y Dellman, 1993). Estas células fagocitan restos de espermátidas y secretan la proteína fijadora de andrógeno, hormonas y un medio nutritivo, y establecen la barrera hemato-testicular (Gartner y Hiatt, 2008). Aparentemente la regulación local de la célula de Leydig por los túbulos seminíferos ocurre principalmente por la acción de las células de Sertoli, ya que no existe evidencia de un efecto directo por parte de las células germinales (Sprando y Zirkin, 1997) o células peritubulares (Risbridger y Skinner, 1992).

#### 2.3.4.1.2. Células de la línea germinal.

Las células de la línea germinal fueron descritas anteriormente en el párrafo correspondiente a desarrollo testicular se localizan entre y por encima de las células de sostén. Estas células dan origen a los espermatozoides luego de pasar por las etapas de espermatocitogénesis (pasaje de espermatogonia madura a espermatocito), meiosis (espermatocitos a espermátidas con número haploide de cromosomas), espermiogénesis (diferenciación de espermátidas a espermatozoides) (Wrobel y Dellman, 1993).

#### 2.3.4.2. Intersticio testicular

En los espacios entre los cordones sexuales/túbulos seminíferos se encuentran vasos linfáticos, sanguíneos, células mononucleares y células intersticiales denominadas células de Leydig (Wrobel y Dellman, 1993). El soporte estructural en dicho tejido es proporcionado por haces de fibra de colágeno y algunas células similares a fibroblastos que forman puentes de unión con grupos de células de Leydig. La mayor parte del área intertubular está ocupada por una extensa red de vasos linfáticos sinusoides con finas paredes endoteliales. Este sistema linfático

provee un medio por el cual las células de Leydig reciben y secretan sustancias transportadas hacia el torrente sanguíneo. En ovinos existe una relativa escasez de células de Leydig con respecto a las amplias áreas de tejido conjuntivo laxo. Los pequeños acúmulos de células de Leydig están frecuentemente asociadas con vasos sanguíneos y con menos frecuencia ocupan posiciones distantes al sistema vascular (Fawcett, 1973; Kerr y col., 2006).

#### 2.3.4.2.1. Células de Leydig

Las células de Leydig producen la hormona sexual masculina conocida como testosterona (Lee y col., 1976; Savoie y col., 2008). Estas células endócrinas son polimórficas y de gran tamaño, se disponen en cordones, en acúmulos o de forma aislada dependiendo de cada especie animal. Poseen núcleo esférico y mitocondrias provistas de crestas tubulares con enzimas implicadas en el primer paso de síntesis de hormonas esteroideas (Guraya, 1998; Wrobel y Dellman, 1993) (Figura 3).

Las mitocondrias varían en tamaño y forma de una célula de Leydig a otra y entre especies. La habilidad de las células de Leydig para aumentar la esteroidogénesis luego de la estimulación es dependiente de la importación del colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la membrana mitocondrial interna, este proceso es regulado por la proteína Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR), la cual será mencionada posteriormente en el desarrollo de las enzimas esteroidogénicas. El colesterol es sometido a escisión de la cadena lateral dentro de la mitocondria, en la superficie de las crestas con formas foliada, tubular o intermedia (Kerr y col., 2006).

El retículo endoplásmico liso es el organelo citoplasmático de gran importancia en las células de Leydig, ya que en su superficie proporciona sitios de unión para numerosas enzimas necesarias para la esteroidogénesis. Existe una fuerte correlación entre la secreción de testosterona y la cantidad retículo endoplásmico liso y complejo de Golgi en el citoplasma de células de Leydig, lo que indica el papel central desempeñado por estos organelos en la determinación de la capacidad secretora de las células de Leydig (Kerr y col., 2006). El retículo endoplásmico liso en células de Leydig humanas esta positivamente correlacionado con la producción diaria de espermatozoides (Johnson y col., 1990). Por otra parte las inclusiones lipídicas de las células de Leydig varían de una célula a otra y entre especies, sugiriendo los grados variables de actividad funcional (Kerr y col., 2006).

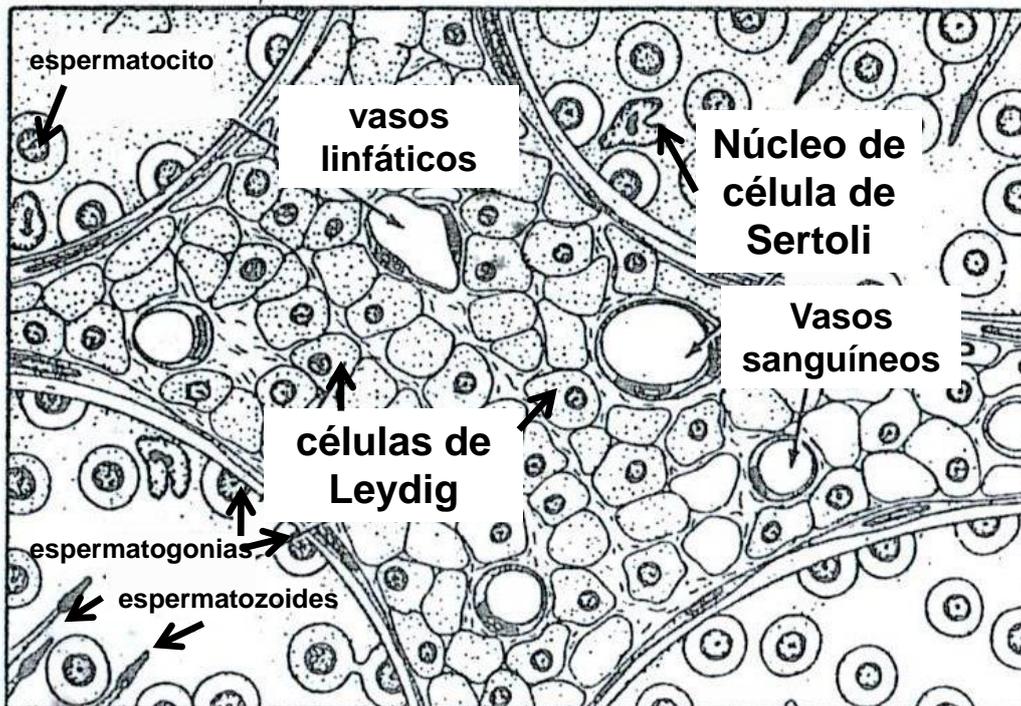


Figura 3. Esquema representativo de la histología del testículo de un animal adulto. Se observan acúmulos de células Leydig que aparecen en el tejido intersticial entre los túbulos seminíferos. Dentro de ellos se observan células de la línea germinal ubicados desde la basal a la luz del túbulo en el siguiente orden: espermatogonias, espermatocitos y espermatozoides. Adaptado de Kerr y col., 2006).

## 2.4. Andrógenos testiculares

Los andrógenos son hormonas esteroideas esenciales para el desarrollo normal de los órganos genitales masculinos externos e internos. Por un lado promueven el desarrollo morfológico y funcional del testículo, y por otra parte influyen sobre el comportamiento sexual, estimulando el crecimiento y mantenimiento de la función de las glándulas accesorias y de los caracteres sexuales secundarios. También ejerce el control en la espermatogénesis y produce efectos anabólicos que contribuyen al desarrollo corporal del animal (Wrobel y Dellman, 1993).

La testosterona, secretada por las células de Leydig en testículos, resulta esencial para algunas etapas básicas de la división de las células germinales hasta formar los espermatozoides (García Sacristán, 1998). La corteza adrenal también secreta andrógenos, pero en cantidades que en general son bajas y depende de la especie (McDonald, 1991).

### 2.4.1. Rol de los andrógenos en la reproducción masculina

La testosterona posee diferentes funciones a lo largo de la vida, para el feto (antes del nacimiento) es responsable del desarrollo de los testículos y los genitales externos masculinos. Durante la pubertad es la hormona responsable de los caracteres sexuales secundarios masculinos como el desarrollo muscular, producción y maduración de espermatozoides entre otras funciones.

En el adulto la testosterona controla todas las funciones sexuales como la libido, la potencia y la fertilidad y conserva la apariencia típica masculina que se desarrolla en la pubertad (Gartner y Hiatt, 2008).

Ésta hormona se encarga de promover el crecimiento y mantenimiento de la función de las glándulas accesorias masculinas y de los caracteres sexuales secundarios. Controla la espermatogénesis junto a la hormona hipofisaria FSH (folicular stimulating hormone), que posee acción de retroalimentación negativa sobre la hipófisis e hipotálamo, tiene efectos anabólicos generales y de mantenimiento prenatal del conducto de Wolff y su diferenciación en conducto deferente y epidídimo (Wrobel y Dellman, 1993).

#### 2.4.2. Esteroidogénesis testicular

La esteroidogénesis es el proceso de síntesis de hormonas esteroideas. A nivel testicular los andrógenos son producidos por células de Leydig en el compartimento intersticial del testículo. Éstas células intersticiales realizan la síntesis de testosterona bajo el control de la liberación pulsátil de gonadotropina pituitaria LH o ICH (Stocco y McPhaul, 2006). La producción de esteroides es regulada en gran parte por los niveles relativos y presencia de enzimas esteroidogénicas expresadas a nivel celular en una forma específica para cada tejido (Conley y col., 1997).

Mientras que la producción de esteroides prácticamente se produce en el compartimento intersticial de los testículos, pequeñas cantidades de pregnenolona pueden ser sintetizados por las células de Sertoli dentro de los túbulos seminíferos, aunque no está claro que esta producción tenga una relevancia fisiológica (Stocco y McPhaul, 2006).

En todos los tejidos esteroidogénicos, independientemente de la hormona sintetizada, el paso inicial en la esteroidogénesis es la conversión de colesterol a pregnenolona dentro de la mitocondria (Stocco, 2001).

#### 2.4.3. Enzimas reguladoras de la esteroidogénesis:

Las enzimas esteroidogénicas las podemos dividir en dos clase de proteínas: las citocromo P450 y las hidroxisteroide deshidrogenasas (Payne y Hales, 2004).

Nos enfocaremos en la biosíntesis de la testosterona en las células de Leydig. Una de las enzimas más importantes es la enzima 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ HSD) que se localiza en múltiples etapas de la biosíntesis de testosterona, encontrándose tanto en el pasaje de pregnenolona a progesterona, 17 $\alpha$  hidroxipregnenolona a 17 $\alpha$  hidroxiprogesterona, dihidroepiandosterona a  $\Delta$  4 androsotenediona y de 5  $\Delta$  androstenediol a testosterona (Stocco y McPhaul , 2006). En la figura 4 se indican las enzimas implicadas en la biosíntesis de testosterona.

A continuación se describen brevemente las enzimas esteroidogénicas involucradas en la esteroidogénesis testicular:

2.4.3.1. La enzima proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) determina la tasa de producción absoluta de testosterona, ya que regula la entrada del colesterol hacia la membrana interna de la mitocondria. Su síntesis se da de forma temprana en respuesta a la acción de la LH (Clark y col., 1994).

2.4.3.2. La enzima P450 scc (side chain cleavaje) o también llamada desmolasa o CYP11A1, actúa en la membrana interna de la mitocondria para que el colesterol (C 27) sea liberado de su cadena lateral, convirtiéndose en pregnenolona (C 21) (Natesampillai y col., 2008; Stocco y McPhaul, 2006; Kotula-Balak y col., 2012)

2.4.3.3. La enzima 3  $\beta$ hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD), fue descrita en 1951 y posteriormente caracterizada como enzima dimérica bifuncional requerida para la biosíntesis de todas las clases de hormonas esteroides como glucocorticoides, mineralocorticoides, progestágenos, andrógenos y estrógenos (Samuels y col., 1951). Esta enzima pertenece al grupo de las hidroxiesteroide deshidrogenasas (HSD), al igual que la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide reductasa deshidrogenasa / cetosteroides (17 $\beta$ -HSD/KSR) actúan a nivel de retículo endoplásmico para la formación de hormonas esteroides (Payne y Hales, 2004). Las mismas tienen funciones específicas en la biosíntesis de hormonas esteroides sexuales (Guraya, 1998), siendo la 3 $\beta$ -HSD la enzima más estudiada en las células de glándulas esteroides (Baillie y col., 1966). En el testículo, esta enzima se expresa casi exclusivamente en las células de Leydig, aunque en condiciones inusuales, bajos niveles de expresión pueden ser vistos en las células de Sertoli (Stocco y McPhaul, 2006).

A nivel de retículo endoplásmico liso ésta enzima actúa sobre la pregnenolona y difunde para ser transformada en progesterona (Payne y Youngblood, 1995). Dicha enzima en el retículo endoplasmático de células de Leydig cataliza el pasaje de 17  $\alpha$  hidroxipregnenolona a 17  $\alpha$  hidroxiprogesterona, de dehidroepiandrosterona a androstenediona y por último de androstenediona a testosterona (Simard y col., 2005).

2.4.3.4. Otra enzima, la P450 17 $\alpha$  hidroxilasa/C17-20 liasa (P450c17), actúa sobre la progesterona catalizando dos reacciones consecutivas: la hidroxilación en el carbono 17 $\alpha$ , dando como resultado la formación de la 17  $\alpha$  hidroxiprogesterona, y la liberación de la cadena de dos carbonos, formando androstenediona, el precursor inmediato de la Testosterona (Payne y Hales, 2004).

2.4.3.5. La enzima 17  $\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa (17  $\beta$  HSD) se caracteriza por cumplir una función oxidativa sobre la testosterona transformándola en androstenediona, y reduce el grupo cetónico 17 de la androstenediona formando la testosterona (Payne y Hales, 2004). También actúa en el pasaje estrona a estradiol-17 $\beta$  y viceversa (Stocco and McPhaul, 2006).

Tanto 3 $\beta$ -HSD y 17 $\beta$ -HSD son bien conocidos marcadores específicos de células de Leydig en diferentes mamíferos, en diferentes momentos del desarrollo y bajo diferentes regímenes (Bilinska, 1994; Hejmej y col., 2011b ; Mendis-Handagama y Ariyaratne, 2001; Teerds y col., 2007). La actividad de estas enzimas en los testículos

de varios mamíferos se puede determinar usando técnicas histoquímicas (Badrinarayanan y col., 2006; Bilinska 1979 , 1983 ,1994 ; Hutson, 1989 ) y por lo tanto la actividad de síntesis de las células de Leydig puede ser evaluada mediante su inmunexpresión (Simard y col., 2005).

2.4.3.6. Otra enzima es la 5 $\alpha$  reductasa, participa en la conversión de la testosterona al andrógeno más potente llamado dihidrotestosterona (DHT). Por lo general se produce en los tejidos diana androgénicos, aunque se sabe que las células de Leydig también son capaces de producir testosterona a partir de andrógenos  $\alpha$ 5 reducidos. El testículo es también una fuente de estrógenos como el estradiol-17 $\beta$ , este esteroide puede ser sintetizado por las células de Sertoli a partir de los andrógenos presentes en el testículo por la acción de la enzima microsómica citocromo P450 aromatasa (Stocco y McPhaul, 2006).

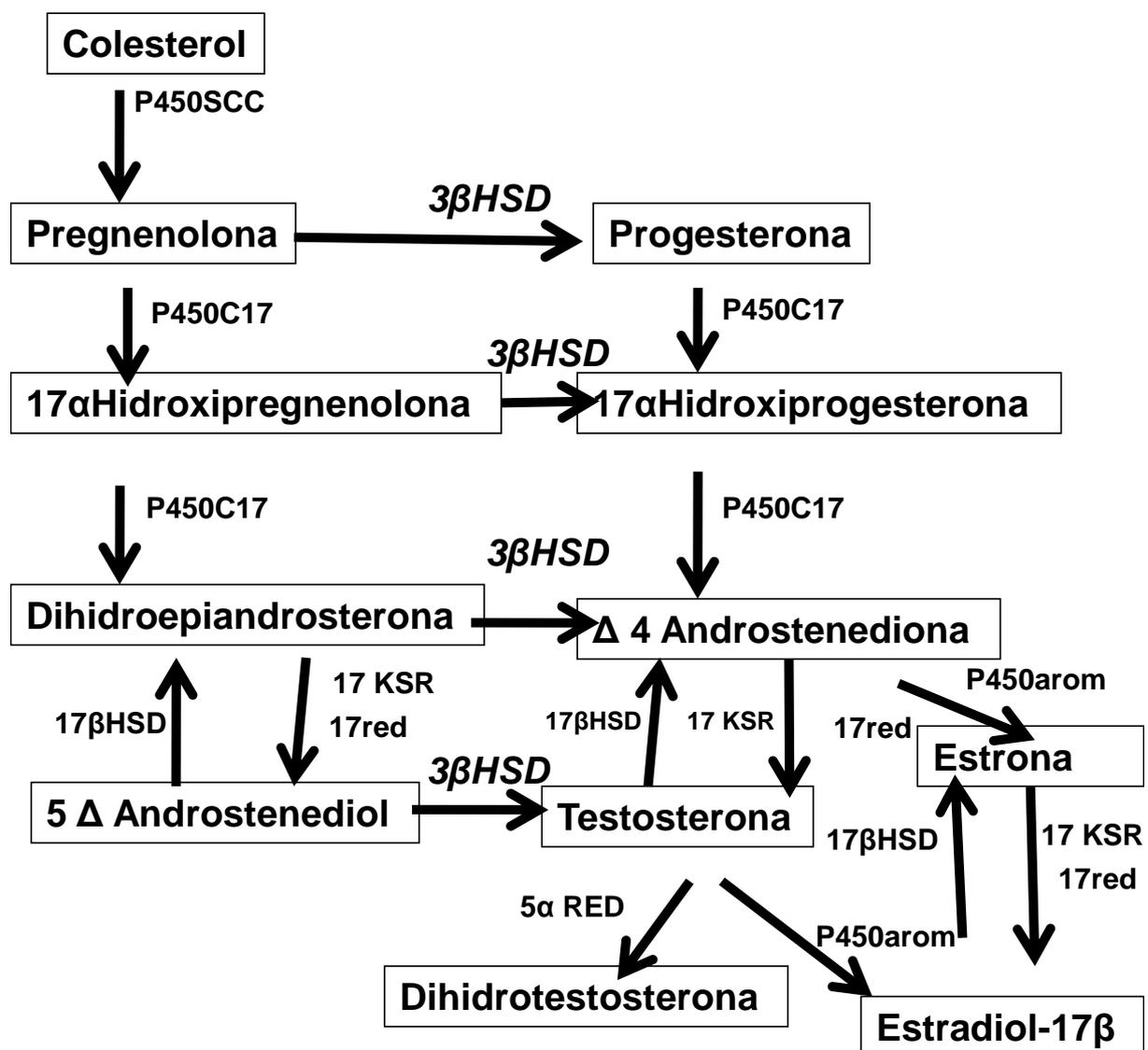


Figura 4. Biosíntesis de testosterona en células de Leydig. Esta figura ilustra los pasos presentes en la conversión enzimática del colesterol a testosterona. La enzima 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ HSD) se encuentran en múltiples etapas de la biosíntesis de testosterona, encontrándose tanto en el pasaje de pregnenolona a progesterona, 17 $\alpha$  hidroxipregnenolona a 17 $\alpha$

hidroxiprogesterona, dihidroepiandrosterona a  $\Delta$  4 androsotenediona y de 5  $\Delta$  androstenediol a testosterona. Adaptado de Stocco y McPhaul ,2006.

## 2.5. Acción de los glucocorticoides sobre la expresión de la 3 $\beta$ -HSD

Se han evidenciado efectos opuestos de acuerdo a los órganos involucrados. Por un lado en la glándula adrenal el aumento de GC aumenta la expresión de la enzima 3 $\beta$ -HSD (Feltus y col., 2002).

Sin embargo, a nivel testicular luego de la administración *in utero* de dexametasona se registró una disminución de la producción de testosterona en células de Leydig *in vitro* en animales inmaduros, pero no se midió la expresión de la enzima 3 $\beta$ -HSD (Page y col., 2001).

Por otra parte se desconocen aún los efectos *in utero* de los glucocorticoides sobre la expresión de las enzimas esteroiogénicas testiculares durante el desarrollo fetal y posnatal temprano.

Por la tanto el presente estudio determinó los efectos de la administración *in utero* de GC en la expresión de la enzima 3 $\beta$ -HSD en las células testiculares de Leydig durante el desarrollo pre y posnatal en ovinos.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Determinar los efectos de los glucocorticoides *in utero* sobre la ontogenia de la expresión de la enzima esteroideogénica testicular  $3\beta_1$ -HSD pre y posnatal en ovinos.

#### Objetivos específicos

1- Determinar la immunoexpresión de la enzima  $3\beta$ -HSD en testículos de fetos ovinos (121 y 132 días de gestación), que fueron tratados *in utero* con glucocorticoides y compararlos con sus respectivos controles

1- Determinar la immunoexpresión de la enzima  $3\beta$ -HSD en testículos posnatales de ovinos (45 y 90 días de nacidos), que fueron tratados *in utero* con glucocorticoides y compararlos con sus respectivos controles

### 4. HIPÓTESIS

#### Hipótesis nula

La administración de glucocorticoides *in utero* no disminuye la expresión de la enzima esteroideogénica  $3\beta$ -HSD durante el desarrollo pre y posnatal de ovinos.

#### Hipótesis alternativa

La administración de glucocorticoides *in utero* disminuye la expresión de la enzima esteroideogénica  $3\beta$ -HSD durante el desarrollo pre y posnatal de ovinos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Diseño experimental

Todos los procedimientos con animales y el diseño experimental fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Australia Occidental. Los experimentos fueron realizados en la estación experimental Allendale de la Universidad de Australia Occidental (UWA), Perth, Australia.

### 5.2. Animales

Se utilizaron hembras preñadas (n=42) que fueron divididas al azar para recibir inyecciones intramusculares de betametasona (0,5 mg/kg I/M; Celestone Chronodose; Schering Plough, Baulkham Hills, NSW, Australia; grupo tratado) o suero salino (grupo control) a los 104, 111 y 118 días de gestación (DG). Los fetos machos fueron sacrificados a los 121 DG (controles: n=5 y tratados: n=5) y a los 132 DG (controles: n=6 y tratados: n=5) y los corderos a los días posparto (PD) 45 (controles: n=6 y tratados: n=5) y 90 PD (controles: n=5 y tratados: n=5). Los fetos machos (obtenidos por cesárea) fueron muertos por decapitación y los corderos nacieron por parto natural a los 150 DG permaneciendo con sus madres en pastoreo y suplementados con grano de cereal y semillas de lupino. Los corderos fueron anestesiados con ketamina (15 mg / kg) y xilazina (0,1 mg / kg, Troy Laboratories, Smithfield, NSW, Australia) y se sacrificaron por decapitación.

### 5.3. Procesamiento histológico

Los testículos fueron disecados, pesados, cortados longitudinalmente y sumergidos en solución fijadora de Bouin por 12 horas. El procesamiento histológico fue realizado en los laboratorios de Anatomía Patológica e Histología y Embriología de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las muestras de testículo fueron deshidratadas en etanol (70, 95 y 100%), inmersas en cloroformo durante 12 horas y embebidas en parafina hasta el armado de los bloques. Se realizaron las secciones a 5 micrómetros de espesor en un micrótopo (Leica Reichert Jung BioCut 2030, Wetzlar, Alemania) y se colocaron en láminas portaobjetos y fueron secadas en estufa a 60° C.

### 5.4. Técnica de inmunohistoquímica

Se realizó la técnica de estreptavidina-biotin-peroxidasa descrito por Ortega y col 2010. Los cortes histológicos fueron desparafinados, rehidratados y realizada la recuperación antigénica en solución de buffer citrato 0.01M (pH 6. 0) con Tween 20, durante 5 minutos en microondas a máxima potencia. Luego se procedió al lavado con agua destilada y buffer fosfato salino (PBS; pH 7,4). Posteriormente se inactivaron las peroxidasas endógenas del tejido mediante solución de peróxido de hidrógeno al 3% por 20 minutos. Luego se lavaron en PBS y se bloquearon las uniones inespecíficas con suero normal ovino. Los cortes histológicos se incubaron en cámara húmeda a 4° por 18 horas con anticuerpo primario anti 3 $\beta$ <sub>1</sub>-HSD (mouse monoclonal, concentración 1 mg/ml, dilución de uso=1:100, ab 55268, Abcam, Cambridge, MA, USA). Posteriormente los cortes histológicos se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado antimouse (ab 64259 Abcam, Cambridge, MA, USA) durante 30 minutos. Los cortes histológicos se lavaron con

PBS y se incubaron con el complejo enzimático streptavidina-peroxidasa (HRP/DAB detection Kit, ab 64259, Abcam, Cambridge, MA, USA) por 30 minutos, se lavó con PBS y se realizó el revelado con solución de diaminobenzidina (DAB) (ab64259, Abcam, Cambridge, MA, USA). Las secciones fueron contracoloreadas con hematoxilina de Mayer, deshidratadas y montadas con bálsamo de Canadá sintético (Biopack, Argentina).

#### 5.5. Captura de imágenes de preparaciones de inmunohistoquímica

Cada imagen digital fue obtenida mediante un software de captura (DinoCapture 2,0 software, AnMo Electronics Corporation, Taiwan) a través de una cámara digital (Dino-Eyepiece, AM-423X, AnMoElectronicsCorporation, Taiwan) conectada a un microscopio (trinocular Premiere Profesional, modelo MRP-5000, Manassas, EE.UU.) a una magnificación de 400x.

#### 5.6. Análisis digital de imágenes

Se realizó el análisis de la inmunomarcación ("presencia de color marrón", DAB positivos, que indicó expresión de la proteína  $3\beta_1$ -HSD en 50 imágenes digitales por animal y por testículo (grupos control y tratado) utilizando un programa de análisis de imágenes ImageJ (Image J 1.43m, Wayne Rasband open Source, National Institutes of Health, EEUU, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). En cada una de las imágenes histológicas se analizó: % de área inmunomarcada en células de Leydig y cordones sexuales, intensidad de inmunomarcación en Leydig y cordones. Para el proceso de análisis se realizaron procedimientos de segmentación, binarización, umbralización y creación de macros automatizando el procesamiento de cada imagen con los parámetros de intensidad de coloración marrón (DAB positivos) seleccionados previamente (en color segmentation: hue, saturation y brightness en el programa ImageJ). Para establecer el umbral para la detección de la tinción de color marrón, se seleccionaron intensidades de color marrón específicos (o áreas positivas). Este análisis de umbral de color y análisis de segmentación se establece para el anticuerpo a partir de una imagen RGB. El porcentaje de área marcada se evaluó mediante análisis de segmentación de color en el que se extraen todos los objetos de un umbral específico de color marrón. Estos valores fueron verificados y normalizado con varios controles realizados durante las ejecuciones utilizando la misma región para la calibración.

#### 5.7. Análisis estadístico

Se llevó a cabo los análisis descriptivos de todas las variables continuas analizadas que fueron las siguientes: porcentaje de área inmunomarcada  $3\beta_1$ -HSD en células de Leydig, intensidad de inmunomarcación de  $3\beta_1$ -HSD en células de Leydig, porcentaje de área inmunomarcada  $3\beta_1$ -HSD en cordones sexuales, intensidad de inmunomarcación de  $3\beta_1$ -HSD en cordones sexuales. Los valores fueron expresados como medias ( $\pm$  e.e.m), se comparó mediante EL MODELO GENERAL LINEAL, GLM, considerando en el modelo los efectos de la fecha (121DG, 132DG, 45PD y 90PD) y el tratamiento (salino y betametasona) y la interacción entre ambos. Se utilizó el programa estadístico (SAS; v. 9.1; SAS InstituteInc; Cary, NC, EE.UU). En todos los casos, el nivel de significación fue de  $P < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

6.1 Resultados de inmunolocalización de la enzima 3 $\beta$ -HSD en el testículo de ovinos.

La inmunoexpresión de la enzima 3 $\beta$ -HSD se localizó en el intersticio testicular en el citoplasma de las células de Leydig. La morfología celular de Leydig y la expresión en las mismas de 3 $\beta$ -HSD varió de acuerdo con las etapas de desarrollo pre y postnatal.

La enzima se localizó a nivel citoplasmático en Leydig fetales durante las etapas pre y postnatal.

Asimismo se localizó la expresión de 3 $\beta$ -HSD dentro de los cordones sexuales / túbulos seminíferos específicamente en algunas células de Sertoli (Figura 5).

La enzima se localizó a nivel citoplasmático en Sertoli durante las etapas pre y postnatal.

En gonocitos no se observó expresión de 3 $\beta$ -HSD en ninguna etapa ni prenatal ni posnatal.

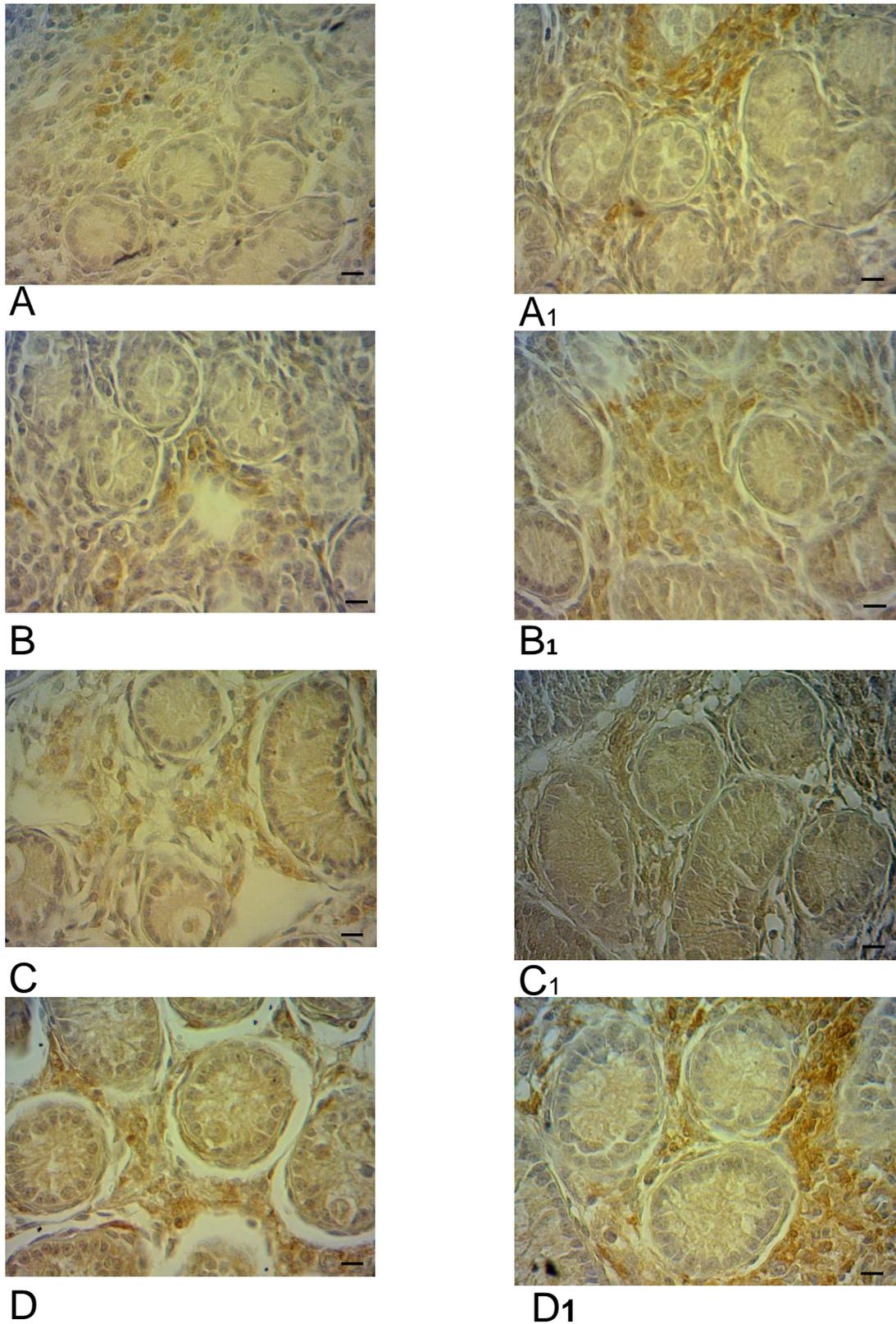


Figura 5. Localización de la enzima  $3\beta$ -HSD por inmunohistoquímica en testículos de ovinos tratados *in utero* durante el desarrollo prenatal a los 121 y 132 días de gestación, A, A1; B, B1 control y tratado respectivamente, y posnatal al os 45 y 90 días de posparto, C, C1; D, D1 control y tratado respectivamente. Magnificación 400x. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

## 6.2 Resultados de inmunoexpresión de la enzima 3 $\beta$ -HSD en células de Leydig.

A los 121 DG, el % de área inmunomarcada en las células de Leydig tiende a aumentar en los animales tratados frente a los controles ( $P = 0,09$ ). Sin embargo, no hubo diferencias entre los animales tratados y controles en otros momentos del muestreo (132 DG, 45 PD, 90 PD). En animales tratados el % de área inmunomarcada en células de Leydig disminuyó a los 45 y 90 PD ( $P= 0,07$  y  $P=0,04$  respectivamente) en comparación con los animales tratados a los 121 DG. Sin embargo, entre los animales controles no se evidenciaron cambios a lo largo del desarrollo pre y posnatal en cuanto al % de área inmunomarcada ( Figura 6 A).

La intensidad de inmunomarcación de 3 $\beta$ -HSD fue mayor a los 90 PD en los animales tratados frente a los controles ( $P = 0,03$ ), sin embargo no se observaron diferencias en el resto de las etapas de muestreo entre tratados y controles. En animales tratados se detectó una mayor intensidad de inmunomarcación de 3 $\beta$ -HSD a los 90 PD en comparación con los animales tratados a los 121DG ( $P = 0,04$ ), 132 DG ( $P=0,04$ ) y 45 PD ( $P=0,03$ ). En los animales controles no se observaron cambios en la intensidad durante desarrollo pre y posnatal (Figura 6 B).

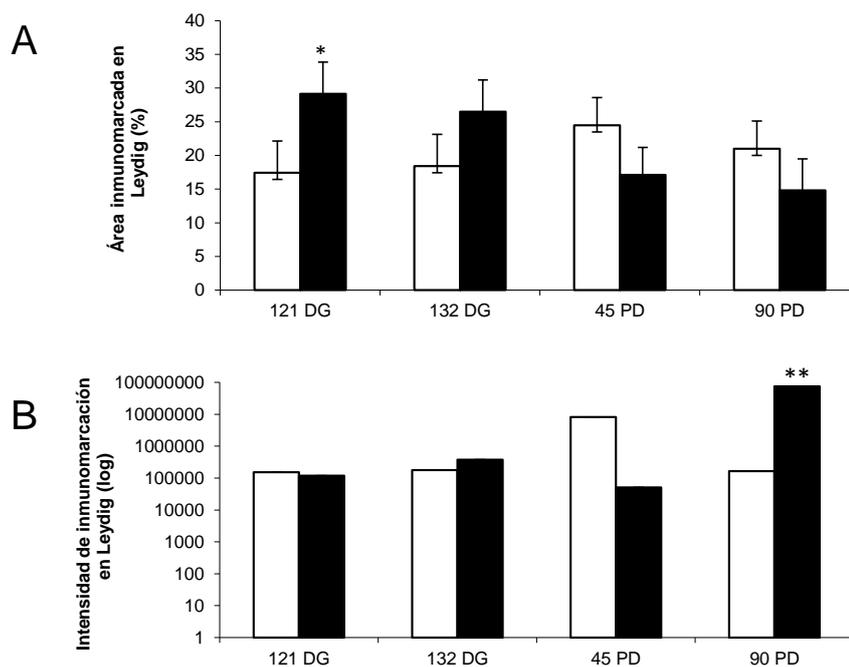


Figura 6. Efectos de los glucocorticoides *in utero* sobre la expresión de la enzima 3 $\beta$ -HSD en células de Leydig durante el desarrollo testicular pre y posnatal en ovinos. A- Área inmunomarcada en Leydig, B- intensidad de inmunomarcación en Leydig. Animales pertenecientes al grupo control (barras blancas), animales pertenecientes al grupo tratado (barras negras) a los 121 y 132 días de gestación (DG), 45 y 90 días posparto (PD). Los asteriscos indican diferencias entre grupos (\*  $P = 0.09$  , \*\*  $P < 0.05$ ).

### 6.3 Resultados de inmunoexpresión de la enzima $3\beta$ -HSD en cordones sexuales/túbulos seminíferos.

En cuanto al % de área inmunomarcada en cordones sexuales/túbulos seminíferos, no se apreciaron diferencias entre controles y tratados a lo largo del desarrollo pre y posnatal. Entre los animales tratados no se observaron diferencias en el % de área inmunomarcada en cordones sexuales/túbulos seminíferos. Sin embargo, en los controles se observó un aumento del % de área inmunomarcada en cordones sexuales/túbulos seminíferos, a los 90 PD ( $P=0,07$ ) comparado con los 121 DG (Figura 7 A).

La intensidad de inmunomarcación para la enzima  $3\beta$ -HSD en cordones sexuales/túbulos seminíferos, disminuyó en los animales tratados a los 90 PD en comparación con los animales controles ( $P=0.006$ ). Entre los animales tratados no se observaron diferencias en la intensidad de inmunomarcación en cordones sexuales/túbulos seminíferos. Sin embargo, en los controles se observó un aumento de la intensidad de inmunomarcación para la enzima  $3\beta$ HSD en cordones sexuales/túbulos seminíferos, a los 90 PD ( $P=0,07$ ) comparado con los 121 DG ( $P < 0,0001$ ) , 132 DG ( $P=0,0001$ ), 45 PD ( $P=0,002$ ) (Figura 7 B).

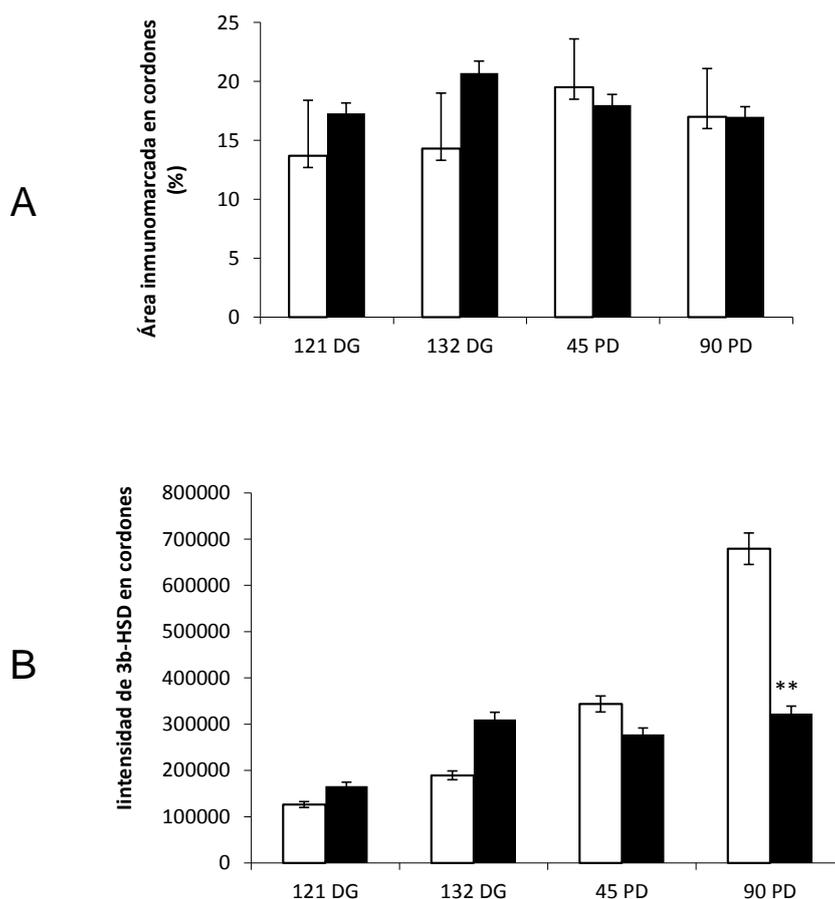


Figura 7. Efectos de los glucocorticoides *in útero* sobre la expresión de la enzima  $3\beta$ -HSD en cordones sexuales durante el desarrollo testicular pre y postnatal en ovinos. A- Área inmunomarcada en cordones, B- intensidad de inmunomarcación en cordones. Animales pertenecientes al grupo control (barras blancas), animales pertenecientes al grupo tratado (barras negras) a los 121 y 132 días de gestación (DG), 45 y 90 días posparto (PD). Los asteriscos indican diferencias entre grupos (\*\*  $P < 0.05$ ).

## 7. DISCUSIÓN

El patrón de expresión que presentó la enzima  $3\beta$ -HSD a lo largo de nuestro estudio fue regulado por la administración de glucocorticoides aumentando su expresión en etapas del desarrollo testicular prenatal para luego disminuir su expresión en estadios posteriores al nacimiento y previos a la pubertad.

Se observa un efecto bifásico de los glucocorticoides sobre la expresión de dicha enzima, con una regulación positiva de la expresión  $3\beta$ -HSD en etapas prenatales y una regulación negativa hacia los 90 días posparto. Esto concuerda con lo expresado por Tilbrook y col (2000) donde menciona que diferentes estresores pueden estimular diversos sistemas, siendo algunos inhibitorios y otros estimulatorios con respecto a la reproducción.

Esto puede deberse a los efectos de los glucocorticoides sobre el tejido testicular fetal activando y acelerando los sistemas metabólicos y enzimáticos de células de Leydig y Sertoli produciendo una regulación positiva en etapas prenatales para luego producir un efecto inhibitorio en estadios posnatales.

El aumento de la expresión de la enzima  $3\beta$ -HSD en estadios prenatales registrado en nuestro trabajo coincide con estudios en fetos de ratas. En dicho trabajo experimental los fetos fueron extraídos de ratas madres expuestas a estrés desde los 14 a los 21 días de gestación con niveles altos de corticosterona, presentaron niveles de testosterona primero aumentados al día 17 de gestación para luego disminuir y no generarse el pico normal de testosterona. En cambio, en los machos controles sí se produjo el pico normal de testosterona entre el día 17 y 19 de gestación (Ward y Weisz, 1980). Esto indicaría que la exposición al estrés con niveles elevados de corticosterona genera una regulación positiva y negativa sobre la síntesis de testosterona, similar a lo ocurrido en nuestro trabajo.

Otros estudios *in vitro*, en cultivo celulares utilizando células de Leydig de ratas adultas mostraron una inhibición de la  $3\beta$ -HSD por el agregado de dexametasona (Aguilar y col., 1992). Por lo tanto el presente estudio es el primer trabajo cuantitativo que describe mediante la inmunohistoquímica la dinámica de cambios en el parénquima testicular y específicamente en la expresión de la enzima  $3\beta$ -HSD en células de Leydig y en Sertoli luego de la administración por glucocorticoides.

En cuanto al aumento de la intensidad de inmunomarcación en animales tratados con betametasona en la etapa posnatal tardía (90 PD), conjuntamente con una disminución del área inmunomarcada en células de Leydig, se puede explicar que este provocado por un mecanismo compensatorio celular de la producción androgénica mediante el aumento de su maquinaria enzimática.

En animales controles, el aumento progresivo a lo largo del desarrollo testicular tanto en el área inmunomarcada e intensidad de  $3\beta$ -HSD en cordones sexuales/túbulos seminíferos se explica por el desarrollo morfológico y funcional de células de Sertoli y células germinales que exhiben un aumento de la capacidad esteroidogénica. Esto concuerda con lo expresado por Stocco y McPhaul (2006) donde se menciona que las células de Sertoli tienen capacidad para sintetizar hormonas esteroideas. Es por esto que el tratamiento con betametasona afecta la expresión de la enzima  $3\beta$ -HSD y por ende la producción de hormonas esteroideas esenciales para el desarrollo reproductivo de éstos animales.

El eje hipotálamo hipofisario gonadal en ovinos es relativamente quiescente en los últimos 14 días de gestación pero es activado 72 horas posteriores al nacimiento (Savoie y col., 1981). En futuros estudios sería interesante analizar dicho período del parto para detectar si se producen cambios en la expresión de  $3\beta$ -HSD en animales controles y tratados.

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos brindaron información esencial para comprender los mecanismos histofisiológicos que determinan el futuro reproductivo específicamente en la esteroidogénesis posnatal de los ovinos que durante su vida fetal recibieron glucocorticoides.

En conclusión los resultados obtenidos indican que la administración prenatal de altos niveles de glucocorticoides median la disminución de la inmunoexpresión de células de Leydig de una enzima determinante de la esteroidogénesis, sin embargo la intensidad de inmunoexpresión aumenta. Por lo tanto se requieren nuevos estudios para confirmar si la capacidad esteroidogénica potencial es afectada por la administración *in utero* de glucocorticoides. Se sugiere que los glucocorticoides podrían comprometer el potencial secretor de testosterona mediado por cambios en la expresión de enzimas esteroidogénicas en la célula de Leydig y por ende afectar el futuro reproductivo en la vida adulta.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott, D.; Zhou, R.; Bird, I.; Dumesic, D.; Conley, A. (2008) Fetal programming of adrenal androgen excess: lessons from a nonhuman primate model of polycystic ovary syndrome. *Endocr Dev*; 13:145–158.
2. Agular, B.; Vinggaard, A.; Vind, C. (1992) Regulation by dexamethasone of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in adult rat Leydig cells. *Steroid Biochem Mol Biol*; 43(6):565-71.
3. Badrinarayanan, S.; Rengarajan, P.; Nithya, P.; Balasubramanian, K. (2006) Corticosterone impairs the mRNA expression and activity of 3beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in adult rat Leydig cells. *Biochem Mol Biol*; 84(5):745-754.
4. Baillie, A.; Ferguson, M.; Hart, D. (1966) *Developments in Steroid Histochemistry*. New York, Academic Press, 186 p.
5. Bambino, T.; Hsueh, A. (1981). Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro. *Endocrinology*; 108(6):2142-2148.
6. Benešová, O.; Pavlik, A. (1989). Perinatal treatment with glucocorticoids and the risk of maldevelopment of the brain. *Neuropharmacology*; 28:89-97.
7. Bilinska, B. (1994) Staining with ANS fluorescent dye reveals distribution of mitochondria and lipid droplets in cultured Leydig cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica*; 32(1):21-24.
8. Bilinska, B. (1983) Effect of in vitro administration of LH, prolactin separately and LH and prolactin in mixture, on cultured Leydig cells from mouse testes: Changes of  $\Delta 5,3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase during postnatal life. *Folia Histochemica et Cytochemica*; 21(1):23-32.
9. Bilinska, B. (1979) Histochemical demonstration of  $\Delta 5, 3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in cultured Leydig cells under the influence of gonadotropic hormones and testosterone. *Inter J Androl*; 2(1-6):385-394.
10. Bishop, E. (1981). Acceleration of fetal pulmonary maturity. *Obstet Gynecol*; 58(5):48S-51S.
11. Braun, T.; Li, S.; Sloboda, D.; Li, W.; Audette, M.; Moss, T.; Matthews, S.; Polglase, G.; Nitsos, I.; Newnham, J.; Challis, J. (2009) Effects of Maternal Dexamethasone Treatment in Early Pregnancy on Pituitary-Adrenal Axis in Fetal Sheep. *Endocrinology*; 150(12):5466-77.
12. Ceda, G.; Davis, R.; Hoffman, A. (1987) Glucocorticoid modulation of growth hormone secretion in vitro. Evidence for a biphasic effect on GH-releasing hormone mediated release. *Acta Endocrinol*; 114:465-469.

13. Charmandari, E.; Chrousos, G. (2004) Glucocorticoids, Overview. En: Martini, Encyclopedia of Endocrine Diseases. San Diego, Elsevier, p.253-259.
14. Clark, B.; Wells, J.; King, S.; Stocco, D. (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells: characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem*; 269(45):28314-28322.
15. Conley, A.; Corbin, C.; Hinshelwood, M.; Liu, Z.; Simpson, E.; Ford, J.; Harada, N. (1996) Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. *Biol Reprod*; 54:497-505.
16. De Rooij, D.; Russell, L. (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl*; 21(6):776-798.
17. Dodic, M.; May, C.; Wintour, E.; Coghlan, J. (1998). An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. *Clin Sci*; 94:149-155.
18. Drake, A.; Tang, J.; Nyirenda, M. (2007). Mechanisms underlying the role of glucocorticoids in the early life programming of adult disease. *Clin Sci*; 232(113):219-232.
19. Dyce, K.; Sack, W.; Wensing, C. (2007) *Anatomía Veterinaria*. 3a. ed Ed. Mexico D.F, Ed. Manual Moderno, 938 p.
20. Fawcett, D. (1973). Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 9: 500–532.
21. Feltus, F.; Cote, S.; Simard, J.; Gingras, S.; Kovacs, W.; Nicholson, W.; Clark, B.; Melner, M. (2002). Glucocorticoids enhance activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase gene. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 82(1):55-63.
22. Gao, H-B; Tong, M; Hu, Y; Guo, Q; Ge, R & Hardy, M. (2003). Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells. *Endocrinology*; 143(1):130-138.
23. García Sacristan, A. (1998) *Fisiología veterinaria*. 2da reimpression. España, McGraw-Hill, 1074 p.
24. Gartner, L.; Hiatt, J. (2008) *Texto Atlas de Histología*, 3ª.ed. Baltimore, Ed. McGraw-Hill Interamericana, 574p.
25. Ge, R.; Hardy, D.; Catterall, J.; Hardy, M. (1997) Developmental Changes in Glucocorticoid Receptor and 11B-Hydroxysteroid Dehydrogenase Oxidative and Reductive Activities in Rat Leydig Cells. *Endocrinology*; 138(12):5089-5095.
26. Goodman, L. (1996). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9a ed. New

York, McGraw-Hill, 1905 p.

27. Guraya, S. (1998) Cellular and Molecular Biology of Gonadal Development and Maturation in Mammals: Fundamentals and Biomedical Implications. New Delhi, Narosa, 346 p.
28. Haider G. (2004) Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol*; 233:181-241.
29. Hanson M. (2002) Birth Weight and the Fetal Origins of Adult Disease. *Pediatr Res*; 52:473-474.
30. Hardy, M.; Gao, H.; Dong, Q.; Ge, R.; Wang, Q.; Chai, W.; Feng, X.; Sottas, C. (2005) Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res*; 322:147-153.
31. Hardy, M.; Sottas, C.; Ge, R.; McKittrick, C.; Tamashiro, K.; McEwen, B.; Haider, S.; Markham, C.; Blanchard, R.; Blanchard, D.; Sakai, R. (2002) Trends of reproductive hormones in male rats during psychosocial stress: role of glucocorticoid metabolism in behavioral dominance. *Biol Reprod*; 67(6):1750-1755.
32. Hejmej, A.; Kotula-Balak, M.; Galas, J.; Bilinska, B. (2011b) Effects of 4-tert-octylphenol on the testes and seminal vesicles in adult male bank voles. *Reproductive Toxicology*; 31(1):95-105.
33. Hochereau-de Reviers, M.; Perreau, C.; Pisselet, C.; Locatelli, A.; Bosc, M. (1995) Ontogenesis of somatic and germ cells in sheep fetal testis. *J Reprod Fertil*; 103:41-46.
34. Hutson, J. (1989) Leydig cells do not have Fc receptors. *J Androl*; 10(2):159-165.
35. Ikegami, M.; Jobe, A.; Newnham, J.; Polk, D.; Willet, K.; Sly, P. (1997) Repetitive prenatal glucocorticoids improve lung function and decrease growth in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med*; 156:178-184.
36. Johnson, L.; Grumbles, J.; Chastain, S.; Goss, H.; Petty, C. (1990) Leydig cell cytoplasmic content is related to daily sperm production in men. *J. Androl*; 11:155-160.
37. Kapoor, A.; Petropoulos, S.; Matthews, S. (2008) Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. *Res Rev*; 57:586-595.
38. Kerr, J.; Loveland, K.; O`Bryan, M.; de Krester, D. (2006) Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. En: Knobill and neill's. *Physiology of reproduction*. 3a San Diego, Elsevier, Volumen 1, pp 827-947.
39. Kotsampasi, B.; Balaskas, C.; Papadomichelakis, G.; Chadio, S. (2009) Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Anim Reprod Sci*; 114:135-47. doi:

40. Kotula-Balak, M.; Hejmej, A.; Bilińska, B. (2012) Hydroxysteroid Dehydrogenases – Localization, Function and Regulation in the Testis. Intech Chapter <http://dx.doi.org/10.5772/47740;11:265-288>.
41. Langley-Evans, S. (2006) Developmental programming of health and disease. *Proc Nutr Soc*; 65(1):97-105.
42. Lawson, K.; Meneses, J.; Pedersen, R. (1992) Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*; 113(3):891-911.
43. Lee, V.; Cumming, I.; De Kretser, D.; Findlay, J.; Hudson, B.; Keogh, E. (1976) Regulation of gonadotrophin secretion in rams from birth to sexual maturity. *J Reprod Fertil*; 46:1-6.
44. McDonald, L. (1991) *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4ta ed. México. McGraw-Hill, 551 p.
45. Mendis-Handagama, S.; Ariyaratne, H. (2001) Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod*; 65(3):660-671.
46. Miller, L.; Sutherland, A.; Supramaniam, V.; Walker, D.; Graham, J.; Wallace, E. (2012) Antenatal glucocorticoids reduce growth in appropriately grown and growth-restricted ovine fetuses in a sex-specific manner. *Reprod Fertil Dev*; 24:753-758.
47. Monet-Kuntz, C.; Hochereau-de Reviers, M.; Terqui, M. (1984) Variations in testicular androgen receptors and histology of the lamb testis from birth to puberty. *J Reprod Fertil*; 96(2):203-210
48. Natesampillai, S.; Kerkvliet, J.; Leung, P.; Veldhuis, J. (2008) Regulation of Kruppel-like factor 4, 9, and 13 genes and the steroidogenic genes LDLR, StAR, and CYP11A in ovarian granulosa cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 294(2):385-391.
49. Orth, J.; Weisz, J. (1980) Development of  $\Delta^5$   $3\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity in Leydig Cells of the Fetal Rat Testis: A Quantitative Cytochemical Study. *Biol Reprod*; 22:1201.
50. O'Regan, D.; Kenyon, C. (2004) Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am J Physiology Endocrinol Metab*; 287:863-870.
51. Orr, E.; Mann, D. (1992) Role of glucocorticoids in the stress-induced suppression of testicular steroidogenesis in adult male rats. *Horm Behav*; 26:350-363.
52. Page, K.; Sottas, C.; Hardy, M. (2001) Prenatal Exposure to Dexamethasone

Alters Leydig Cell Steroidogenic Capacity in Immature and Adult Rats. *J Androl*; 22:973-980.

53. Parker, K.; Schimmer, B. (2006) Embryology and Genetics of the Mammalian Gonads and Ducts. En: Knobil and Neill's. *Physiology of Reproduction*. 3a ed, San Diego, Elseiver, Volumen 1, pp.313-336.
54. Payne, A.; Hales, D. (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine reviews*; 25(6):947-970.
55. Payne, A.; Youngblood, G. (1995) Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod*; 52(2):217-225.
56. Pedrana, G.; Viotti, H.; Souza, E.; Sloboda, D.; Martin, G.; Cavestany, D.; Ortega, H (2013). Apoptosis-related protein expression during pre- and post-natal testicular development after administration of glucocorticoid in utero in the sheep. *Reproduction in Domestic Animals*; 48(5):795-802.
57. Poore, K.; Hollis, L.; Murray, R.; Warlow, A.; Brewin, A.; Fulford, L.; Cleal, J., Lillycrop, K.; Burdge, G.; Hanson, M.; Green, L. (2014) Differential Pathways to Adult Metabolic Dysfunction following Poor Nutrition at Two Critical Developmental Periods in Sheep. *PLoS ONE* 9(3);e90994:1-13.
58. Quirke, L.; Juengel, J.; Tisdall, D.; Lun, Heath, D.; McNatty, K. (2001) Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. *Biol Reprod*; 65:216-28.
59. Rabadán-Diehl, C.; Nathanielsz, P. (2013) From Mice to Men: research models of developmental programming. *J Dev Orig Health Dis*; 4(1):3-9.
60. Recabarren, S.; Sir-Petermann, T.; Maliqueo, M.; Lobos, A., Rojas-García. (2006) La exposición prenatal a andrógenos como factor de reprogramación fetal. *Rev Méd Chile*; 134(1):101-108.
61. Rhind, S. (2004) Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. *Anim. Reprod. Sci*; 82(83):169–181.
62. Risbridger, G.; Skinner, M. (1992) Evaluation of the effect of peritubular cell secretions and the testicular paracrine factor P-Mod-S on Leydig cell steroidogenesis and immunoreactive inhibin production. *Int J Androl*; 15(1):73-83.
63. Samuels, L.; Helmreich, M.; Lasuter, M.; Reinch, H. (1951) An enzyme in endocrine tissue which oxidizes delta 5-3 hydroxy steroids to alfa, beta unsaturated ketones. *Science*; 113:490-491.
64. Sapsford, C. (1964) Changes in the size of germ cell nuclei during the development of the testis of the ram and rat. *Aust J Zool*; 12:127-149.
65. Sapsford, C. (1962) The development of the testis of the Merino ram, with special reference to the origin of the adult stem cells. *Aust J Agric Res*;

13(3):487-505.

66. Savoie, S.; Bourel, B.; Hamel, R.; Buithieu, M.; Jequier, J.; Bertrand, J.; Ducharme, J. (1981) Circulating LH, FSH, Prolactin, Testosterone, 4-Androstenedione, Dehydroepiandrosterone Sulfate and Cortisol Levels in the Fetus in Late Gestation and in Newborn Male and Female Lambs. *Horm Res Pediatr*; 15(2):122-132.
67. Schoneveld, O.; Cidowski, J. (2007) Glucocorticoids and Immunity: Mechanisms of Regulation .En: Ader, R. *Psychoneuroimmunology*. 4a ed San Diego, Elsevier, pp. 45–61.
68. Seckl, J. (2001) Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. *Mol Cell Endocrinol*; 185(1-2): 61-71.
69. Seckl J. (2007). Glucocorticoids, developmental “programming” and the risk of affective dysfunction. *Prog Brain Res*; 167:17-34.
70. Silva, E.; Queiróz, D.; Honda, L.; Avellar, M. (2010) Glucocorticoid receptor in the rat epididymis: Expression, cellular distribution and regulation by steroid hormones. *Mol Cell Endocrinol*; 325(1-2):64-67.
71. Simard, J.; Durocher, F.; Mébarki, F.; Turgeon, C.; Sanchez, R.; Labrie, Y.; ouet, J.; Trudel, C.; Rhéaume, E.; Morel, Y.; Luu-The, V.; Labrie, F. (2005) Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev*; 150(4):525–582.
72. Sloboda, D.; Moss, T.; Gurrin, L.; Newnham, J. (2002) The effect of prenatal betamethasone administration on postnatal ovine hypothalamic – pituitary – adrenal function. *J Endocrinol*; 172: 71-81.
73. Sprando, L.; Zirkin, B. (1997) Is Leydig Cell Steroidogenic Function Affected by the Germ Cell Content of the Seminiferous Tubules? *Andrology*; 18:424-430.
74. Squires, E. (2006) *Endocrinología animal aplicada*. Zaragoza, Acribia, 265p.
75. Stocco, D.; McPhaul, M. (2006). Physiology of testicular steroidogenesis. En: Knobil and neill’s. *Physiology of reproduction*. 3era San Diego, Ed. Elsevier, Volumen 1, pp 977-1016.
76. Stocco, D. (2001). StAR Protein and the Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis. *Physiology*; 63:193-213.
77. Sweeney, T.; Saunders, P.; Millar, M.; Brooks, A. (1997) Ontogeny of anti-müllerian hormone, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and androgen receptor expression during ovine total gonadal development. *J Endocrinol*; 153(1):27-32.
78. Teerds, K.; Rijntjes, E.; Veldhuizen-Tsoerkan, M.; Rommerts, F.; de Boer-Brouwer, M. (2007) The development of rat Leydig cell progenitors in vitro: how essentialis luteinising hormone? *J Endocrinol*; 194(3):579-593.

- 79.** Tilbrook, A.; Canny, B.; Serapiglia, M.; Amobres, T.; Clatke, I. (1999) Suppression of the secretion of luteinizing hormone due to isolation/restraint stress in gonadectomized rams and ewes is influenced by sex steroids. *J Endocrinol*; 160:469-481.
- 80.** Ward, L., Weisz, J. (1980) Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science*; 207(4428):328-329.
- 81.** Welsh, T., Bambino, T.; Hsueh, A. (1982) Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis in vitro. *Biol Reprod*; 27(5):1138-1146.
- 82.** Williams, P.; Warwick, R. (1985) *Gray Anatomía*, 36a. ed. Barcelona, Salvat, pp .1597-1602.
- 83.** Wrobel, K.; Dellman, H. (1993) Sistema reproductor masculino. En Dellmann, H. *Histología Veterinaria*. 2ª ed .Zaragoza, Acribia, pp.245-266.
- 84.** Xiao, Y.; Huang, Y.; Hardy, D.; Li, X.; Ge, R. (2010) Glucocorticoid suppresses steroidogenesis in rat progenitor Leydig cells. *Andrology*; 31(4):365-371.
- 85.** Zambrano, E.; Guzmán, C.; Rodríguez, G.; Durand, M. (2014) Fetal programming of sexual development and reproductive function. *Mol Cell Endocrinol*; 382:538-549.