

I.-Introducción

1.- La oveja como modelo animal de investigación en reproducción

La gran mayoría de los trabajos científicos biomédicos se realizan en animales de laboratorio, utilizando especialmente como modelo animal a la rata o el ratón por las ventajas que ofrece su manejo más sencillo y su ciclo reproductivo y vital corto. Las crías de estas especies son consideradas “altriciales” por nacer muy inmaduras, prácticamente ciegas, sin los conductos auditivos abiertos, sin pelo y con una movilidad y desarrollo muy limitado. En cambio, las crías de las especies denominadas “precociales” nacen con un grado de desarrollo y maduración mayor. La oveja se encuentra entre las especies consideradas precociales al igual que el perro, el conejo y el humano entre otras.

Esta diferencia entre especies (altriciales vs. precociales) hace que resulte cuestionable, en algunos casos, la extrapolación de resultados experimentales entre unas y otras, especialmente si se estudia la influencia de la exposición a un químico en un momento determinado del desarrollo de un órgano, por ejemplo el ovario. Esta es una de las razones por la que decidimos utilizar a la oveja como modelo animal en nuestros experimentos.

La oveja (*Ovis aries*) es un mamífero rumiante. Es un animal dócil por naturaleza. Un ejemplar adulto presenta un tamaño relativamente grande (30 a 80 kg según la raza y sexo) lo que facilita su manipulación quirúrgica (Scheerlinck y col., 2008). Tiene una vida media larga (aproximadamente 15 años) y en la hembra, el período de gestación dura 145 días. En la anatomía y fisiología de su aparato reproductor se asemeja más a la mujer que a los roedores.

El feto ovino muestra una secuencia y un tiempo de desarrollo ovárico similar al observado en el humano (Pryse-Davies y Dewhurst, 1971; Juengel y col., 2002; Sawyer y col., 2002; De Felice y col., 2005). A diferencia de los roedores, el ovario fetal ovino sintetiza estrógenos (Eg) que cumplen un rol importante en el desarrollo de las células germinales (Pannetier y col., 2006). Además, algunas especies de rumiantes son susceptibles de padecer, de forma natural, afecciones reproductivas similares a las de la mujer. Por estas y otras razones, la oveja es utilizada como uno de los modelos animales de elección para estudiar patologías reproductivas tales como el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) (Steckler y col., 2005; Padmanabhan y col., 2006). A este interés se le agrega la importancia que tienen los estudios en ovinos para mejorar aspectos de la producción animal de esta misma especie como la de otros rumiantes.

Históricamente, la oveja ha hecho grandes contribuciones al mejor conocimiento de la reproducción humana y veterinaria. A modo de ejemplo:

.- Del hipotálamo de la oveja se aisló y secuenció el Factor de Liberación de la hormona TSH (Hormona Estimulante de la Tiroides) y GnRH (Factor de Liberación de las Gonadotrofinas) (Schally y col., 1971) (Este descubrimiento le valió al autor el Premio Nobel de Medicina 1977).

.- Las Prostaglandinas fueron aisladas por primera vez en ovejas (Bergström, 1966) (Este descubrimiento le valió al autor el Premio Nobel de Medicina 1982).

.- El primer animal clonado a partir de una célula somática también fue una oveja (a quien llamaron Dolly) (Campbell y col., 1996).

Por todo lo expuesto, la oveja se ha propuesto como un modelo animal muy útil en investigación científica y, aunque limitan su utilización algunas barreras sobre todo de tipo económico, existe una importante corriente de opinión científica que promueve su uso en circunstancias en que las ventajas superen a los inconvenientes (De Las Heras Guillamón y Borderías Clau, 2010).

2.- Desarrollo ovárico prenatal

Los ovarios son las glándulas femeninas responsables de la producción cíclica de ovocitos (huevos) fertilizables y de mantener una producción adecuada de los esteroides sexuales: Eg y progesterona (P) (Hirshfield, 1991). Estas hormonas participan en numerosos procesos fisiológicos tales como el desarrollo y diferenciación del tracto genital, el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios y la libido, el transporte de ovocitos y espermatozoides al lugar de la fecundación, la migración de los embriones asegurando su exitosa implantación, el desarrollo del útero durante la gestación, etc. (Hirshfield, 1991; McDonald's, 2009). La síntesis y secreción de hormonas ováricas se encuentra regulada por el sistema neuroendócrino y controlada por un número importante de mecanismos de retroalimentación que operan en el eje hipotálamo-hipofiso-gonadal (McGee, 2000).

Los ovarios presentan cambios morfológicos significativos durante el desarrollo fetal y postnatal temprano que están controlados hormonalmente. En el ovario de las hembras mamíferas ocurren fisiológicamente pérdidas significativas en el número de células germinales durante la vida intrauterina y desde el nacimiento hasta la pubertad.

2.1.- Desarrollo embrionario del ovario en la oveja

El desarrollo embrionario de los ovarios comienza alrededor del día 23 de gestación (duración de la gestación= 145 días) en las crestas genitales que se encuentran en proximidad de los riñones en formación. En este lugar se cumplen numerosos eventos celulares, tales como la migración de las células germinales primordiales, la masiva colonización del ovario fetal con células mesonéfricas precursoras de las células foliculares, la diferenciación sexual de las gónadas, la mitosis y apoptosis de las células germinales (McNatty y col., 1995).

En esta especie, desde la mitad de la gestación y hasta el nacimiento, la cantidad de células germinales disminuye unas 10 veces. De esta forma, la población de ovogonias en el ovario fetal de la oveja es originalmente de alrededor de 900.000 y para el nacimiento se ha reducido a alrededor de 100.000 (Fortune, 2003). La pérdida prenatal de células germinales parece ser un mecanismo universal de selección en todos los vertebrados estudiados que se produce mediante apoptosis (Aerts y Bols, 2009).

2.1.1.- Origen de los ovocitos en la oveja

Como en todas las hembras de mamíferos, los ovocitos se originan a partir de un grupo de células epiblasticas no alineadas que durante la gastrulación se diferencian en Células Germinales Primitivas (CGPs) (Gilbert, 2000). Estas células se desplazan hasta el endodermo del saco vitelino, proliferando y migrando a través de este saco y el endodermo del intestino primitivo hasta la porción caudal del embrión. Finalmente llegan a las crestas genitales, formando los pliegues o primordios gonadales que están ubicados ventralmente a la región mesonéfrica (proceso que ocurre en el día 23 de gestación en la oveja). Si esta migración es por movimientos ameboideos de las células o si son empujadas por el crecimiento de los tejidos vecinos no está aún claramente definido (Freeman, 2003). Una vez que las CGPs llegan a las crestas genitales, inician un proceso de diferenciación en ovogonias (alrededor del día 55 de gestación) (McNatty y col., 1995), mostrando una elevada actividad mitótica (Picton y col., 1998). En un ovario en formación, la división mitótica de las CGPs resulta en la formación de grupos de ovogonias, relacionadas unas con otras por puentes citoplasmáticos intercelulares. Estas ovogonias se rodean de células somáticas derivadas del mesonefros formando nidos de células germinales (clusters), también llamados cordones corticales (Sawyer y col., 2002). Ya en los nidos, las ovogonias inician un proceso de replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) para más tarde iniciar la meiosis y convertirse en ovocitos.

Es así entonces que las ovogonias atraviesan por los subsecuentes estadios de la profase I de la meiosis I (preleptoteno, leptoteno, zigoteno y paquiteno) para quedar arrestados en diploteno hasta el momento de la ovulación. En este estadio temprano de la meiosis I, los ovocitos son extremadamente vulnerables y muchos de ellos degeneran. Aquellos ovocitos que sobrevivan dentro del folículo ovárico hasta la pubertad, se encontrarán en condiciones de alcanzar un grado tal de maduración y crecimiento que les permitirá responder al estímulo de la hormona luteinizante hipofisaria (LH) para completar su proceso meiótico y convertirse en una célula haploide (Sawyer y col., 2002).

Actualmente se considera que el ovocito es responsable de la organización folicular durante los procesos que conducen a la ovulación porque dirige el desarrollo del folículo (van der Hurk y Zhao, 2005; Binelli y Murphy, 2010). Se ha determinado que controla el desarrollo y la diferenciación de las células de la granulosa, aumenta la sensibilidad de éstas a las gonadotrofinas, estimula la diferenciación de las células de la teca, promueve la expansión del cumulus ooforus y la ruptura final de la pared folicular durante la ovulación. Por su parte, las células de la granulosa son indispensables para el crecimiento del ovocito, la meiosis y la maduración citoplasmática (van der Hurk y Zhao, 2005). Al alcanzar su umbral de tamaño, el ovocito suprime la capacidad de las células de la granulosa de promover su propio crecimiento (Matzuk y col., 2002). Esto último indica que el ovocito no sólo determina el crecimiento del folículo sino también, indirectamente, su propio crecimiento.

2.1.2.- Foliculogénesis

Generalidades

Se llama folículo ovárico a la estructura formada por un ovocito rodeado por una o más capas de células somáticas. La foliculogénesis es el proceso mediante el cual los folículos ováricos inmaduros (primordiales) se desarrollan y se convierten en folículos preovulatorios (Oktem y Urman, 2010). Este proceso se inicia durante la vida embrionaria y continúa a lo largo de la vida reproductiva de la hembra; los folículos pasan por diferentes etapas de crecimiento y desarrollo, hasta que se produce la ovulación o entran en atresia (Picazo y López, 1995).

Durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano del ovario se cumplen dos procesos importantes (Driancourt, 2001; Skinner, 2005):

- 1.- el **ensamblado folicular** (formación de los folículos primordiales)

2.- la transición de folículos primordiales a folículos primarios
(reclutamiento inicial o **activación folicular**)

2.1.2.1.- Ensamblado folicular

La fase inicial de la foliculogénesis conocida como “**ensamblado**” está regulada por factores parácrinos de crecimiento e influenciada por concentraciones locales de hormonas esteroides. Durante la etapa prenatal, los ovocitos están dispuestos en grupos denominados “nidos o clusters”. Luego, dependiendo de la especie animal, el ensamblado ocurre durante la gestación (ej.: oveja, vaca, mujer) o luego del nacimiento (ej.: rata, ratón). Durante este proceso un grupo de ovocitos muere por apoptosis y los que sobreviven se rodean de una capa simple de células somáticas planas (células inmaduras de la granulosa o también llamada pregranulosa) formando los folículos primordiales (Kezele y Skinner, 2003). Los ovocitos que no completan el ensamblado permanecen en grupos de dos o más rodeados de una capa simple de células planas y se los conoce como folículos multiovulares (FMOs) (Figura 1).

Se considera que la población de folículos primordiales (reserva de folículos ováricos) se forma durante la vida fetal y neonatal y que, una vez establecida, esta población no prolifera. Sin embargo, hay algunos grupos de investigación que sostienen que hay formación de ovocitos a lo largo de la vida adulta de la hembra (Johnson y col., 2004). Apoyando esta observación se ha demostrado que, en reptiles, hay proliferación de células germinales en la gónada luego del nacimiento (Stoker y col., 2008). Para gran parte de la comunidad científica, desde el momento del nacimiento se establece la reserva de folículos primordiales que se convertirán en la fuente de gametas femeninas durante la vida reproductiva de la hembra (Fortune, 2003).

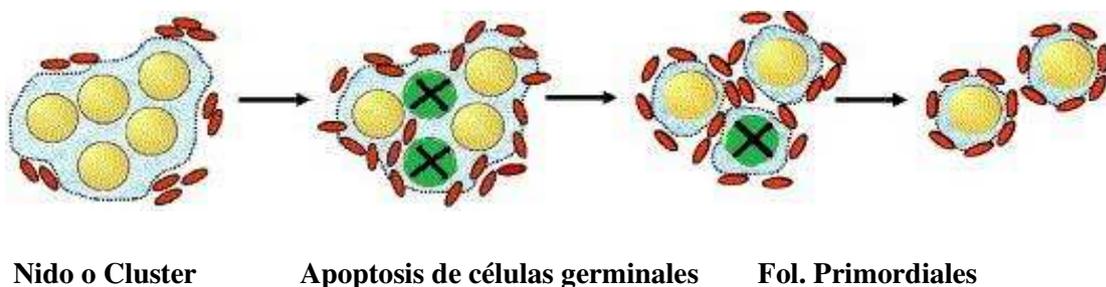


Figura 1: Proceso de ensamblado folicular. En verde se resaltan los ovocitos que mueren por apoptosis. En el extremo derecho del esquema se muestran los folículos primordiales formados, rodeados por las células de la pregranulosa. (Adaptado de Bristol-Gould y col., 2006).

En la oveja, el ensamblado comienza alrededor del día 75 de gestación (McNatty y col., 1995 y 2000; Hussein, 2005). Se cree que la supervivencia de un ovocito depende de la capacidad de ensamblarse para constituir un folículo primordial (Martins da Silva y col., 2004). Los factores endócrinos, que se presumen originados en el ovario, pueden influir en este proceso. Se ha demostrado que en él intervienen varios factores de crecimiento tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF), neurotrofinas, inhibinas, y el factor de diferenciación y crecimiento 9 (Growth differentiation factor 9) (Morrison y Marcinkiewicz, 2002, Dissen y col., 1995). En contraste con estos factores de crecimiento actúa la hormona antimülleriana (AMH) que ejerce un efecto inhibitorio sobre el desarrollo folicular temprano. Las hormonas esteroides también controlan la foliculogénesis. Se ha demostrado, en estudios in vivo e in vitro, que tanto la P como el 17β estradiol (E2) alteran el ensamblado folicular inhibiendo el proceso de apoptosis de ovocitos en la rata (Kezele y Skinner, 2003).

2.1.2.2.- Activación folicular

La transición de folículo primordial a primario o **activación** es un proceso irreversible e incluye la transformación de las células de la granulosa de planas a cuboides y se inicia alrededor del día 100 de gestación en la oveja (Figura 2).

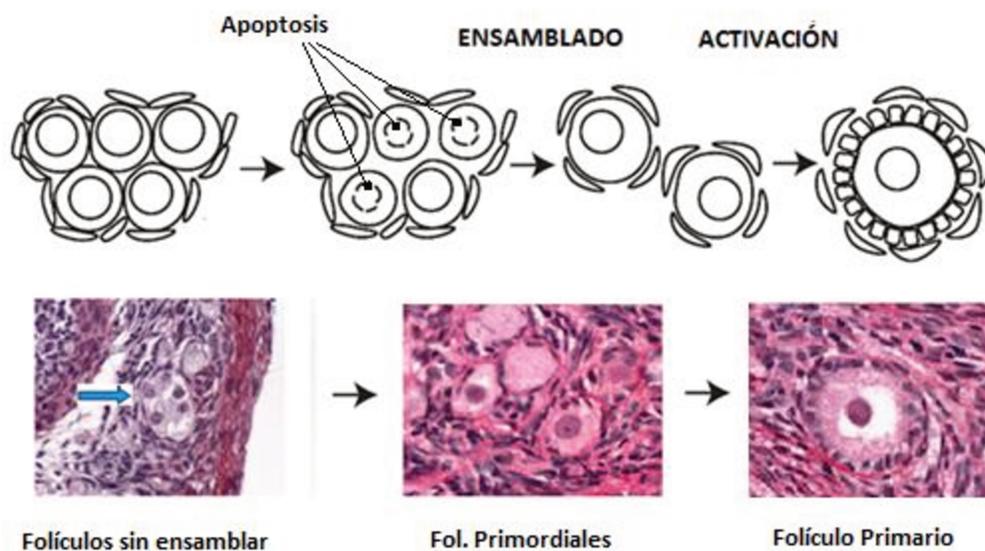


Figura 2: Proceso de ensamblado folicular y activación de folículos primordiales en la oveja. (La representación esquemática fue tomada y adaptada de Kezele y col., 2005).

La activación es un proceso complejo en la biología del ovario y poco se conoce acerca de su mecanismo de control. Esta fase incluye el crecimiento de algunos

folículos primordiales mientras que otros permanecen quiescentes por meses, años o décadas dependiendo de la especie (Hirshfield, 1991). De esta forma, los folículos primordiales que inicialmente se mantienen quiescentes son gradualmente reclutados a lo largo de la vida reproductiva de la hembra.

Los mecanismos de **ensamblado** y **activación** están regulados localmente por factores de crecimiento celular y hormonas esteroides (ej: P, Eg, andrógenos -A-) y son independientes de la acción de las gonadotrofinas hipofisarias (Hormona Folículo Estimulante –FSH- y LH) en todas las especies de mamíferos estudiadas (Driancourt, 2001). De modo que en esta etapa temprana, la foliculogénesis es estimulada por otros factores, muchos de los cuales son aún desconocidos (Fortune, 2002).

En la **Tabla 1** se describen algunas de las moléculas y los mecanismos que éstas controlan, asociadas con el desarrollo de folículos preantrales y de ovocitos.

Como resultado de una activación inapropiada, se han descrito ciertos desórdenes reproductivos (Skinner, 2005). Resulta entonces necesario el normal funcionamiento de los mecanismos que controlan el ensamblado y la activación folicular, tanto para establecer el inicio de la vida reproductiva de la hembra (ej: pubertad) como para determinar su finalización (ej: menopausia en la mujer). **Ensamblado** y **activación** están reconocidos como los momentos más importantes y críticos de la foliculogénesis y se especula que son los que van a afectar directamente la duración de la vida reproductiva de la hembra (Skinner, 2005).

Tabla 1: Factores que regulan el desarrollo de los folículos ováricos preantrales estudiados en diferentes especies (roedores, bovinos, ovinos, primates).

<u>Factor</u>	<u>Origen</u>	<u>Función</u>
Proteína c-kit	Células somáticas	Migración y proliferación de células germinales
BMP4 (Bone morphogenic protein) y BMP8b	Ectodermo extraembrionario	Generación de células germinales
Conexina 43	Ectodermo extraembrionario	Generación de células germinales
Figla o Fig a	Ovocito	Coordinación de genes estructurales que codifican la zona pelúcida
BMP15 (Bone morphogenic protein)	Ovocito	Diferenciación y proliferación celular (granulosa)

GDF 9 (Growth differentiation factor-9)	Ovocito	Diferenciación y proliferación celular (granulosa)
bFGF (Basic fibroblast growth factor)	Ovocito	Estimulación de mitosis y diferenciación a células de la granulosa
KL (Kit Ligand)	Células pregranulosa	Promoción de la transición folículo primordial-primario
LIF (Factor inhibidor de la leucemia)	Células pregranulosa	Promoción de la transición folículo primordial-primario
Insulina	Endocrino	Promoción de la transición fol. primordial-primario. Estimulación de la esteroidogénesis en células de la granulosa y teca
AMH (Hormona Antimulleriana)	Células de la granulosa	Inhibición del desarrollo de los folículos primordiales
AhR (Aryl hydrocarbon receptor)	Células de la granulosa	Regulación del tamaño del ovocito
CTGF (connective tissue growth factor)	Células de la granulosa	Mantenimiento del fenotipo celular y reclutamiento de la teca
Activina	Células de la granulosa	Proliferación celular y estimulación de la esteroidogénesis (granulosa)
KGF (Keratinocyte growth factor)	Células de la Teca	Proliferación celular y crecimiento folicular

(Adaptado de: Fortune, 2003; Skinner, 2005; Palma, 2008)

2.1.2.3.- Formación de folículos preantrales y antrales

Para el día 120 de desarrollo embrionario de la oveja, se verifica la presencia de folículos preantrales o secundarios caracterizados por contener varias capas de células de la granulosa; y a partir del día 135 empiezan a observarse folículos antrales o terciarios (McNatty y col., 1995). En este período el ovocito comienza a crecer en diámetro, la capa de células de la granulosa prolifera y se hace evidente la presencia de las células de la teca, que provienen de las células del estroma y constituyen la capa más externa de la estructura del folículo. Sin bien los folículos preantrales son sensibles a la FSH, en ausencia de ésta son capaces de seguir madurando hasta el estadio de folículo antral.

El folículo antral está caracterizado por la presencia de un espacio lleno de líquido (el antro). El líquido folicular es una fuente importante de sustancias reguladoras y moduladoras (esteroides, factores de crecimiento, enzimas, lipoproteínas) que se originan a partir de la sangre y de las secreciones de las células foliculares. Durante el período postnatal temprano pueden observarse en el ovario de la cordera, un número variable de folículos antrales (McNatty y col., 1995). Específicamente, a los 30 días de edad se observa un pico en el número de folículos antrales distribuidos por todo el ovario (Tassel y col., 1978).

Se ha estudiado la concentración de FSH en corderas desde el nacimiento y durante las primeras semanas de vida, sugiriendo que aquellas corderas de razas ovinas genéticamente más prolíficas tienen niveles séricos de la gonadotropina comparativamente más altos que las naturalmente menos prolíficas (Jorio y col., 1999). También se ha sugerido que existe una correlación positiva entre fertilidad y los niveles de FSH presentes en la etapa postnatal temprana (Bodin y col., 1988).

2.2.- Desarrollo ovárico postnatal: etapa prepuberal y pubertad

Se define a la etapa prepuberal como al período comprendido entre el nacimiento y la pubertad. Los ovarios de las corderas jóvenes incrementan su tamaño paulatinamente, dependiendo de la raza, presentando numerosos folículos activos de diferentes tamaños. Los folículos continúan su crecimiento a través de toda la vida o al menos hasta que la reserva se agota. Desde el nacimiento y hasta la pubertad las corderas no muestran conducta de estro ni ovulación, aunque se ha observado secreción pulsátil de LH en corderas de 11 semanas de edad y concentraciones crecientes de FSH desde las semanas 3 a 11 de vida (Foster y Karsch, 1975). Varios experimentos realizados en corderas han demostrado un número elevado de folículos antrales al nacimiento (Kennedy y col., 1974, Land, 1978). En observaciones realizadas cada 4 semanas (desde el nacimiento hasta las semana 24 y 33) se observó que el número de folículos antrales es alto y constante desde las 4-8 semanas de edad, y que luego disminuye manteniéndose relativamente estable hasta la primera ovulación en la pubertad (aproximadamente 180 días de edad) (Gonzalez-Bulnes y col., 2003, Kennedy y col., 1974). Desde el nacimiento y hasta la pubertad el número de folículos primordiales se reduce a un tercio debido a las ondas de crecimiento folicular que terminan en la atresia (Fortune, 2003).

En las corderas púberes, cuando los folículos antrales alcanzan un diámetro de aproximadamente 2 mm se vuelven sensibles y dependientes de las gonadotrofinas hipofisarias siendo reclutados para continuar su crecimiento bajo el estímulo de la FSH (Driancourt y col., 1993, Driancourt, 2001). Este proceso de desarrollo folicular, gobernado por las gonadotrofinas, tiene lugar en una forma organizada y cíclica siguiendo un patrón que se ha denominado de “ondas foliculares” (Montgomery y col., 2001). Se han descrito entre 2 y 4 ondas foliculares durante el ciclo estral de la oveja (Viñoles y Rubianes, 1998, Evans y col., 2000) que coinciden con el ritmo de secreción de FSH que se observa cada 5 a 6 días (Bister y Pasquay, 1983).

El número de folículos antrales reclutados en cada ciclo estral varía entre las especies (de 5 a 10 en la vaca y pequeños rumiantes, de 1 a 4 en la yegua y hasta más de 50 en la cerda) y para cada individuo. El efecto principal de la FSH es inducir la actividad de la enzima aromatasasa en las células de la granulosa (Saumande, 1990) lo que promueve la síntesis de Eg. De esta forma, un aumento de la actividad aromatasasa se asocia con el mecanismo de reclutamiento folicular (Driancourt, 2001).

La selección de folículos antrales durante el ciclo estral de la oveja se produce coincidentemente con una caída en los niveles de FSH y un aumento pulsátil de los niveles de LH (Driancourt, 2001). Dependiendo de la raza (hay razas que paren más de una cría), uno o más folículos antrales dominantes (folículo preovulatorio) continuará su desarrollo. Estos folículos dominantes producen altos niveles de E2 e inhibina y están potencialmente preparados para ovular. Cuando el folículo dominante en la oveja alcanza un diámetro de 4 mm comienza a expresar receptores para LH en las células de la granulosa (Driancourt, 2001). Bajo la influencia de LH y a pesar de la disminución de los niveles de FSH, el folículo dominante comienza a crecer alcanzando un tamaño de 5 a 7 mm. Durante la dominancia tiene lugar el crecimiento final y maduración del o de los folículos preovulatorios, en tanto que los demás folículos del grupo completan su regresión por atresia (Ko y col., 1991) (Figura 3). La existencia de dominancia folicular en la oveja ha sido motivo de estudio (Driancourt y col., 1985, López-Sebastian y col., 1997). La magnitud de la dominancia es medida por la diferencia de tamaño entre el folículo dominante y el folículo subordinado más grande. En la oveja, esta diferencia es de sólo 2 a 3 mm, por lo cual se considera que la dominancia en esta especie sería más débil que en otras (Driancourt, 2001). Durante el período de la dominancia del folículo antral, el ovocito está rodeado por un apretado número de células de la granulosa (cúmulo) formando lo que se conoce como Complejo Ovocito-Cúmulo (COC). El

ovocito permanece arrestado en el estadio de diploteno de la profase meiótica I. En el momento de la ovulación se termina la primera división meiótica y, cuando el ovocito es fertilizado por el espermatozoide, se completa la segunda fase de la división meiótica comenzando el desarrollo embrionario.



Figura 3: Representación esquemática de las principales fases del desarrollo folicular (Adaptado de Scaramuzzi y col., 1993).

2.3.- Hormonas esteroideas y receptores

Las hormonas esteroideas sexuales, a través de sus receptores específicos, cumplen un importante rol en la diferenciación y desarrollo del aparato reproductor, en la regulación de la función de los ovarios y en el mantenimiento de la fertilidad de la hembra (Drummond, 2006). En caso de falta o exceso de alguno de estos esteroideos (P, A y Eg) puede verse comprometida la función ovárica y consecuentemente, la fertilidad. Producidas a partir del colesterol, estas hormonas son sintetizadas en el ovario de un modo secuencial, en el cual una sirve de sustrato para la formación de la otra.

El modelo conocido como “dos células- dos gonadotrofinas” describe el papel de las células de la teca y de la granulosa del folículo ovárico en la formación de estos esteroideos, resaltando la necesaria cooperación entre estos dos tipos celulares para la síntesis de Eg (Figura 4).

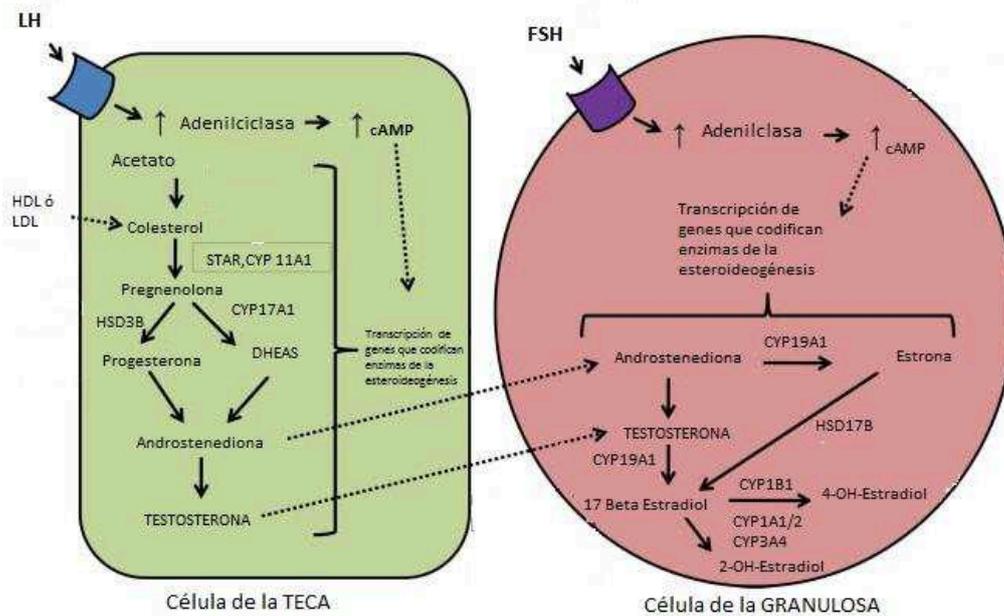


Figura 4: Esteroidogénesis ovárica: modelo de “dos células- dos gonadotrofinas”. Las células de la teca responden al estímulo de la LH incrementando la expresión de enzimas necesarias para la conversión de colesterol en A (androstenediona y testosterona). Las células de la granulosa responden al estímulo de la FSH aumentando la expresión de enzimas necesarias para la conversión de los A derivados de la teca en Eg (estradiol y estrona). (Adaptado de Craig y col., *Reproduction*, 2011). **Referencias:** (HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; CYP11A1, cytochrome P450 11A1 or cholesterol side-chain cleavage; HSD3B, 3b-hydroxysteroid dehydrogenase; CYP17A1, cytochrome P450 17A1 or 17a-hydroxylase, 17,20-desmolase; HSD17B, 17b-hydroxysteroid dehydrogenase; CYP19A1, cytochrome P450 19A1 or aromatase; CYP1B1, cytochrome P450 1B1; CYP1A1/2, cytochrome P450 A1 and A2; CYP3A4, cytochrome P450 3A4).

2.3.1.- Progesterona, andrógenos y estrógenos.

Progesterona. Es producida por las células de la teca y, en la hembra, es clave en el proceso de ovulación, implantación y en el mantenimiento de la gestación (Graham y Clarke, 1997). En cambio, el rol de la P sobre el desarrollo y crecimiento folicular es limitado. Si bien se ha informado su efecto sobre la función de las células de la granulosa, su acción parece estar más bien confinada a la ovulación. Consistentemente con esto último, se ha informado que ratones knock out para receptor de P no pueden ovular (Robker y col., 2000; Lydon y col., 1995).

Andrógenos. Los A (Androstenediona y Testosterona –T–), son producidos por las células de la teca en respuesta al estímulo de la LH (Figura 6). Los A actúan a través de sus **receptores** (RA) localizados en las células de la granulosa, células del estroma (Schreiber y Ross, 1976; Tetsuka, 1995), células de la teca en humanos (Horie y col., 1992), y ovocitos de rata, ratón y cerdo (Szoltys y Slomczynska, 2000; Gill y col., 2004). Los A actúan primordialmente sobre las células de la granulosa donde inician distintos procesos dependiendo del estadio de desarrollo del folículo y de la especie de

la que se trate. La expresión del RA es muy alta en las células de la granulosa de: folículos preantrales y antrales de ovarios de primates (Hillier y col., 1997), folículos pequeños preantrales y antrales tempranos de rata (Tetsuka, 1995), pequeños folículos antrales de cerdo (Slomczynska y col., 2001), desde folículo preantral a antral temprano en bovinos (Hampton y col., 2004) y folículo secundario y dominante en ovarios humanos (Horie y col., 1992). La expresión del RA puede estar influenciada por factores secretados por el ovocito. En los estadios tempranos de la foliculogénesis, los andrógenos promueven el desarrollo folicular. La administración de T a ovejas preñadas produce, en las crías, una disminución en el número de folículos primordiales y aumenta el número de folículos en otros estadios de desarrollo, indicando que la T estimula el reclutamiento folicular (Steckler y col., 2005). Uno de los roles más importantes que juegan los A en el ovario es su participación en la síntesis de Eg. Los A sirven de sustrato para la P450 aromatasa, que promueve su conversión a Eg (Tetsuka y Hillier, 1997). Dado entonces que la T puede ser aromatizada a Eg, muchas veces resulta difícil precisar si se trata de un efecto directo o indirecto de ella. Se ha descrito que la T administrada prenatalmente a monas Rhesus desarrolla grandes ovarios multifoliculares, semejantes a los que se encuentran en la mujer con el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) (Abbott y col., 1997).

Los A han mostrado que pueden impedir el desarrollo folicular, aumentando la atresia folicular en ratas prepúberes estimuladas con Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) (Conway y col., 1990) y en ratas prepúberes hipofisectomizadas tratadas con Eg (Hillier y Ross, 1979). También se ha demostrado que los A inhiben la expresión del receptor de LH estimulado por FSH en las células de la Granulosa (Nandedkar y Munshi, 1981) y que modulan la apoptosis de estas células (Weil y col., 1998). En humanos, el hiperandrogenismo es el signo clásico en la presentación de SOP (Erhmann y col., 1995).

Estrógenos. Son sintetizados por las células de la granulosa. La oveja produce altos niveles de Eg en los estadios tempranos de diferenciación ovárica que disminuyen o finalizan al momento de concretarse la meiosis para aumentar nuevamente cuando se forman los folículos ováricos (Byskov y col., 1988). Durante el desarrollo embrionario, los Eg están asociados a la formación de los cordones corticales ováricos (clusters) (Juengel y col., 2002).

La mayor capacidad de los folículos para producir Eg se hace evidente cuando alcanzan el estadio preantral tardío, momento en el que tienen todos los componentes del modelo “dos células-dos gonadotrofinas”. Aunque la actividad aromatasa está presente en los folículos antrales pequeños, la producción de Eg en este estadio de desarrollo es limitada por la incapacidad de producir suficientes A que actúen como sustrato para aromatizarse a Eg (Carson y col., 1981). El crecimiento del folículo más allá del estadio de antral pequeño está, por lo tanto, caracterizado por un incremento de la actividad aromatasa y la síntesis de A que culmina con la producción folicular de Eg. Es el folículo preovulatorio el que tiene el nivel intrafolicular más alto de Eg, principalmente debido al tamaño de su población de células de la granulosa y de su capacidad para la aromatización de A (Hillier, 1981).

En la pubertad, los Eg son los responsables de la libido, de la conducta de celo de la hembra y del mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios.

Se han descrito dos isoformas de receptores de Eg (RE): alfa ($RE\alpha$) y beta ($RE\beta$) (Green y col., 1986; Petersen y col., 1998), siendo la isoforma $RE\beta$ la predominante en el ovario (Byers y col., 1997; Drummond y col., 1999).

En los últimos años se ha identificado el rol individual de cada uno de estos receptores en la reproducción de la hembra: $RE\alpha$ participa en el mecanismo de la ovulación a través de un efecto vía eje hipotálamo-hipofisario mientras que $RE\beta$ estimula el crecimiento folicular, disminuye la atresia, induce la expresión de genes específicos y aumenta el número de ovocitos liberados luego de una ovulación inducida (Hegele-Hartung y col., 2004).

Resulta interesante señalar que los Eg son potentes agentes mitogénicos in vivo (Carson y col., 1989). Los Eg son asimismo responsables de facilitar la diferenciación de las células de la granulosa, incluyendo la inducción de la formación de los receptores de FSH, LH y prolactina (Richards y col., 1979).

Desde hace algunos años se producen líneas de ratones knock out para RE en un esfuerzo por conocer la acción de los Eg sobre el ovario. En esta especie, las hembras $KORE\alpha$ (Knock out para $RE\alpha$) son acíclicas, infértiles y presentan ovarios hiperémicos. Además, la foliculogénesis queda arrestada en estadio antral con la formación de grandes folículos quísticos y hemorrágicos (Couse y col., 1997). Las hembras $KORE\beta$ (Knock out para $RE\beta$) (Krege y col., 1998) presentan ovarios pequeños con un número aumentado de folículos primordiales y un número significativamente menor de folículos primarios, antrales pequeños y cuerpos lúteos. Asimismo, en estos animales, se

evidencia un incremento en la atresia de grandes folículos mientras que los niveles de gonadotrofinas son normales. Estos estudios indican que el RE β juega un rol esencial en la diferenciación de las células de la granulosa inducida por las gonadotrofinas. En su ausencia, la maduración folicular y el proceso ovulatorio se alteran. Resumiendo, podemos decir que ambos RE tienen un importante papel en el mantenimiento de la fertilidad, aunque el RE β aparece como esencial para el normal desarrollo y maduración folicular.

2.4.- Ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos en la vida de la célula que culmina con un aumento de su tamaño y la división en dos células hijas. La progresión de este ciclo está controlada por un grupo de proteínas conocidas como ciclinas y las enzimas asociadas a ellas que se llaman Kinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La actividad de los complejos ciclina-CDKs está regulada por los inhibidores de CDKs.

Mientras que las ciclinas activan a las CDKs, sus inhibidores (CDKI), de los que existen muchos, las silencian y ejercen un control negativo sobre el ciclo celular. La familia CIP/WAF de los CDKI, está compuesta por tres proteínas llamadas p21 (CDKN1A), p27 (CDKN1B) y p57 (CDKN1C), que inhiben en forma extensa a las CDKs (Figura 5).

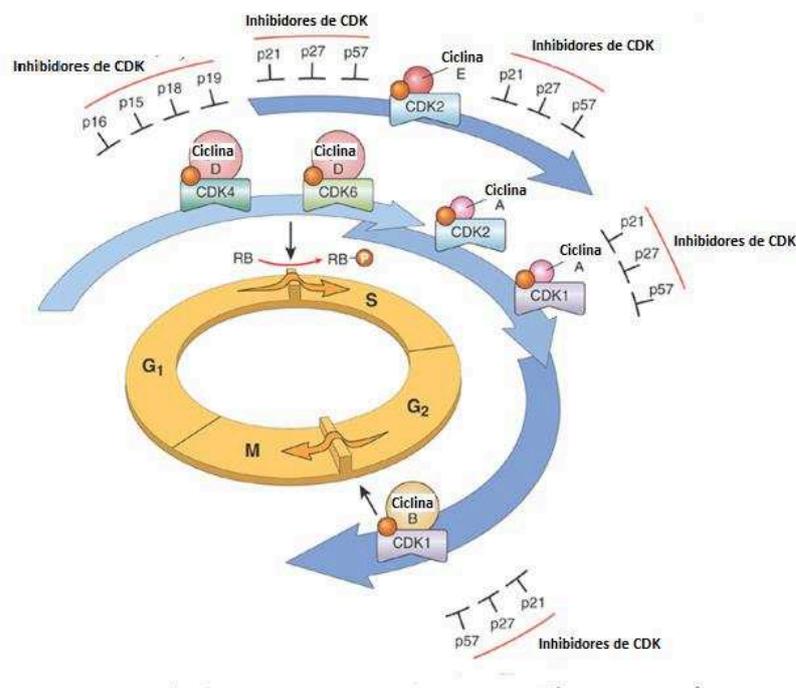


Figura 5: Ilustración esquemática de las ciclinas, las CDK y los inhibidores de CDK (CDKI) en la regulación del ciclo celular (Adaptado de Kumar y col., 2010).

2.4.1.- Marcadores asociados al ciclo celular

En la última década se ha producido un enorme avance en el conocimiento de los mecanismos de control de la proliferación celular en los que interviene un complejo engranaje de moléculas y vías interrelacionadas. Durante el desarrollo de esta tesis evaluamos la expresión de **Ki67** como marcador de proliferación celular. Esta proteína puede ser detectada en el núcleo de la célula durante la interfase del ciclo celular, mientras que durante la mitosis, se relocaliza mayormente en la superficie de los cromosomas. El hecho de que Ki67 esté presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, y mitosis) y ausente cuando la célula está en reposo (G0), lo transforma en un excelente marcador para determinar e identificar poblaciones celulares en división (Scholzen y Gerdes, 2000).

De los inhibidores de CDK, en esta tesis evaluamos la proteína p27. La principal función de p27 es inhibir la progresión del ciclo celular. Por esta razón se encuentran altos niveles de p27 en células en estado quiescente (Sherr y Roberts, 1999). La mayoría de los epitelios normales diferenciados, incluyendo los de la glándula mamaria, pulmón, próstata y el ovario expresan altos niveles de esta proteína en el núcleo de las células. Por el contrario, p27 es virtualmente inexistente en células en proliferación tales como las de la membrana basal de los epitelios.

Recientemente se ha demostrado que esta proteína es una molécula clave en la regulación del desarrollo ovárico en el ratón. En esta especie, p27 controla el desarrollo ovárico evitando el ensamblado y la activación folicular, también promueve la atresia de los folículos. En ratones deficientes para p27 (p27^(-/-)) el ensamblado folicular (que en esta especie se produce en el periodo postnatal temprano) está acelerado y el número de folículos ensamblados llega al doble que en los ratones controles (p27^(+/+)). Estos mismos autores encontraron que la pérdida de p27 induce atresia a través de la activación de las enzimas caspasa-9, 3 y 7 (Rajareddy y col., 2007).

3.-Perturbadores Endocrinos

3.1.- Generalidades

El término perturbador endocrino (PE) (endocrine disrupter) se acuñó en 1991, durante la Conferencia de Wingspread (Wisconsin, Estados Unidos), para hacer referencia a aquellas sustancias que tienen la capacidad de imitar o antagonizar a las hormonas endógenas. El primer trabajo publicado al respecto data de 1993, y a partir de

él comenzó a hacerse más evidente que la presencia de PE en el ambiente podía representar un riesgo para la salud humana y animal (Colborn y col., 1993).

Según la Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency – EPA-) de Estados Unidos se define a un PE como una **“sustancia o mezcla de sustancias exógenas que altera una o más funciones del sistema endócrino y en consecuencia causa efectos adversos en la salud de un organismo intacto, su progenie o subpoblaciones”** (USEPA,1997).

Los PEs pueden clasificarse en tres grupos: 1) químicos sintéticos utilizados en la industria (bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas, hexaclorobenceno, ftalatos, derivados fenólicos: nonilfenol, octilfenol, bisfenol A (BPA); y en agricultura (atrazina, diclorodifeniltricloroetanol (DDT) y sus derivados, endosulfan, parathion), 2) químicos sintéticos utilizados como drogas farmacológicas: etinilestradiol, tamoxifeno, dietilestilbestrol (DES); 3) químicos naturales presentes en vegetales utilizados como alimento por el hombre y los animales (fitoestrógenos) (Pocar y col., 2003).

El descubrimiento de la existencia de sustancias químicas en el ambiente con actividad agonista/antagonista de hormonas endógenas despertó el interés en conocer sus efectos sobre el desarrollo y la capacidad reproductiva en animales de la fauna silvestre, especies de interés zootécnico y seres humanos (Soto y Sonnenschein, 1996; National Research Council, 1999). Aunque todo el sistema endocrino puede verse implicado en esta alteración, la información disponible sobre la perturbación hormonal causada por químicos con actividad estrogénica (conocidos como xenoestrógenos) es, cualitativa y cuantitativamente, la más abundante (Soto y Sonnenschein, 1996).

Algunos PE que han sido asociados con efectos sobre el desarrollo y la reproducción imitan la actividad del Eg y se hipotetizó que estas sustancias podrían estar asociadas a varias patologías reproductivas como cáncer de mama (Davis y col., 1993), deficiencias y anomalías en la cuenta espermática, aumento de la incidencia de cáncer de próstata y testículo y otras disfunciones reproductivas en el macho (Sharpe y Skakkebaek, 1993; Sharpe y col., 1995).

La mayor parte de la evidencia actual sugiere que los mamíferos son más susceptibles a los PE durante la vida fetal y postnatal temprana que cuando son adultos (Bern, 1992; Markey y col., 2002). Esto podría deberse a una mayor susceptibilidad de las células del neonato durante los procesos de diferenciación, o a que los mecanismos endocrinos de retroalimentación y el sistema inmune no están aún completamente desarrollados, favoreciendo que se produzcan efectos adversos en el feto/neonato en

desarrollo (Crisp y col., 1998). Entre los PE más utilizados y estudiados podemos mencionar a dos xenoestrógenos sintéticos: el BPA y el DES. Actualmente existe consenso acerca de los riesgos de la exposición de fetos y neonatos a estos PE debido a la alta sensibilidad de los órganos en desarrollo a la influencia de hormonas exógenas (Vandenberg y col., 2009).

Existe un paradigma en los estudios clásicos de toxicología que asume que luego de la exposición a un químico, el organismo responderá en un sentido monotónico. Esto es: “a mayor dosis, mayor efecto”. Sin embargo, en experimentos con hormonas, drogas y otros químicos es muy común encontrar curvas dosis-respuesta que tienen forma de “U” o de U invertida, conocidas como “no monotónicas” (Welshons y col., 2006). Numerosos PE presentan curvas dosis-respuesta no monotónicas. Por ejemplo, en ratones machos la exposición fetal a bajas dosis de DES: 1) produjo un agrandamiento en el tamaño de la próstata, mientras que dosis 2.000 o 10.000 veces mayor, provocaron una disminución en el tamaño del mismo órgano (vom Saal y col., 1997; Gupta, 2000), 2) produjo un aumento de la distancia ano-genital, y disminución del peso del epidídimo; pero con una dosis 2000 veces superior se observó el efecto opuesto en la distancia ano-genital (Gupta, 2000).

3.2.- Efecto de PE sobre animales de interés zootécnico

Contrariamente a lo que ocurre con animales de laboratorio y fauna salvaje, es poca la atención que hasta el momento se le ha dado al efecto de los PE sobre los animales de interés zootécnico. Estos animales están altamente expuestos a la acción de diferentes PE, a los que pertenecen principalmente, el grupo de los agroquímicos. Se han demostrado alteraciones reproductivas en ovinos, porcinos y bovinos debido a PE que afectan significativamente los rendimientos económicos de la reproducción a gran escala (Sweeney, 2002). Específicamente, se han descrito modificaciones en el tracto reproductor de cerdas expuestas in útero a xenoestrógenos, tales como hiperplasia y queratinización del epitelio del cuello uterino (Sweeney y col., 2000). En rodeos ovinos que pastan en praderas ricas en leguminosas con alta concentración de fitoestrógenos, se ha descrito infertilidad permanente debido a malformaciones irreversibles en la morfología del cuello uterino responsable de un deficiente transporte/capacitación de los espermatozoides (Adams, 1990). Otro antecedente importante son los numerosos casos de infertilidad temporaria o permanente en animales engordados en feed-lots usando dietas con altas concentraciones de xenoestrógenos o por el uso de anabólicos con

actividad de PE (Adams, 1995; McLachlan, 2001; Sweeney, 2002). Además de la exposición a los PE a través del aire, suelo, alimentos y agua de bebida, los animales reciben baños de inmersión con antiparasitarios, cuyas fórmulas comerciales contienen principios activos con efectos de perturbación endocrina demostrados. En ensayos in vitro se detectó que pesticidas organoclorados produjeron una disminución en la maduración de ovocitos bovinos e inhibieron la síntesis de Eg y P en células de la granulosa de bovinos (Tiemann y col., 1996; Alm y col., 1998). Una fuente de exposición frecuente de las crías a estas sustancias es la grasa corporal de la madre, en la cual estos compuestos se pueden haber acumulado a lo largo de su vida. Posteriormente, dichos depósitos pueden movilizarse y ejercer sus efectos como PE sobre el feto durante la gestación y/o sobre el desarrollo postnatal a través de la lactancia (Biggsy y col., 1997).

En nuestro país, el nivel de exposición de los animales de interés zootécnico, de la fauna silvestre y del hombre a los agroquímicos con actividad de PE ha crecido de manera exponencial (Pengue, 2000). Cabe destacar que entre los años 1991 y 1997 el incremento en la utilización de agroquímicos en la República Argentina fue de 39.3 millones a 124 millones de Kg (Pengue, 2000). Apoyando esto último, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio hemos detectado una alta concentración de organoclorados en la grasa mamaria de mujeres que habitan el Litoral Sur argentino (Muñoz-de-Toro y col., 2006). Pudimos determinar la presencia de p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) en el 100% de los pacientes, hexachlorobenzene (HCB) (86.8%), y hexachlorocyclohexane (HCH) (75.0%). Además, pudimos observar que estos altos niveles de organoclorados se correlacionan directamente con la ingesta de grasa animal y de pescado de río. Estudios realizados en esta misma región del Litoral Sur de Argentina muestran que el incremento en el uso de agroquímicos se asocia con un aumento de patologías reproductivas detectadas en varones trabajadores rurales, tales como: impotencia, oligospermia y disfunciones eréctiles (Oliva y col., 2001; Oliva y col., 2002). En coincidencia con los resultados comentados en el Río Reconquista (Buenos Aires, Argentina), se han detectado niveles de pesticidas entre 40 a 400 veces superiores a los límites legales establecidos para la protección de la vida acuática (Rovedatti y col., 2001). Este incremento en la exposición a pesticidas ha sido bien documentado durante los últimos treinta años, aunque las consecuencias reales a largo plazo son difíciles de determinar. De cualquier manera los antecedentes de estos altos valores de pesticidas en nuestro país, claramente están

indicando la importancia de realizar estudios en diferentes especies animales para evaluar el impacto de la exposición a PE sobre la salud humana y animal.

3.3.- Importancia de Dietilestilbestrol y Bisfenol A en reproducción

3.3.1.- Dietilestilbestrol (DES)

El DES es un potente xenoestrógeno (Dodds y Lawson., 1936) representante de los químicos con actividad estrogénica demostrada (Figura 6). Fue ampliamente utilizado en mujeres embarazadas durante las décadas de 1950 y 1960 administrándose para evitar abortos espontáneos y complicaciones del embarazo. Los Centros para el control y prevención de enfermedades de los Estados Unidos calculan que, durante este tiempo, aproximadamente 10 millones de mujeres estadounidenses recibieron DES durante el embarazo (National Research Council, 1999). Pero en 1971 se solicitó a los médicos que dejaran de recetar DES debido a que se detectó que dicho tratamiento se relacionaba con una forma inusual de cáncer vaginal y de cuello uterino, el adenocarcinoma de células claras, en las hijas de las mujeres que habían recibido DES durante el embarazo (Herbst y col., 1971). Anteriormente, esta forma de cáncer era de rara presentación y sólo registrado en mujeres post-menopáusicas. Además se determinó en estas mujeres un aumento en el riesgo de desarrollar defectos en el tracto reproductor, alteraciones como útero en forma de T, infertilidad y complicaciones del embarazo (embarazo ectópico y parto prematuro) (National Research Council, 1999). También se ha sugerido que las mujeres expuestas prenatalmente a DES tienen mayor riesgo de padecer cáncer de mama que sus madres, después de los 40 años de edad (Palmer y col., 2006).

Entre los hijos varones de estas mujeres que fueron tratadas con DES (llamados “los hijos del DES”), también se detectaron anomalías: criptorquidia, disminución de la fertilidad e hipospadias (National Research Council, 1999).

En animales, a partir del primer estudio llevado a cabo en 1949 en la Purdue University (USA), se le encontró aplicación en la producción animal para acelerar la ganancia de peso de corderos mediante su administración oral. Su uso se fue extendiendo con este fin a otras especies, especialmente pollos y ganado bovino. Se demostró que la administración de DES utilizado en sistemas de engorde, incrementa la ganancia de peso debido a su efecto anabólico (Andrews y col., 1949). En 1955 se aprobó su administración oral en animales y en 1957 la FDA (Food and Drug Administration) la administración en forma de implantes para el ganado. Para fines del

año 1955, se estima que más de 6 millones de animales habían sido tratados con DES, lo que representaba el 80 al 90 % de los animales bajo sistema intensivo de alimentación (feed-lot) en USA.

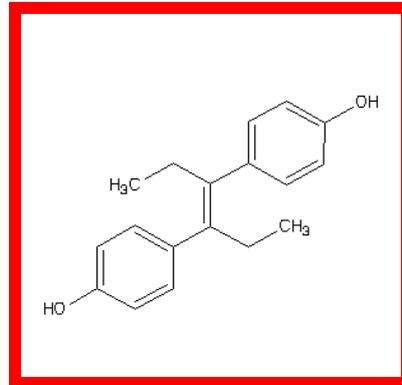


Figura 6: Estructura química del Dietilestilbestrol

En ratones hembras tratadas con DES durante los primeros 5 días de vida se ha demostrado que más del 90% desarrolla adenocarcinoma uterino en la vida adulta (18 meses de edad) (Retha y col., 1990). Se ha propuesto que el mecanismo por el cual la exposición neonatal a DES causa anomalías permanentes en el tracto reproductor, involucra desde modificaciones epigenéticas hasta alteraciones en la respuesta al Eg. La exposición a DES altera la expresión de genes relacionados con el crecimiento y diferenciación del tracto reproductor, tales como genes homeóticos (Hox), morfogenes (Wnt) (Ma y col., 2001; Sassoon, 1999; Varayoud y col., 2008) y genes involucrados en el control del ciclo celular (ciclina D1) (Newbold y col., 2007a). Estas alteraciones persisten en animales adultos, mucho tiempo después de finalizada la exposición a DES (Block y col., 2000; Bosquiazzo y col., 2010; Varayoud y col., 2011). En 1979, algunos años después de la prohibición para su uso en humanos, la FDA también prohibió su utilización en producción animal para evitar la exposición de la población a DES por consumo de productos de ese origen. No obstante, varios años después se han detectado concentraciones de DES contaminando el medio ambiente, posiblemente provenientes de los desechos de feed-lots (McLachlan, 2001). Además de la carne, otro riesgo potencial de exposición del hombre a través de la dieta son los huevos provenientes de animales tratados con anabólicos estrogénicos (Stephany, 2001), y la leche de vaca (Gammaa y col., 2001).

Aunque en la actualidad el DES no se prescribe durante el embarazo, puede utilizarse experimentalmente como control positivo de la acción xenoestrogénica para investigar el efecto de estrógenos ambientales, especialmente cuando la exposición se realiza durante etapas críticas del desarrollo.

3.3.2.- Bisfenol A

El BPA (di-(p-hidroxifenil) dimetilmetano) (Figura 7) es uno de los químicos industriales con más alto volumen de producción en todo el mundo. Anualmente se producen más de 3 millones de toneladas (Markey y col., 2002). Todos los años se incrementa en aproximadamente un 10% su producción y más de 100 toneladas por año son liberadas a la atmósfera. BPA es también uno de los xenoestrógenos más estudiados e investigados. Es un compuesto sintetizado por primera vez en 1891 cuya actividad estrogénica in vivo fue descrita 45 años más tarde en ratas ovariectomizadas, por Dodds y Lawson (1936). Sin embargo, su uso no fue muy difundido hasta descubrirse su capacidad de polimerización para generar policarbonatos plásticos.

Muchos países producen grandes cantidades de BPA, especialmente Alemania, Países Bajos, USA y Japón. Cerca del 65% del BPA producido se destina a la fabricación de policarbonato, el 25% para la producción de resinas epoxy, y el 10% restante en la fabricación de una gran variedad de productos tales como: retardantes de llama (Tetrabromobisfenol A), discos compactos, tuberías reforzadas, dentaduras artificiales, sellantes dentales, papel térmico de fax, esmaltes y barnices, autopartes, filtros de agua, adhesivos, aislantes eléctricos, electrónica, y electrodomésticos (Takahashi y Oishi, 2000).

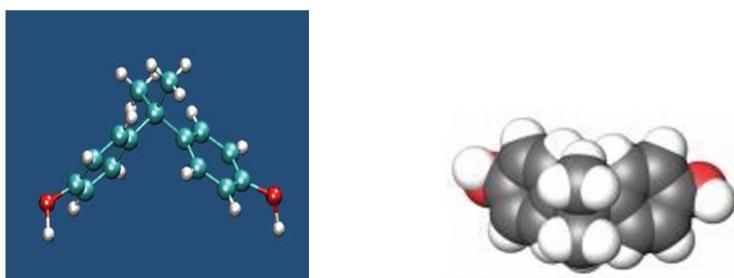


Figura 7: Imagen tridimensional de Bisfenol A

El enlace éster que une a los monómeros de BPA entre sí para formar el polímero no es estable y en consecuencia, el polímero se debilita con el tiempo,

liberando BPA al material con el que se encuentra en contacto. Entre los numerosos productos de uso cotidiano que contienen BPA se incluyen: mamaderas, botellas retornables, recipientes para comida, resinas y pinturas epoxy, rellenos y selladores dentales (revisión de Vandenberg y col., 2007). El BPA se ha utilizado además en la formulación de pesticidas, fungicidas, antioxidantes, gomas y estabilizantes (cloruros de polivinilos) (Takahashi y Oishi 2000, vom Saal y Hughes 2005). También está presente en dispositivos médicos de implante y otros equipamientos médicos (Welshons y col. 2006).

Varios estudios han detectado el pasaje de BPA, desde los recipientes contenedores, al alimento (Vandenberg y col. 2007). La exposición de dichos recipientes a altas temperaturas (ej. calentamiento en microondas o al sol) o a soluciones ácidas o alcalinas (ej. detergentes) puede incrementar la liberación de BPA, aún en los casos en que la polimerización haya sido completa. El BPA ha sido también detectado en una variedad de muestras tomadas del ambiente, incluyendo agua superficial, líquidos residuales, muestras de aire interior y exterior, y basura (Pulgar y col., 2000; Vandenberg y col., 2007). Datos obtenidos de distintos trabajos indican que la cantidad de BPA a la que los animales y el hombre están expuestos podría causar efectos adversos sobre la salud (Welshons y col., 2006; Diamanti-Kandarakis y col., 2009).

El BPA atrajo la atención de las agencias regulatorias y de científicos de varios países debido a sus propiedades estrogénicas tanto *in vitro* como *in vivo* dado el conocido rol que juegan los Eg en la regulación de la fisiología y la fisiopatología animal y humana (Dodds y Lawson, 1936; Markey y col., 2001; Wetherill y col., 2007). Los ensayos bioquímicos han demostrado que BPA es capaz de unirse a los receptores estrogénicos tanto al RE α como RE β , con un afinidad 10 veces mayor por el RE β (Gould y col., 1998; Kuiper y col., 1998). BPA es considerado un Eg ambiental débil debido a su afinidad relativamente baja por los receptores nucleares de Eg en comparación con el E2 (Andersen y col., 1999; Fang y col., 2000). Sin embargo, varios estudios han revelado que BPA puede estimular una rápida respuesta celular a muy bajas concentraciones, por debajo de los niveles en los que se espera que se una a los clásicos receptores de Eg nucleares (Welshons y col., 2006). Además, se ha detectado la unión de BPA al RE asociado a la membrana produciendo efectos estrogénicos no genómicos (Wetherill y col., 2007) con la misma potencia que el E2 (Alonso-Magdalena y col., 2005; Hugo y col., 2008).

En roedores preñados expuestos a BPA se observó que la absorción y distribución del xenoestrógeno en órganos de la madre es muy rápida y además, la presencia de BPA en los fetos demuestra que la placenta no actúa como una barrera para este compuesto (Takahashi y Oishi, 2000). También se ha encontrado BPA en fluido folicular y amniótico, y en suero fetal durante la preñez (Zalko y col., 2003). En relación a los efectos sobre la reproducción de la hembra, se detectaron alteraciones en los ciclos estrales, niveles plasmáticos de LH e incremento del peso corporal en ratas expuestas perinatalmente a este compuesto (Rubin y col., 2001; Monje y col., 2010). En ratones se observó adelantamiento de la pubertad (Howdeshell y col., 1999; Honma y col., 2002). En general numerosos estudios in vivo han establecido que el BPA puede inducir alteraciones en las funciones reproductivas (vom Saal y Welshons, 2006; Maffini y col., 2006). En nuestro laboratorio, usando diferentes modelos animales, hemos evaluado los efectos de la exposición perinatal a BPA sobre órganos reproductores tanto en machos como en hembras. A continuación se resumen los resultados obtenidos:

1- desarrollo anormal de las glándulas prostática y mamaria. En relación a esta última, además detectamos que la exposición a BPA aumenta la susceptibilidad al desarrollo de tumores (Ramos y col., 2001; Muñoz-de-Toro y col., 2005; Durando y col., 2007 y 2011; Kass y col., 2012).

2- desarrollo anormal del útero y consecuencias en su funcionalidad evidenciadas por menor número de crías implantadas durante la preñez (Varayoud y col., 2008 y 2011; Bosquiazzo y col., 2010).

3- alteraciones en la expresión hipotalámica de moléculas claves para su funcionalidad como el RE α y en la conducta sexual de la rata hembra (Monje y col., 2007, 2009 y 2010).

4- modificaciones en el desarrollo del ovario (Rodríguez y col., 2010).

También hemos estudiado los efectos sobre el cocodrilo silvestre *Caiman latirostris* que van desde reversión sexual hasta alteraciones morfológicas en gónadas, tanto en machos como en hembras (Beldomenico y col., 2007; Stoker y col., 2003, 2008 y 2011; Rey y col., 2006 y 2009; Durando y col., 2013).

3.3.2.1- La dosis de BPA

Para establecer el riesgo de exposición a una sustancia, se calcula la dosis de referencia o dosis segura (DRf) como aceptable para la exposición humana diaria. Esta

dosis segura se calcula usando un factor varias veces menor a aquella en la que no se observan efectos adversos (NOAEL-no observed adverse effect level). Para BPA, la DRf para BPA (50 µg/kg/día) se determinó usando un factor 1000 veces menor a la dosis que muestra efectos adversos (LOAEL-lowest observed adverse effect level: 50 mg/kg/día) (Welshons y col. 2003). Por otro lado, muchas veces en la bibliografía se utiliza el término “baja dosis” para hacer referencia a dosis “ambientalmente relevantes” (ej. dosis que resultan en niveles séricos cercanos a los observados en el suero humano y/o de los animales).

3.3.2.2.- La exposición a BPA y su importancia en la salud humana y de los animales

Una de las mayores preocupaciones en relación a la exposición a BPA radica en los efectos que puede tener sobre el hombre, especialmente cuando es expuesto durante las etapas más susceptibles del desarrollo: fetal, neonatal, niñez y adolescencia. En este sentido, se ha establecido cierto grado de relación entre los efectos adversos de la exposición a dosis muy bajas (niveles de BPA en sangre de los animales más bajos que los encontrados en humanos) y su relación con la incidencia creciente de ciertas enfermedades humanas (Diamanti-Kandarakis y col., 2009). Una evidencia consistente de la exposición a BPA se mostró en un estudio realizado por Calafat y col. (2005), en el cual el 95% de las muestras de orina de 394 personas de Estados Unidos analizadas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Atlanta, EE.UU.), poseían niveles detectables de BPA (entre 0,4 y 8 ppb). Estos valores concuerdan con los observados en otros países. Si se tiene en cuenta que la tasa de metabolización de BPA es rápida (Völkel y col., 2002), estos datos sugieren que la exposición humana y animal a cantidades significativas de BPA es continua y proveniente de múltiples vías. Se estima que la dosis ingerida de BPA vía oral en humanos es de: a) 6,3 µg/día a través del consumo de alimentos provenientes de latas de conserva (Howe y Borodinsky, 1998), b) aproximadamente 0,75 µg/día por ingerir bebidas contenidas en envases plásticos (Brotons y col., 1995), y c) 90-931 µg/día sería la exposición estimada dentro de la primer hora de colocado un sellador dental (Olea y col., 1996).

Las investigaciones realizadas en los últimos años sugieren que las patologías hormonales que se hacen evidentes en mujeres a partir de la pubertad podrían tener su origen en la vida fetal o neonatal cuando los ovarios se están formando. En este sentido, entre otras enfermedades, el BPA ha sido asociado al Síndrome del Ovario Poliquístico

(SOP) (Franks, 2006; Takeuchi y col., 2004; Fernandez y col., 2010; Diamanti-Kandarakis y col., 2010), una enfermedad reproductiva que afecta a aproximadamente el 8% de las mujeres en edad fértil caracterizada por alteraciones en la foliculogénesis e incremento en el número de células de la granulosa en los folículos preantrales (Stubbs y col., 2007). Diferentes autores sugieren además que la exposición a xenoestrógenos tales como el BPA durante el desarrollo temprano puede ser un factor que contribuya al incremento de la incidencia de infertilidad, anormalidades del tracto genital, obesidad, desórdenes tales como hiperactividad y déficit de atención, cáncer de próstata y mama observado en la población humana de USA y Europa durante los últimos 50 años (Sharpe y Skakkebaek, 1993; Soto y col., 2008).

Adicionalmente, existe una epidemia de obesidad en muchas regiones del mundo y, en experimentos realizados con animales de laboratorio, se ha comprobado que la exposición a BPA durante las etapas tempranas de desarrollo incrementa el peso corporal en la vida adulta (Howdeshell y col., 1999; Rubin y col., 2001). Además, la exposición a bajas dosis de DES (1 µg/kg) estimula el incremento de grasa corporal y peso en ratones, mientras que una dosis 1000 veces más alta tiene como resultado una disminución en el peso corporal (Newbold y col., 2004). Uno de los aspectos más interesantes, surge de los estudios sobre los efectos de la exposición fetal/neonatal a BPA y la falta de diferenciación sexual del cerebro con alteraciones de la conducta. El BPA parece interferir con el normal proceso que controla la diferenciación produciendo cambios a nivel cerebral tanto en machos como en hembras (Fujimoto y col., 2006; Rubin y col., 2006; Palanza y col., 2008; Monje y col., 2007, 2009 y 2010). Se han informado cambios en la conducta social y sexual de los animales de laboratorio estudiados (Dessi-Fulgheri y col., 2002; Farabollini y col., 2002) lo cuales podrían tener impacto en la dinámica poblacional.

Existen numerosos estudios en relación con el efecto a dosis bajas sobre el desarrollo del aparato reproductor de hembras (Soto y col., 2008) y machos en ratas y ratones expuestos a BPA. Los hallazgos incluyen malformaciones cromosómicas (Susiarjo y col., 2007) en ovocitos y efectos a largo plazo en órganos reproductores que no se verifican hasta la mitad de la vida del sujeto, tales como fibromas uterinos y quistes paraováricos (Newbold y col., 2007a). Otros estudios demuestran que de la exposición a muy bajas dosis de este compuesto durante el desarrollo prenatal o neonatal pueden resultar en efectos permanentes en ratas y ratones macho. Bajas dosis de BPA pueden causar disminución en la producción espermática diaria, incremento en

el tamaño de la próstata (vom Saal y col., 1998) y mayor expresión del RA (Gupta, 2000; Richter y col., 2007 a,b) hiperplasia de células basales en los conductos prostáticos durante la vida fetal y metaplasia de las células escamosas basales en la vida adulta (Ogura y col., 2007). También se describen estadios tempranos de cáncer de próstata (neoplasia prostática interepitelial) en la vida adulta, como respuesta a la administración de E2 o testosterona (Ho y col, 2006).

3.4.- Importancia de DES y BPA en el desarrollo del ovario

Los cambios en el proceso normal de la foliculogénesis afectan funciones reproductivas pudiendo producir alteraciones tales como: anovulación, infertilidad, disminución de la fecundidad, deficiencia de estrógeno y falla ovárica prematura (Diamanti-Kandarakis y col., 2009).

En ratón se ha demostrado que la exposición intrauterina a DES provoca un efecto estimulador en la transición de folículo primordial a primario (activación) (Wordinger y Derrenbacker, 1989). Un efecto similar con reducción en la reserva ovárica folicular fue demostrado, recientemente en nuestro laboratorio, por exposición neonatal a este xenoestrógeno (Rodríguez y col., 2010). La exposición a BPA ha inducido en el ovario de mamíferos alteraciones en la meiosis con aneuploidia (Hunt y col., 2003; Susiarjo y col., 2007), incremento de tejido ovárico ocupado por folículos antrales y una mayor incidencia de bursas ováricas hemorrágicas (Maffini y col., 2006). Además, la exposición postnatal a altas dosis de BPA provocó un aumento en la incidencia de folículos multiovulares (FMOs) en ratones (Suzuki y col., 2002). Un trabajo realizado por nuestro grupo mostró que, en hembras de *Caiman latirostris* expuestas in ovo a una única dosis baja de BPA (1.4 ppm), hubo un incremento en el porcentaje de folículos ováricos tipo III (de estadio avanzado de maduración) y FMOs (Stoker y col., 2008). Utilizando un modelo de exposición postnatal en ratas observamos que BPA disminuye el número de folículos primordiales en un estadio prepuberal (Rodríguez y col., 2010).

Nuevos experimentos han determinado los efectos de BPA sobre la esteroideogénesis ovárica. Se ha detectado que BPA inhibe el crecimiento in vitro de folículos antrales de ratón y reduce la producción de P, androstenediona, estrona, T y E2 (Peretz y col.; 2011). En otro estudio in vitro, BPA inhibió la producción de E2 después de la estimulación con FSH en células de la granulosa de cerda (Mlynarcíková y col., 2005).

Los resultados en ovejas muestran que, la exposición prenatal a BPA reduce el peso de la cría al momento del nacimiento, y la exposición a BPA en las ovejas adultas provoca hipergonadotrófismo y la temporada reproductiva en estos animales termina más tarde (Savabieasfahani y col., 2006). Sin embargo, poco se conoce acerca de los efectos de la exposición neonatal a BPA ó DES sobre el desarrollo del ovario de la oveja.

Una característica a tener en cuenta para estos dos xenoestrógenos es que tanto DES como BPA son compuestos sumamente estables, capaces de permanecer contaminando el medio ambiente durante mucho tiempo (inclusive por años) y que pueden ser transportados a largas distancias contaminando regiones vecinas o alejadas (National Research Council, 1999).

De todo lo mencionado se desprende que los compuestos seleccionados para el presente estudio (DES y BPA) poseen alto impacto ambiental, tanto en el medio rural como en el urbano.

4.- Biotecnología de la reproducción en ovinos

4.1.- Superovulación y Transferencia de embriones

En pequeños rumiantes, las técnicas de superovulación y transferencia de embriones constituyen, en la actualidad, una herramienta imprescindible para el desarrollo tanto de programas de conservación de recursos genéticos en razas con bajo número de ejemplares así como en programas de mejora genética destinados a aumentar las producciones ganaderas. El principal objetivo de los tratamientos de superovulación en animales de interés zootécnico es producir un gran número de ovulaciones y obtener el máximo número de embriones transferibles con alta probabilidad de ser implantados. Sin embargo, la respuesta a estos tratamientos hormonales es muy variable y difícil de predecir. El éxito que se puede alcanzar en un programa de ovulación múltiple y de transferencia de embriones (Multiple Ovulation Embryo Transfer-MOET) depende, en principio, de la respuesta obtenida con el tratamiento superovulatorio y de los índices de implantación de los embriones transferidos (Gonzalez-Bulnes y col., 2003).

La efectividad en el resultado de los tratamientos superovulatorios está asociada al normal desarrollo y funcionamiento de los sistemas que controlan el reclutamiento y la selección de los folículos ováricos.

El resultado del tratamiento superovulatorio puede verse afectado por diversos factores tales como el tipo y la dosis de gonadotrofina empleada (Mahmood y col.,

1991; Crosby, 1993; Armstrong y Evans, 1983), por factores genéticos (Bindon y col. 1986), por la raza utilizada (Chupin y col. 1985), por el status ovárico de la hembra donante al iniciar el tratamiento superovulatorio (Gonzalez-Bulnes y col., 2003; Veiga-Lopez y col., 2005), por la edad de la hembra (Kelly y col., 2005) y por el protocolo de administración de la gonadotropina (Gordon y col., 1997; Simonetti y col., 2008). Además, la viabilidad de los embriones también depende de una serie de factores relacionados con la hembra receptora y con el embrión mismo (Ishwar y Memon, 1996). Por ello, resulta necesario un mejor conocimiento de los procesos involucrados en el crecimiento y diferenciación de los folículos ovulatorios en especies de interés zootécnico con el objeto de desarrollar estrategias que permitan el control de la onda folicular (Bo y col., 1995) y así mejorar los resultados obtenidos en los tratamientos de superovulación y de transferencia de embriones.

Actualmente, la mayor limitación en su aplicación la constituyen la variación en la respuesta superovulatoria de acuerdo al protocolo seleccionado y la gran variación observada entre los animales en respuesta al tratamiento (Gonzalez-Bulnes y col., 2003; Simonetti y col., 2008).

4.2.- Obtención de ovocitos a partir de hembras prepúberes

De las técnicas de fertilización *in vitro* desarrolladas en los últimos años, la más prometedora en cuanto a su aplicación comercial es la que obtiene ovocitos de animales juveniles (prepúberes) para su posterior fertilización y se conoce por las siglas JIVET (Juvenile In Vitro Embryo Transfer). Esta técnica permite reducir el intervalo generacional acelerando la mejora genética en comparación con el uso de animales adultos (Smith, 1986).

Las corderas de 4 a 6 semanas de edad presentan un incremento natural e inusual en la foliculogénesis (Kennedy y col., 1974), y se sabe que estos folículos ováricos responden a la estimulación con gonadotropinas exógenas (Mansour, 1959; Worthington y Kennedy, 1979). Estas observaciones no tuvieron aplicación práctica por muchos años hasta que se sentaron las bases para el desarrollo de la técnica de JIVET.

Los protocolos de superovulación utilizados en hembras juveniles están basados en los utilizados para el mismo propósito en hembras adultas (O'Brien y col., 1997; Ptak y col., 1999). Otra importante ventaja es que las hembras prepúberes responden mejor y en forma más uniforme al tratamiento superovulatorio ya que la respuesta no está influenciada por los cambios hormonales propios del ciclo estral de la hembra

adulta. La técnica incluye la superovulación de hembras prepúberes (corderas, terneras, etc.), recuperación de los ovocitos, fertilización, cultivo in vitro y posterior transferencia a una hembra adulta receptora (Armstrong y col., 1994; Earl y col., 1995). En la cordera, el momento elegido para la obtención de los ovocitos varía desde las 24 a las 96 horas posteriores al tratamiento con FSH (O'Brien y col., 1996; Ptak y col., 1999).

Si bien la viabilidad de los ovocitos obtenidos es relativamente más baja comparada con la obtenida a partir de animales adultos (O'Brien y col., 1996, 1997), la mayor cantidad de ovocitos recuperados finalmente se traduce en un mayor número de embriones viables producidos por hembra superovulada (Armstrong y col., 1994). Cabe destacar que la optimización en los resultados alcanzados en los tratamientos superovulatorios en los últimos años, también mejoró la respuesta de las hembras prepúberes a este mismo tratamiento (Morton, 2008). Además, los avances alcanzados en la maduración de ovocitos (Kelly y col., 2005) han permitido afianzar el desarrollo y la viabilidad de la aplicación comercial de la JIVET.

Las técnicas reproductivas complementarias como el sexado y criopreservación de semen y embriones, hacen más eficientes a las técnicas de MOET y JIVET. Se ha demostrado que los embriones ovinos congelados por métodos convencionales pueden permanecer viables por más de 13 años (Fogarty y col., 2000) resultando ser un método eficaz de conservación de embriones a largo plazo, lo que facilita su transporte y comercialización.