

III.- Materiales y Métodos

Para desarrollar los objetivos propuestos, el trabajo se dividió en 3 experimentos:

Experimento 1:

Este primer experimento fue diseñado para estudiar la ontogenia de los receptores de hormonas esteroides ($RE\alpha$, $RE\beta$, RA) en muestras de ovario de cordera en los días postnatales 1, 5, 10 y 30. Los días estudiados fueron seleccionados en relación al momento en que las corderas van a ser expuestas a los xenoestrógenos.

Experimento 2:

Diseñamos un modelo de perturbación endocrina en oveja para evaluar los efectos de la exposición postnatal a bajas dosis de BPA ó DES. Determinamos los efectos de la exposición a los xenoestrógenos sobre el desarrollo del ovario en corderas prepuberales, específicamente en el día postnatal 30 (DPN 30). En las muestras de ovarios se determinó: el peso del órgano; parámetros que determinan el desarrollo folicular (dinámica folicular, reserva total de ovocitos, incidencia de FMOs y porcentaje de folículos atrésicos); expresión de receptores de hormonas esteroides ($RE\alpha$, $RE\beta$, RA) y marcadores asociados al ciclo de división celular (Ki67 y p27). En el DPN 30 se tomaron muestras de suero de estos mismos animales para cuantificar los niveles circulantes de E2 y T.

Experimento 3:

Fue diseñado para investigar si la exposición postnatal a xenoestrógenos afecta la funcionalidad ovárica. Se utilizaron animales expuestos postnatalmente a xenoestrógenos y en el DPN 30 fueron sometidos a un tratamiento gonadotrófico de superestimulación folicular. En las muestras de ovario se determinó: el número de folículos iguales o mayores a 2 mm, el porcentaje de folículos atrésicos y la expresión de $RE\alpha$, $RE\beta$, RA y de Ki67, como marcador de proliferación celular. Además, se obtuvieron muestras de suero al inicio del tratamiento gonadotrófico y al final del mismo para determinar los niveles circulantes de E2 por radioinmunoensayo (RIA).

1.- Animales

Los experimentos se llevaron a cabo entre los años 2007 y 2010 en una granja cercana a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora (Establecimiento “Don Vitale”, Pcia. de Buenos Aires, Argentina) que posee un

convenio de cooperación con la FBCB, UNL. Previo al inicio del desarrollo experimental, el mismo fue aprobado por el Comité de Ética de la FBCB-UNL.

Para obtener los animales experimentales se utilizaron hembras de la raza ovina Corriedale (de 2 a 4 años de edad) alimentadas sobre pastura natural con baja proporción de trébol. Dichas hembras recibieron servicio natural con machos de la raza Hampshire Down durante la temporada reproductiva (Figura 8).



Figura 8: Carnero raza Hampshire Down y hembras Corriedale: Fueron utilizados como progenitores de las corderas experimentales

Durante los períodos de gestación y de lactancia los animales no recibieron suplementación alimenticia. Para los experimentos se seleccionaron las corderas nacidas durante los meses de Agosto y Septiembre de cada año provenientes de partos únicos. No se utilizaron mellizos para evitar la eventual influencia sobre los fetos que podría producir un ambiente hormonal uterino distinto producto de una gestación múltiple (vom Saal y Bronson, 1978). Si bien no se determinó la concentración de fitoestrógenos en la pastura, se asume que todos los animales estuvieron expuestos a los mismos niveles de fitoestrógenos, dado que la alimentación fue idéntica entre los animales controles y los tratados. Tanto las madres como las crías permanecieron bajo condiciones naturales durante todo el experimento. Todos los animales experimentales fueron pesados el día del nacimiento y el DPN 30. Al momento de nacer las corderas fueron identificadas con caravanas numeradas de colores, que mantuvieron durante todo el tiempo que duraron los experimentos (Figura 9).



Figura 9: Identificación de las corderas: A cada una de las corderas se le colocó una caravana de color numerada en la oreja para permitir su rápida individualización.

2.- Experimento 1:

Ontogenia de receptores hormonales esteroideos en el ovario

2.1.- Obtención de muestras mediante ovariectomías bilaterales

Para esta etapa del trabajo se obtuvieron muestras de ovarios de animales en DPN 1, 5, 10 y 30. Todo el material utilizado durante la cirugía fue previamente esterilizado. Cada animal fue anestesiado con ketamina (20 mg/kg, im) y xylazina (0.1–0.2 mg/kg, im) y se lo colocó en la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal, sujetándolo por sus extremidades. Se esquiló la zona abdominal e inguinal, se higienizó la zona con agua y jabón, se desinfectó con una solución de iodopovidona colocando luego un campo quirúrgico (Figura 10A y 10B).

Luego se practicó una incisión con bisturí de aproximadamente 8 cm en la línea media de la piel de la zona abdominal, inmediatamente por delante de las glándulas mamarias. Por divulsión del tejido subcutáneo se separó la piel del tejido muscular subyacente. Para ingresar a la cavidad abdominal se debe atravesar la pared muscular y el peritoneo, para ello se realizó una incisión en la “línea blanca” que corresponde a la fascia que une a los músculos rectos del abdomen. Con separadores se desplazaron lateralmente los bordes de la herida y se buscaron los cuernos uterinos con pinza anatómica de punta roma.

Una vez localizados los ovarios (que se encuentran próximos al extremo craneal de cada cuerno uterino), se los expuso evitando cualquier tipo de presión innecesaria (Figura 10C). Se realizaron ligaduras con hilo de sutura a nivel de la unión útero-tubárica y por delante de cada ovario para evitar hemorragias. Se seccionó respetando las ligaduras, extrayéndose así cada uno de los ovarios. Se introdujo el resto del material

expuesto en la cavidad abdominal y se procedió a suturar el peritoneo junto con el tejido muscular, con sutura de puntos simples. Por último, se suturó la piel con puntos discontinuos. La hembra ovariectomizada se mantuvo en jaula individual hasta la recuperación de la anestesia, se administraron antibióticos de amplio espectro por vía im y un producto de uso local repelente de moscas (curabicheras) en la herida para evitar complicaciones por miasis.

Por último, los ovarios se disecaron bajo lupa para separarlos de posibles restos de tejidos adyacentes (meso-ovario, oviducto, tejido adiposo) (Figura 10D) y se pesaron en balanza analítica. Los valores obtenidos (expresados en gr) se ajustaron al peso corporal de cada cordera (expresados en kg).



Figura 10: Fotografías que muestran las distintas etapas durante la ovariectomía bilateral en una cordera de 30 días de edad (DPN 30). A) Esquilado de zonas abdominal e inguinal, B) Desinfección y colocación de campo quirúrgico, C) Exposición de útero, oviductos y ovarios, D) Disección de ovarios bajo lupa.

2.2.- Procesamiento de las muestras de ovario

Los ovarios fueron seccionados longitudinalmente en dos mitades para asegurar su mejor contacto con el líquido fijador. Se fijaron por inmersión en una solución de formol al 4% tamponada a pH 7,5 con una solución reguladora de fosfato 0,05 M (PBS, Phosphate Buffer Solution) durante 6 hs a 4°C, respetando la proporción recomendada de fijador/muestra (20:1) para permitir una adecuada conservación morfológica del tejido. Luego se realizaron dos lavados con PBS (pH 7,5) de 10 min cada uno y se

mantuvieron los tejidos en una solución de alcohol 70° a 4°C. El procedimiento hasta su inclusión en tacos de parafina se realizó según fuera descrito por Junqueira (1983): deshidratación en alcoholes de graduación creciente, clarificación en xilol e inclusión en parafina.

2.3.- Obtención de cortes histológicos

Se realizaron cortes de 5 μm de espesor utilizando un micrótomo rotativo manual Leika Jung 2025. Los cortes se montaron en portaobjetos pre-tratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxysilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y se secaron en estufa a 37°C durante 24 hs.

2.4.- Inmunohistoquímica

La metodología empleada fue la descrita en publicaciones previas de nuestro grupo (Muñoz-de-Toro y col., 1998; Varayoud y col., 2008; Rodríguez y col., 2008; Rodríguez y col., 2010).

La inmunomarcación para receptores esteroides se realizó utilizando anticuerpos comerciales: anti-RE α (NCL-ER-LH2, clon CC4-5, dilución 1:50, Novocastra® Newcastle-upon-Tyne, UK), anti-RE β (NCL-ER-beta, clon EMR02, dilución 1:25, Novocastra®), y anti-RA (sc-816, 1:400 dilución, Santa Cruz Biotechnology Inc.®, CA).

En la Tabla 2 se describe un protocolo general para IHQ; luego cada ensayo fue realizado ajustando la dilución de los anticuerpos primarios y secundarios para la identificación de cada proteína.

En cada ensayo de IHQ se incluyeron controles positivos (utilizando tejidos con expresión conocida) y negativos (reemplazando el anticuerpo primario por suero no inmune -Sigma®).

Tabla 2: Protocolo estándar de IHQ

DÍA 1	
Desparafinización	
Xilol	3 pasajes de 3 min c/u
Alcohol 100°	3 min
PBS	5 min
Recuperación antigénica	
En horno de microondas, utilizando buffer citrato 0,01 M; pH 6	5 min al 100% (calentar sólo el buffer sin los cortes histológicos) 20 min al 100% (con los cortes histológicos) 20 min apagado
PBS	5 min
Bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena	
Metanol + agua oxigenada 30 vol (36 ml metanol + 4 ml H ₂ O ₂)	15 min
PBS	15 min
Bloqueo de uniones no específicas	
Suero normal de cabra 1:20 diluido en leche 1,5% en PBS	30 min
Anticuerpo primario	
Cada anticuerpo fue agregado en la dilución de trabajo optimizada para cada proteína	14-16 hs a 4°C, en cámara húmeda
DÍA 2	
Sacar de la heladera y dejar que tome temperatura ambiente	15 min
PBS	15 min
Sistema de revelado	
Anticuerpo secundario biotinilado (anti-ratón, diluido 1/80 o anti-conejo, diluido 1/200*; según corresponda) diluido en albúmina sérica bovina 1% en PBS	30 min
PBS	10 min
Streptavidina-peroxidasa (Sigma) 1/150 diluido en albúmina sérica bovina 1% en PBS	30 min
PBS	10 min
Cromógeno: diaminobencidina (Sigma) (2,3mg) + 3,3 ml Tris-HCl 0,05M pH:7,5 + Sustrato enzimático: 5 µl H ₂ O ₂ 30 vol	5 min
Agua destilada	1 min
Hematoxilina de Mayer	1 min
Agua destilada	3 pasajes breves
Agua amoniacal	10 seg
Agua destilada	2 min
Alcohol 70°	1 min
Alcohol 96°	1 min
Alcohol 100°	2 pasajes de 1 min c/u
Xilol 1	2 min
Xilol 2	5 min
Montaje	

2.5.- Evaluación de la expresión de receptores para hormonas esteroides.

Para la evaluación de la expresión de las proteínas RE α , RE β y RA, se utilizó un microscopio óptico Olympus BH2 (Olympus Optival Co. Ltd., Tokio, Japón) empleando una lente objetiva de 40X.

La expresión de estas proteínas se analizó cualitativamente en tres secciones/ovario, separadas entre sí cada 200 μ m para DPN1, 5, 10 y 30. En cada sección se describió tanto la intensidad de la expresión clasificando la misma como: levemente positivo (-/+), débilmente positivo (+), positivo (++) y fuertemente positivo (+++). Mediante esta metodología se pudo determinar la distribución de los receptores en el tejido y en cada tipo folicular. La evaluación se realizó tanto en la región ovárica cortical como en la medular.

Se definieron como células positivas a aquellas que presentaron el núcleo marrón, mientras que las negativas fueron las coloreadas de azul o celeste debido a la contratinción con hematoxilina (Figura 11).

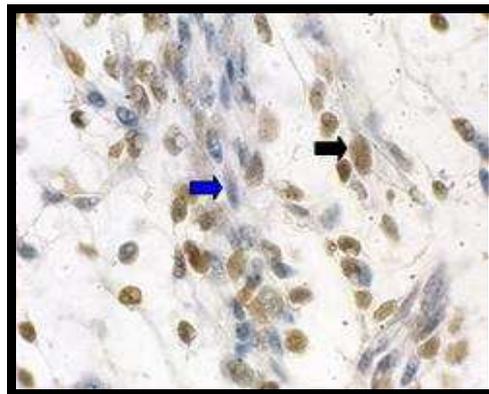


Figura 11: Fotomicrografía representativa de la tinción mediante IHQ de RE α en estroma ovárico. Flecha azul: núcleo negativo de color azul. Flecha negra: núcleo positivo de color marrón. Magnificación: 600X.

3.- Experimento 2:

Efecto de la exposición neonatal a bajas dosis de BPA ó DES sobre el desarrollo del ovario de la cordera

3.1.- Diseño experimental

Luego del nacimiento y la identificación, las corderas fueron asignadas al azar a alguno de los siguientes tratamientos postnatales administrados diariamente por vía subcutánea (Figura 12) desde el DPN 1 (día del nacimiento) al 14: 1) Control a los que

se les administró aceite de maíz (vehículo) (n=10); 2) DES (Sigma) dosis: 5 µg/kg/día (n=6); 3) BPA (99% pureza, Aldrich, Milwaukee, WI) dosis: 50 µg/kg/día (n=6) (Figura 13). En el DPN 30 se pesaron las corderas y bajo anestesia general se les practicó ovariectomía bilateral siguiendo el procedimiento detallado en la sección 2.1.



Figura 12: Administración de tratamientos. Las corderas fueron inyectadas diariamente por vía subcutánea con aceite de maíz, BPA ó DES desde el día del nacimiento y hasta el DPN 14.

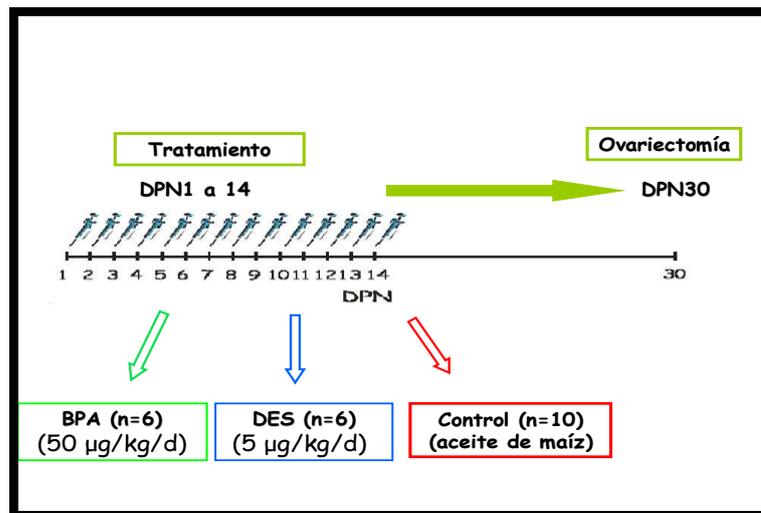


Figura 13: Esquema de diseño de administración de xenoestrógenos y su vehículo en los 3 grupos experimentales del Experimento 2. (DPN: día postnatal).

3.1.1.- Elección de la dosis de xenoestrógenos

3.1.1.1.- Dosis de BPA

La Agencia de Protección Ambiental en el informe del Programa de Toxicología Nacional de Perturbadores Endocrinos (U.S. Environmental Protection Agency, <http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>, 1993) ha definido la dosis LOAEL para BPA en 50 mg/kg/día. Dicha dosis corresponde a la dosis más baja a la que se han observado efectos adversos, y dicho organismo ha fijado como “dosis segura” de BPA a una dosis

1000 veces menor o sea de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ (NTP-CERHR, 2008; Melnick y col., 2002). Esta última, fue la dosis seleccionada en esta etapa del trabajo para evaluar los efectos sobre el desarrollo del ovario.

3.1.1.2.- Dosis de DES

El grupo de corderas que recibió DES fue utilizado como control positivo de exposición a un xenoestrógeno. La dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de DES utilizada en nuestro experimento es considerada una dosis baja, ya que es 20 veces menor a la que fuera administrada terapéuticamente a mujeres embarazadas, y que es considerada como una dosis adecuada para estudios de perturbación endocrina con “estrógenos ambientales” (Newbold, 2004).

3.1.2.- Obtención de muestras de ovario

Como se mencionó anteriormente para obtener las muestras de ovario se siguió la misma metodología descrita para el experimento 1 (ver sección 2.1).

3.1.3.- Obtención de muestras de suero

De las corderas de 30 días de edad se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción yugular (Figura 14). La sangre fue recolectada en tubos de vidrio y mantenida refrigerada a 5°C hasta su llegada al laboratorio (menos de 1 hora). Luego fueron colocadas en estufa a 37°C durante 30 minutos hasta la retracción del coágulo. Por último, fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos y se procedió a separar el suero que se mantuvo a -80°C hasta su uso.



Figura 14: Extracción de muestra de sangre: Se realizó por punción de vena yugular en las corderas prepúberes.

3.1.4.- Estudio morfométrico de la dinámica folicular

Para el estudio morfométrico los ovarios fueron seccionados completamente en forma seriada (Figura 15) usando el micrótopo rotativo manual Leika Jung 2025.

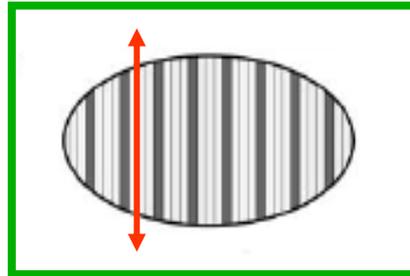


Figura 15: Cortes histológicos de ovario: Esquema demostrativo del modo en que se realizaron los cortes seriados de ovario. (La flecha roja indica el sentido de los cortes histológicos)

Los cortes del tejido ovárico se montaron en portaobjetos pre-tratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxysilano, Sigma) y se secaron en estufa a 37°C durante 24 hs. Se realizaron cortes de 5 µm de espesor. Un corte cada 200 µm, fue separado para su evaluación morfométrica. En estos cortes se realizó la tinción con picrosirius-hematoxilina (**Tabla 3**) para identificar con precisión las diferentes estructuras del ovario, cuantificar el número y tipo de folículo ovárico.

Tabla 3: Protocolo de coloración Picrosirius-Hematoxilina

Desparafinización e hidratación	Tiempo
Xilol 1	5 min
Xilol 2	2 min
Xilol 3	1 min
Alcohol 100°	1 min
Alcohol 96°	1 min
Alcohol 70°	1 min
Agua destilada	2 min
Picrosirius	30 seg
Agua corriente	1 min
Hematoxilina de Harris	30 min
Agua corriente	15 min
Deshidratación	
Alcohol 70°	1 min
Alcohol 96°	1 min
Alcohol 100°	1 min
Xilol 1	1 min
Xilol 2	5 min
Montaje	

Se estableció el porcentaje de folículos en cada estadio, usando un microscopio óptico de transmisión Olympus BH2 (Olympus Optival Co. Ltd.®, Tokio, Japón) con una lente objetiva de 40X.

Los folículos fueron clasificados de acuerdo a los siguientes criterios morfológicos establecidos previamente por Lundy y col. (1999): **folículos primordiales**, ovocitos rodeados con una capa de células de la granulosa planas; **folículos de transición**, con una capa de una mezcla de células de la granulosa planas y cuboides; **folículos primarios**, de una a menos de dos capas completas de células de la granulosa cuboides; **folículos preantrales pequeños**, de dos a menos de cuatro capas completas de células de la granulosa cuboides; **folículos preantrales grandes**, de cuatro a menos de seis capas completas de células de la granulosa y **folículos antrales pequeños**, con más de seis capas de células cuboides y un antro completamente formado (Figura 16).

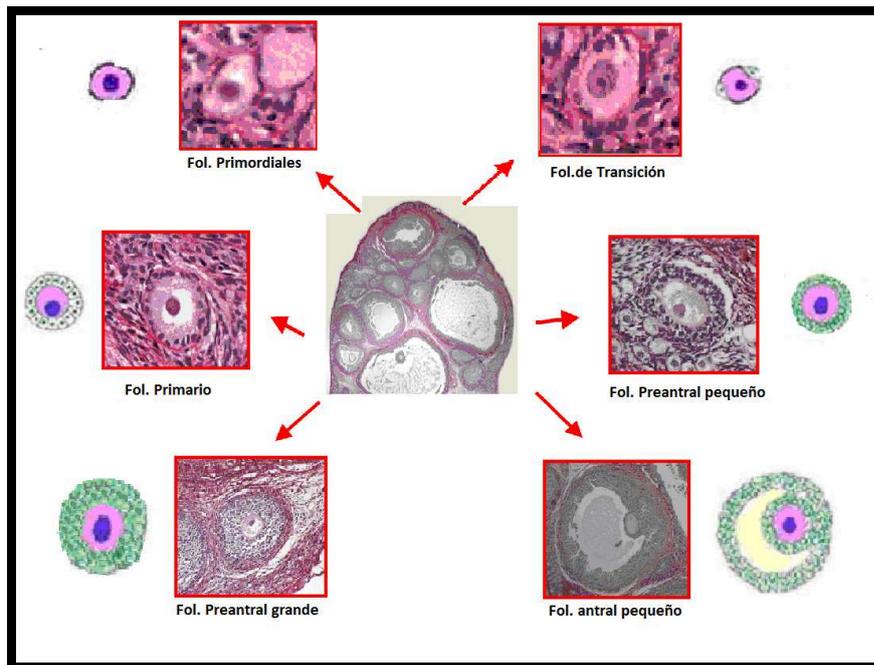


Figura 16: Clasificación morfológica de los folículos ováricos de la cordera: Se realizó de acuerdo a la población de células de la granulosa (Lundy y col., 1999) (Fotomicrografías y esquema del autor)

Para evitar que un mismo folículo fuera contado más de una vez en diferentes cortes histológicos, sólo se contaron aquellos folículos que contenían el ovocito con su núcleo. El número total de folículos de cada

ovario fue calculado de acuerdo a criterios establecidos previamente (Tilly 2003; Rodríguez y col., 2010).

El número total de folículos por cada ovario fue calculado de la siguiente manera: el número de folículos contados en un corte de 5 μm a intervalos de 200 μm . El resultado se multiplicó por el número total de cortes contados en cada ovario (número que varía en función del tamaño de cada ovario) y luego x 40. Este último factor permitió ajustar el resultado teniendo en cuenta la porción del ovario que no fue incluida en el análisis muestreado. El porcentaje total de folículos de los diferentes estadios fue calculado en relación al número total de folículos en la muestra (Rodríguez y col., 2010; Tilly, 2003). También se evaluó el ensamblado de folículos primordiales (“nest breakdown”) de acuerdo a criterios establecidos con anterioridad (Suzuki y col., 2002; Britt y col., 2004). Para ello se contaron aquellos folículos con más de un ovocito incluido dentro de la capa de células de la granulosa, definidos como FMOs, y que identifican un ensamblado folicular incompleto. La incidencia de FMOs se expresó en relación al número total de folículos.

3.1.5.- Evaluación de marcadores asociados al ciclo de división celular

Para determinar la expresión de Ki67 utilizamos un anticuerpo generado en nuestro laboratorio. El protocolo utilizado para la obtención del mismo fue descrito previamente (Varayoud y col., 2008). Para el procedimiento en primer lugar se indujo la expresión de una porción de la molécula de Ki67 en bacterias *E. coli* JM109 (Stratagene, GE Healthcare Bio-Sciences, Argentina SA, Buenos Aires, Argentina) como proteína de fusión a la enzima glutation-S-transferasa, utilizando un vector pGEX4T-3 (GE Healthcare Bio-Sciences). Para llevar a cabo el trabajo se seleccionó una región de la secuencia X65550.1 de Ki67 humano que abarca desde los nucleótidos 3674-4712. Una vez expresada la proteína de fusión, se procedió a la inoculación de conejos siguiendo protocolos previamente descritos en nuestro laboratorio (Rey et al, 2006). Los antisueros obtenidos luego fueron purificados utilizando cromatografía de afinidad ligada al antígeno (Hi-Trap NHS activated HP column, GE Healthcare Bio-Sciences). La dilución utilizada en los ensayos fue 1:250.

Para detectar la expresión de p27 se utilizó un anticuerpo comercial anti-p27 (sc-528, dilución 1:1200, Santa Cruz Biotechnology Inc. ®). La dilución del anticuerpo secundario fue de 1/400.

3.1.5.1.- Cuantificación de los marcadores asociados a proliferación celular.

El índice de proliferación para células de la granulosa y células tecales se obtuvo considerando el porcentaje de células Ki67-positivas en relación al número total de células de cada tipo celular. Se evaluaron la totalidad de los folículos saludables (sin signos de atresia); totalizando al menos 500 células localizadas en 5 campos visuales diferentes elegidos al azar de cada estadio folicular (folículo preantral y antral). El campo visual fue posicionado sobre la capa de células de la granulosa. Para cuantificar la expresión de p27 se siguieron los mismos criterios que se utilizaron para evaluar el índice de proliferación.

3.1.5.2.- Evaluación de folículos atrésicos

El criterio utilizado para considerar a los folículos saludables ó atrésicos fue morfológico e inmunohistoquímico. Los folículos clasificados como saludables mostraron una capa de células de la granulosa de apariencia compacta y bien organizada, numerosas figuras mitóticas y ocasionales o raras células picnóticas. En contraste, la atresia folicular está caracterizada por una amplia desintegración de la capa de células de la granulosa y rara presencia o ausencia de células mitóticas. En los folículos antrales pequeños el resto de la capa de células de la granulosa consistió casi completamente de núcleos picnóticos y cuerpos apoptóticos. Aunque en la mayoría de los folículos atrésicos se encontraron estas características histomorfológicas, en el presente estudio, y para evitar errores en la clasificación, se definió como folículos atrésicos a aquellos folículos que presentaban $\leq 1\%$ de reacción inmunohistoquímica positiva a Ki67 en las células de la granulosa (Jolly y col., 1997).

3.1.6.- Determinación de receptores esteroides ováricos

Se utilizaron los mismos procedimientos y la misma metodología descrita en la secciones 2.3 y 2.4 para estudiar la expresión de receptores de hormonas esteroides ($RE\alpha$, $RE\beta$, RA). La evaluación se realizó en forma cualitativa analizándose su expresión en 2 cortes efectuados a dos profundidades diferentes en cada ovario.

3.1.7.- Niveles séricos de E2 y T

Para la determinación de los niveles séricos de E2 y T, las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos de vidrio, luego de retraído el coágulo fueron centrifugadas, separándose el suero que se conservó a -80°C hasta su uso. En este

experimento los niveles séricos de E2 y T fueron determinados mediante un radioinmunoensayo optimizado en nuestro laboratorio (Bosquiazzo y col., 2007). El primer paso en la determinación de la concentración sérica de E2 y T fue la extracción de los esteroides del suero. La extracción se realizó a partir de 600 µl (E2) ó 200 µl (T) de suero y usando éter etílico como solvente (Merck®, Buenos Aires, Argentina). El protocolo de extracción utilizado consistió de 3 extracciones sucesivas, separando la fase orgánica en cada una (Lacau- Mengido y col., 2000, Kass y col., 2004). Las fracciones orgánicas de cada muestra se juntaron y evaporaron a sequedad. El extracto seco se resuspendió en PBS durante 1:30 h en baño térmico.

Se utilizó E2 y T marcados con tritio, obtenido comercialmente ([2,4,6,7,16,17-H3]-E2 ó T-[1,2,6,7-3H (N)], PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA, USA). Los anticuerpos específicos fueron provistos por el Dr. G.D. Niswender.

Los tubos de reacción se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se adicionó carbón-dextrán (0,5%-0,05%) (Sigma) y se incubó 10 min con agitación periódica. Se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 10 min con el objeto de separar el carbón-dextrán. Se tomaron 200 µl del sobrenadante y se homogeneizaron con líquido de centelleo (PerkinElmer). La radioactividad se leyó en un contador de centelleo (WinSpectral, PerkinElmer). En todos los ensayos se evaluaron sueros controles valorados.

Además, se hicieron pruebas para determinar la eficiencia de la extracción. Para ello se adicionó una cantidad conocida de hormona marcada con tritio a 600 µl de suero, se sometió al proceso de extracción y luego el extracto seco se resuspendió en PBS. Esta solución se mezcla luego con el líquido de centelleo y se midió la cantidad de cuentas recuperadas. Los resultados de los diferentes ensayos fueron corregidos según la recuperación calculada.

La sensibilidad del análisis fue de 0,4 ng/ml y 1,6 pg/ml para T y E2, respectivamente. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron respectivamente de 6,96% y 10,44% para T y de 3,6% y 11,0% para E2.

4.- Experimento 3:

Respuesta ovárica a un estímulo gonadotrófico en corderas expuestas a DES ó BPA

4.1.- Diseño experimental

Del mismo modo que en el experimento 2, luego del nacimiento e identificación, las corderas fueron asignadas al azar a alguno de los siguientes tratamientos postnatales desde DPN 1 a DPN 30: 1) Control: aceite de maíz (vehículo) (n=12 corderas); 2) DES (Sigma) dosis: 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ (n=9); 3) BPA50 (99% pureza, Aldrich) 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ (n=11); 4) BPA0.5 dosis: 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ (n=9). Este último grupo de BPA se incorporó al trabajo para evaluar los efectos de una dosis de BPA 100 veces menor a la dosis segura (Figura17). El protocolo de administración de xenoestrógenos y la vía utilizada fue la misma que para el Experimento 2.

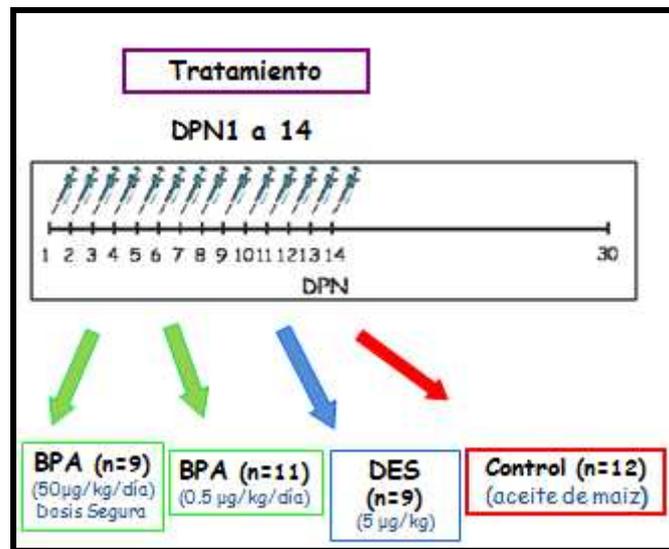


Figura 17: Diseño de exposición a xenoestrógenos del Experimento 3: El diseño resulta similar al diseño del experimento 2 con el agregado de un grupo de animales expuestos a una dosis de BPA 100 veces menor a la dosis segura (BPA0.5: 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

A partir del DPN 30 todos los animales fueron inyectados con 6 (seis) dosis iguales de oFSH (Ovagen®, ICPbio Ltd, Auckland, New Zealand, Figura 18). La FSH ovina fue administrada cada 12 horas durante 3 días consecutivos vía intramuscular a las 08:00 y 20:00 horas a razón de 1,46 mg por dosis. Cada cordera recibió una dosis total de 8,8 mg de oFSH. Este tratamiento fue adaptado del protocolo de estimulación ovárica para la obtención de ovocitos (JIVET) en DPN 30 en corderas prepuberales (Ptak y col. 1999).

A las 40 horas de la última inyección de oFSH se expusieron los ovarios por laparotomía medial (DPN 34) bajo anestesia general siguiendo los mismos procedimientos detallados para el experimento 1 (ver sección 2.1).

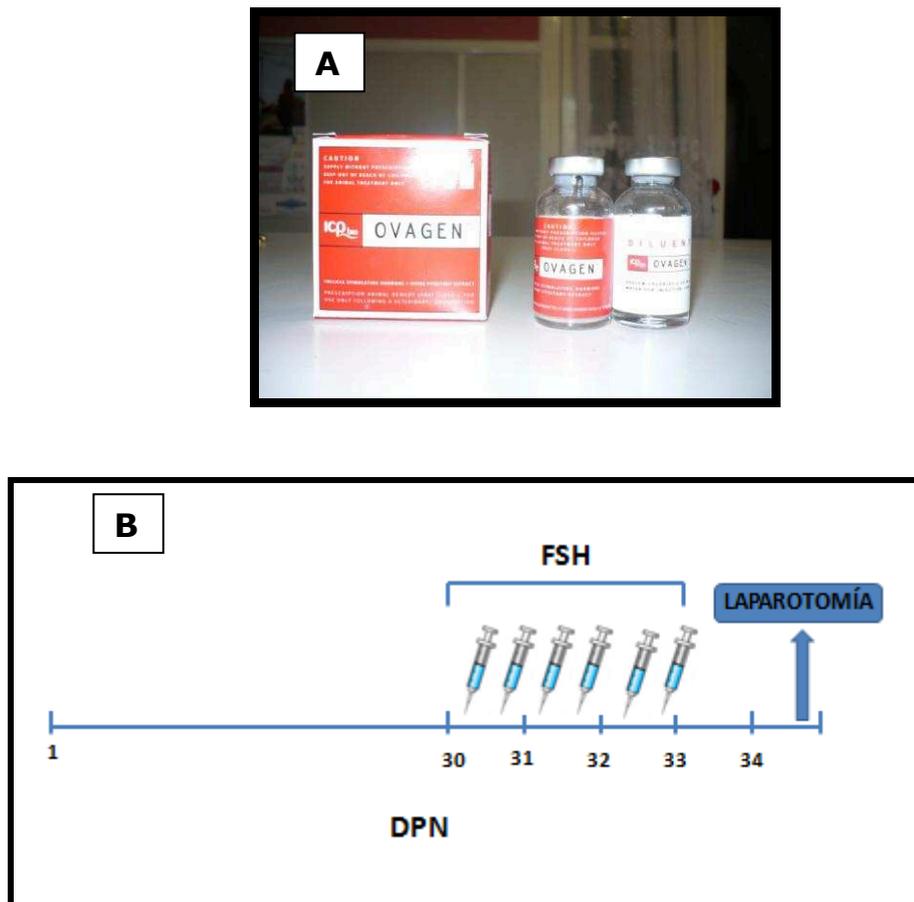


Figura 18: Tratamiento de superestimulación ovárica con gonadotrofinas: A: preparado comercial de FSH ovina (Ovagen®, ICPbio Ltd, Auckland, New Zealand) utilizado para el tratamiento de superestimulación ovárica. B: Esquema del tratamiento con FSH. La misma fue administrada cada 12 horas durante 3 días consecutivos vía intramuscular a las 08:00 y 20:00 horas. Cada cordera recibió una dosis total de 8,8 mg de oFSH. La laparotomía exploratoria se realizó 40 hs después de la última administración de oFSH. (DPN: Día postnatal)

4.1.1.- Determinaciones

4.1.1.1.- Respuesta ovárica al estímulo gonadotrófico

Se contaron los folículos iguales o mayores a 2 mm de diámetro para establecer la respuesta a la estimulación gonadotrófica (DPN 34). Luego de la extracción de los ovarios éstos se procesaron como se describió anteriormente (ver sección 2.3). En los ovarios se estudió la población de folículos antrales saludables y atrésicos, y la expresión de $RE\alpha$, $RE\beta$, RA y Ki67 (como se describió oportunamente en la sección 2.4).

4.1.1.2.- Número de folículos atrésicos

Se utilizó el mismo criterio adoptado en el Experimento 2 para definir a los folículos antrales atrésicos (ver sección 3.1.5.2). Se contaron los folículos antrales atrésicos en 2 cortes de cada ovario de 5 animales diferentes de cada grupo experimental.

4.1.1.3.- Receptores de hormonas esteroides ováricos

Se utilizaron los mismos procedimientos y la misma metodología descrita en la secciones 2.3 y 2.4 para estudiar la expresión de receptores de hormonas esteroides (RE α , RE β , RA). La evaluación se realizó en forma cualitativa: negativo (-), levemente positivo (-/+), débilmente positivo (+), positivo (++) y fuertemente positivo (+++ y ++++), analizándose su expresión en 2 cortes efectuados a dos profundidades diferentes en cada ovario.

3.1.1.4.- Niveles séricos de E2

Se tomaron muestras de sangre periférica y se obtuvo el suero (de acuerdo al procedimiento ya descrito en la sección 3.1.3). Las muestras de suero se obtuvieron antes de la primera inyección de oFSH (C0) en el DPN 30 y antes de la última (C2) en el DPN 32. En todas estas muestras se evaluaron los niveles séricos de E2.

Para determinar el nivel sérico de E2 en esta etapa del trabajo se utilizó el kit ULTRA-SENSITIVE ESTRADIOL RIA DSL4800 (Beckman Counter, Inc.®), para lo cual se siguieron las recomendaciones del fabricante. La utilización de este kit en relación a la metodología descrita en el punto 3.1.7 presentó tres ventajas. Por un lado permitió realizar el análisis con un volumen menor de suero, evitó el proceso de extracción y finalmente permitió alcanzar una sensibilidad de 2,2 pg.

5.- Análisis Estadísticos

Todos los datos fueron calculados como el promedio \pm SEM. Se realizó un análisis Kruskal-Wallis para obtener el grado de significación (testando la hipótesis de que la respuesta no fue homogénea a lo largo de los tratamientos). Se usó el post test de Dunn post hoc para comparar cada grupo experimental con el grupo control y para asignar la significación. Como significativo fue aceptado un valor de $P < 0.05$.

El análisis del peso ovárico entre los grupos experimentales fue realizado comparando el peso ovárico (g)/peso de la cordera (kg).

