

IV.- Resultados

1.- Experimento 1. Ontogenia de receptores de hormonas esteroides ováricas: Expresión de RE α , RE β y RA durante el desarrollo neonatal del ovario de la oveja.

Con el objeto de conocer la expresión de tres receptores de hormonas esteroides importantes para la funcionalidad ovárica, estudiamos la ontogenia de la expresión de RE α , RE β y RA durante el primer mes de vida de las corderas. La evaluación se realizó por IHQ en los DPN 1, 5, 10 y 30. Durante esta etapa del desarrollo ovárico se observaron diferentes patrones de expresión de estos receptores tanto en el compartimento ovárico medular como en el cortical tal como se detalla en la **Tabla 4**. Al estroma cortical se lo reconoció por la presencia de una alta densidad de células estromales, folículos primordiales, folículos tempranos en crecimiento y baja densidad de pequeños vasos sanguíneos (Delgado-Rosas y col., 2009). En la corteza, se detectó expresión proteica de receptores hormonales en el estroma y en las diferentes células foliculares: células tecaes, células de la granulosa y en los ovocitos.

Tabla 4: Expresión neonatal de RE α , RE β y RA en el ovario de la cordera.

	DPN 1	DPN 5	DPN 10	DPN 30
REα				
Médula	++	+++	-/+	-
Estroma Cortical	+	-/+	-	-
Fol. Primordiales	-	-	-	-
Fol. en Crecimiento	+	-	-	-
Ovocitos	-	-	-	-
REβ				
Médula	++	+++	+++	+
Estroma Cortical	++	+++	+++	++
Fol. Primordiales	+	+++	+++	+++
Fol. en Crecimiento	-	+++	+++	+++
Ovocitos	-	+++	+++	+++
RA				
Médula	+++	+++	+++	+++
Estroma Cortical	++	+++	+++	++
Fol. Primordiales	++	++	+	-
Fol. en Crecimiento	+++	+++	+++	+++
Ovocitos	++	+++	++	+

1.1.- Receptor de Estrógeno alfa (RE α)

La mayoría de las células en la médula mostraron expresión positiva de RE α en los DPN 1 y 5, mientras que se encontraron pocas células positivas en el estroma cortical en esos mismos días del desarrollo postnatal. No se observó expresión de RE α

en folículos primordiales, y hubo una baja expresión en las células de la granulosa de folículos preantrales en el DPN 1. En el DPN 10 se verificó una disminución en la expresión de RE α siendo negativa en todos los compartimentos celulares para el DPN 30 (Fig. 19).

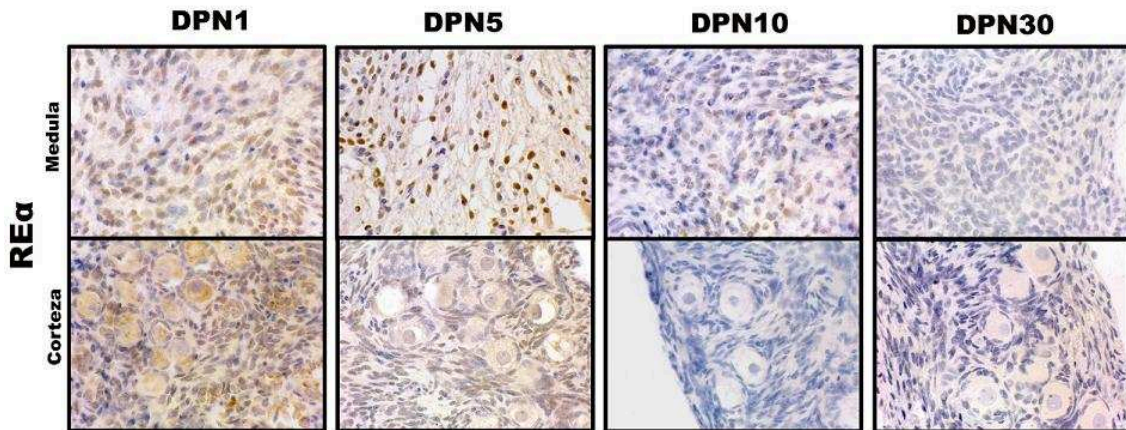


Figura 19: Expresión de RE α en médula y corteza de ovarios de corderas obtenidos los DPN 1, DPN 5, DPN 10 y DPN 30. Magnificación: 600X

1.2.- Receptor de Estrógeno beta (RE β)

La expresión de RE β se incrementó desde el DPN 1 al DPN 10, en todos los compartimientos celulares. En el DPN 1 se detectó una baja expresión de RE β en células de la granulosa de folículos primordiales, y desde el DPN 5 al DPN 30 se observó una alta expresión de RE β en ovocitos y en células de la granulosa de folículos primordiales y folículos en crecimiento (Fig. 20). En el DPN 30 se observó una disminución, principalmente, en la región medular y en las células del estroma cortical.

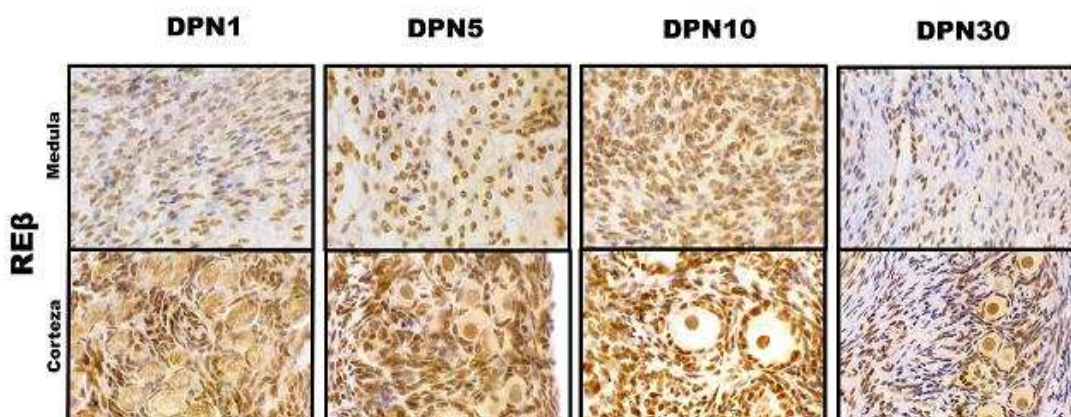


Figura 20: Expresión de RE β en médula y corteza de ovarios de corderas obtenidos los DPN 1, DPN 5, DPN 10 y DPN 30. Magnificación: 600X.

1.3.- Receptor de Andr6genos (RA)

El RA mostr6 una alta expresi3n en el estroma medular desde el DPN 1 al DPN 30. En el estroma cortical tambi3n se observ6 una alta expresi3n de RA que disminuy6 levemente en el DPN 30. En las c3lulas de la granulosa de los fol6culos en crecimiento se verific6 una alta expresi3n de RA en todos los momentos estudiados. La mayor expresi3n de RA en fol6culos primordiales se observ6 en los DPN 1 y 5, disminuyendo gradualmente hacia el DPN 30 (Fig.21).

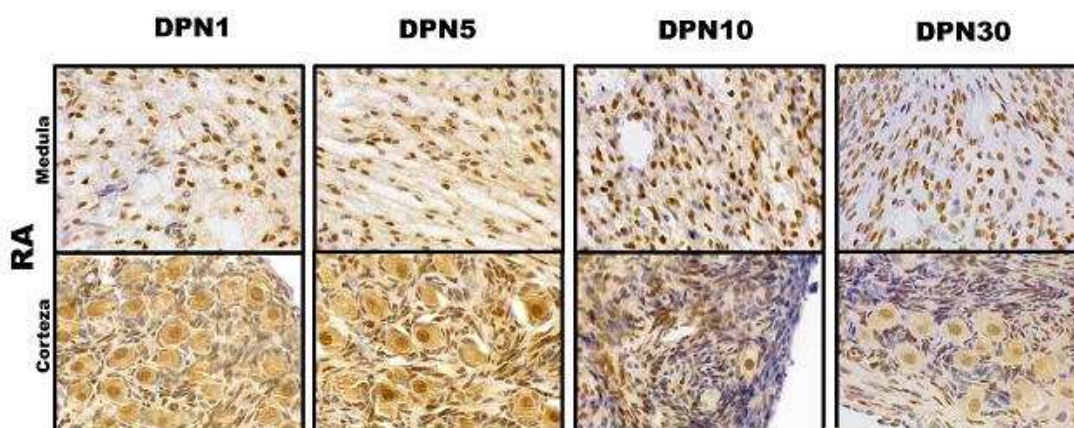


Figura 21: Expresi3n de RA en m3dula y corteza de ovarios de corderas obtenidos los DPN 1, DPN 5, DPN 10 y DPN 30. Magnificaci3n: 600X.

2.- Experimento 2: Exposici3n neonatal a xenoestr6genos y su efecto en el ovario

Durante el desarrollo de los experimentos de exposici3n neonatal a xenoestr6genos, no se observaron signos de toxicidad aguda o cr3nica en las corderas tratadas. Tampoco se observaron diferencias en la ganancia de peso entre los animales expuestos a xenoestr6genos y los controles.

Tal como describimos en M&M, se utiliz6 un modelo de exposici3n neonatal a xenoestr6genos, durante las primeras dos semanas de vida de las corderas. Los animales fueron expuestos a los xenoestr6genos BPA y DES. Luego de la exposici3n, los animales se mantuvieron hasta el DPN 30 donde se realizaron diferentes evaluaciones. A manera de resumen, se detectaron cambios en el peso ov3rico, en la din3mica folicular y en la expresi3n de marcadores relacionados con la proliferaci3n celular y la atresia folicular. La exposici3n neonatal a xenoestr6genos no afect6 la expresi3n de receptores esteroides ($RE\alpha$, $RE\beta$ y RA) y los niveles de E2 y T, en el DPN 30.

2.1.- Peso ovárico en corderas expuesta a DES ó BPA

Para evaluar, de manera más precisa, el efecto de la exposición neonatal a DES ó BPA sobre el peso ovárico se ajustó el mismo de acuerdo a la variación en el peso de las cordera. Siguiendo este criterio, los datos fueron analizados y expresados como la relación peso del órgano en función del peso vivo del animal (promedio \pm SEM). La exposición neonatal a BPA disminuyó el peso de los ovarios de las corderas en el DPN 30 (Control: $0,036 \pm 0,005$, BPA: $0,018 \pm 0,019$, $p < 0,05$), mientras que, sin bien se verificó una tendencia similar, el peso de los ovarios no fue afectado en las corderas expuestas a DES (DES: $0,029 \pm 0,006$) (Fig.22).

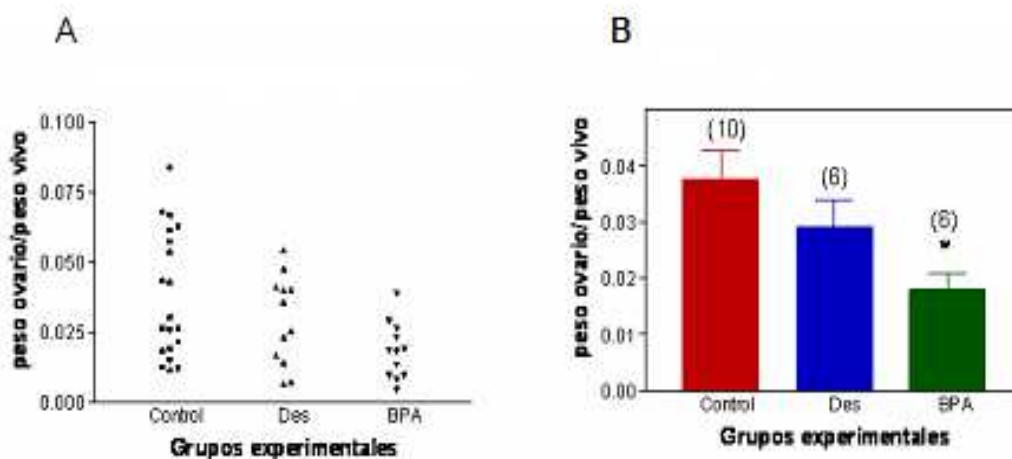


Figura 22: Relación peso ovario/peso vivo en el DPN 30 de corderas expuestas a xenoestrógenos y controles. A: El gráfico muestra la distribución de la relación peso ovario/peso vivo del animal entre los grupos experimentales. **B:** Los mismos resultados expresados en gráfico de barras (* indica diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$).

Cabe destacar que si bien se detectó una disminución en el peso ovárico en las corderas tratadas con BPA, no se registraron diferencias en el número total de folículos ováricos (Control: 28930 ± 3621 , DES: 24333 ± 2962 , BPA: 27040 ± 5630) (Fig. 23).

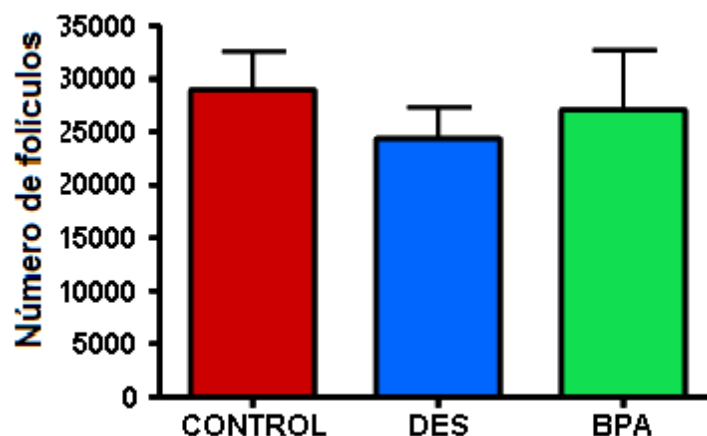


Figura 23: Número de folículos totales en los distintos grupos experimentales. La disminución observada en el peso ovárico en las corderas expuestas a BPA o DES no afectó el número total de folículos ováricos en los diferentes grupos experimentales en el DPN 30.

2.2.- Los ovarios de las corderas expuestas a xenoestrógenos mostraron alteraciones en la dinámica folicular

La Fig. 34 muestra los porcentajes de los diferentes tipos foliculares en corderas controles y expuestas a xenoestrógenos correspondientes al DPN 30. Los ovarios controles presentaron aproximadamente un 60% de folículos primordiales, mientras que las corderas tratadas con DES ó BPA presentaron un porcentaje menor (38% y 47%, respectivamente; $p < 0.05$). Esta reducción en la población de folículos primordiales estuvo asociada a un incremento en las dos categorías subsiguientes de folículos en crecimiento (folículos de transición y primarios). Por lo tanto, la exposición a DES o BPA durante este periodo estimuló el proceso de reclutamiento inicial (activación) y disminuyó la reserva de folículos primordiales.

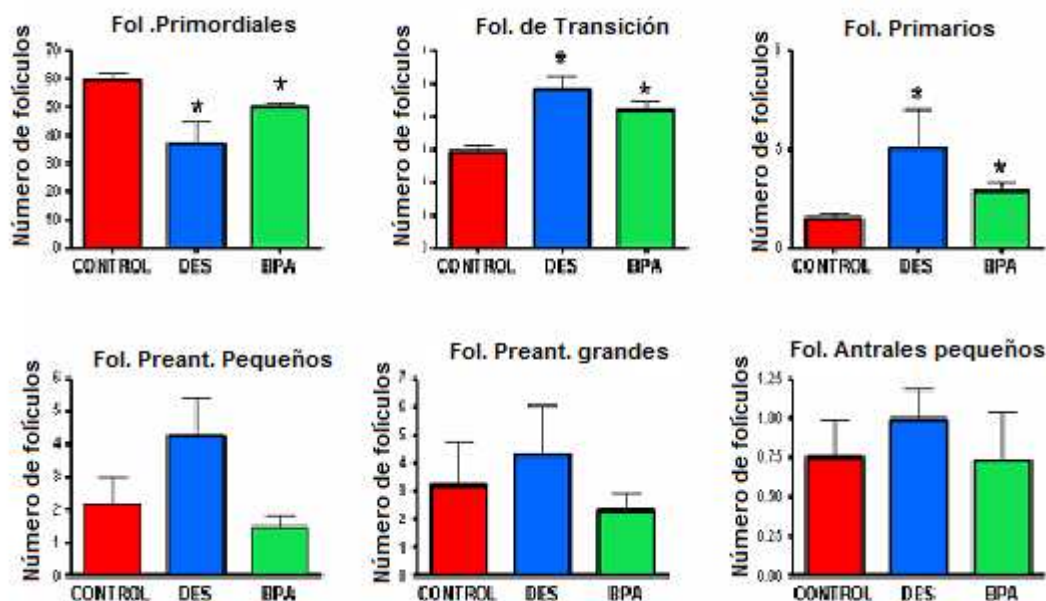


Figura 24: Incidencia de las diferentes poblaciones de folículos ováricos entre los diferentes grupos experimentales. La exposición postnatal a DES o BPA estimuló el proceso de activación y disminuyó la reserva de folículos primordiales en el ovario de corderas en el DPN 30. (* indica diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

2.2.1.- Aumento en la incidencia de folículos multiovulares (FMOs).

Los FMOs usualmente presentan dos o tres ovocitos dentro del mismo folículo, los ovocitos son similares en tamaño entre sí y se los observa saludables bajo microscopía óptica de transmisión. La gran mayoría de las veces se los encuentra en estadio de folículo primordial rodeados de una capa plana de células de la granulosa y es menos frecuente observarlos en otros estadios de crecimiento folicular (Fig. 25).

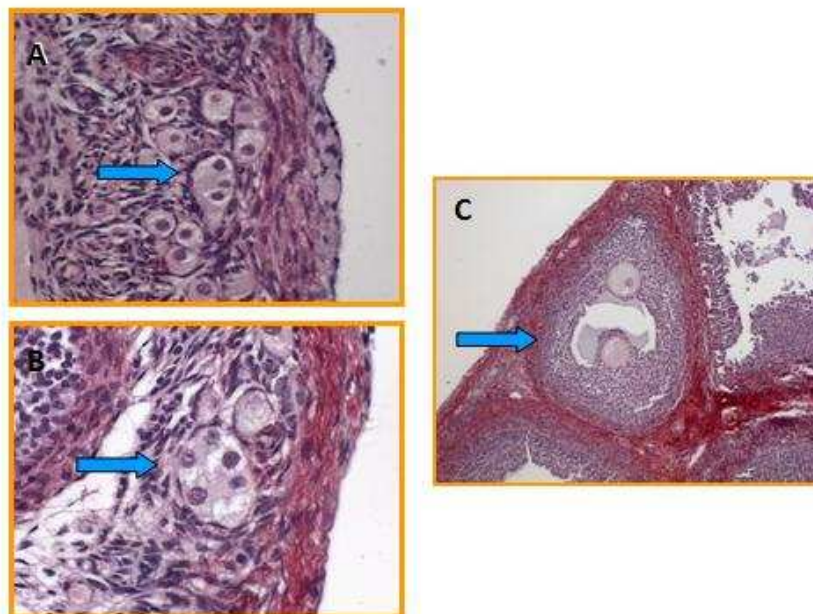


Figura 25: Fotomicrografías representativas de ovarios de corderas mostrando los tipos de FMOs más frecuentes. Folículo primordial con tres (A) o cinco (B) ovocitos en un mismo folículo y FMO con dos ovocitos (C) en estadio de folículo antral pequeño. Magnificación: 400X.

Al evaluar la incidencia de FMOs en las corderas controles detectamos que en promedio éstos no superan el 5% de los folículos evaluados. En los animales expuestos a xenoestrógenos se observó un incremento en la incidencia de FMOs (control: $4,5 \pm 1,10$, DES: $9 \pm 2,04$, BPA: $20 \pm 3,99$), que fue significativo sólo en los animales expuestos a BPA. Este resultado estaría indicando que el tratamiento alteró el proceso de ensamblado folicular lo que origina la formación de estas estructuras foliculares particulares (Fig. 26).

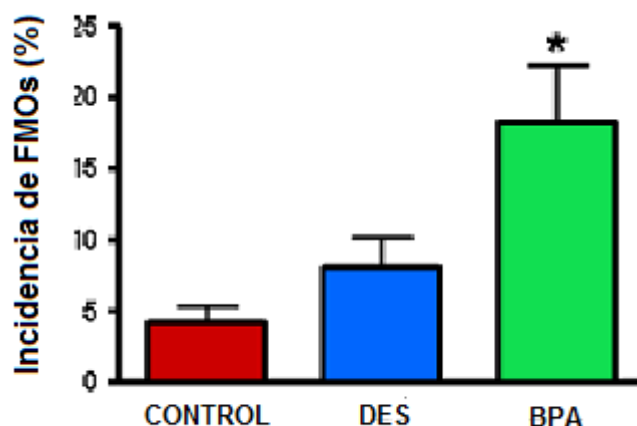


Figura 26: Incidencia de folículos multiovulares (FMOs) en los ovarios de corderas expuestas neonatalmente a DES o BPA. El gráfico muestra el porcentaje de FMOs en relación al número total de folículos. Los datos se expresan como el promedio \pm SEM. El asterisco denota $p < 0.05$ vs control.

2.3.- Proliferación celular, expresión de p27 y atresia folicular.

2.3.1.- La expresión de Ki67 (marcador de proliferación celular).

La inmunomarcación de esta proteína estuvo limitada al núcleo celular (Fig. 28A-C). La expresión de Ki67 se observó en células de la granulosa y de la teca de los folículos preantrales (grandes y pequeños) en todos los grupos experimentales. Las células de la granulosa mostraron los porcentajes más altos de proliferación, alcanzando valores promedio del 10% en los folículos preantrales grandes y antrales pequeños de los animales controles. Por su parte los porcentajes de proliferación de las células de la teca no superaron el 1% en las corderas controles. En general, la exposición a xenoestrógenos aumentó la proliferación celular, en determinados estadios foliculares. Los ovarios de las corderas expuestas a BPA mostraron un mayor porcentaje de proliferación en las células de la granulosa y de la teca de los folículos antrales pequeños (Figs. 27B y 28). En las corderas expuestas a DES se observó un incremento en el porcentaje de proliferación de las células de la granulosa en folículos preantrales grandes (Fig. 27A), mientras que en folículos pequeños antrales hubo un alto porcentaje de proliferación que no llegó a alcanzar significación estadística (Figs. 27B y 28).

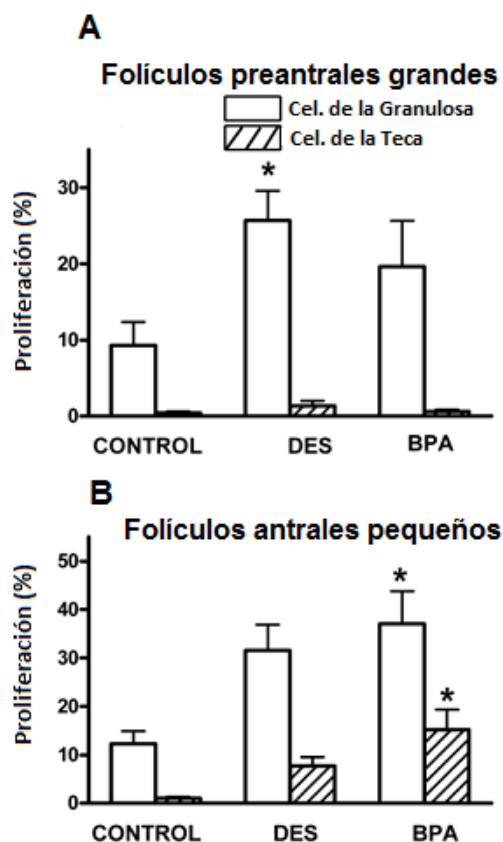


Figura 27: Exposición neonatal a DES ó BPA y proliferación de las células de la granulosa y de la teca en folículos preantrales grandes (A) y en folículos antrales pequeños (B) de ovarios de corderas

en DPN 30. La expresión inmunohistoquímica de Ki67 se usó como marcador de proliferación celular. Los resultados se expresaron como porcentaje de núcleos inmunomarcados en cada subtipo celular. Los folículos atrésicos fueron excluidos en la cuantificación de Ki67. El asterisco señala $p < 0.05$ vs control.

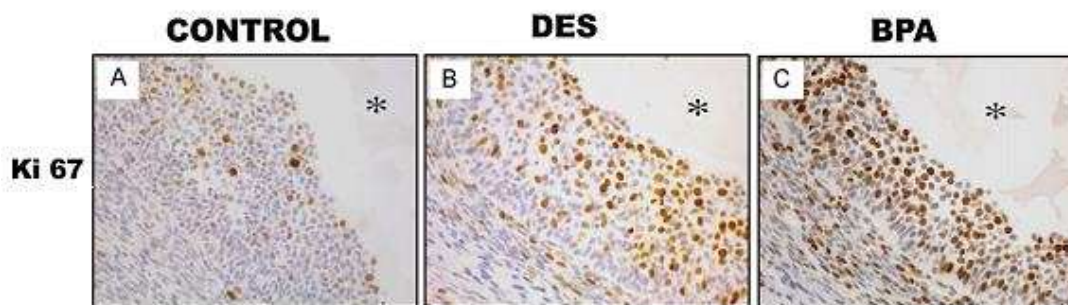


Figura 28: Efecto de la exposición neonatal a DES ó BPA sobre la expresión de Ki67 (marcador de proliferación celular) en folículos ováricos de corderas de DPN 30. Fotomicrografías representativas de secciones ováricas inmunomarcadas con anticuerpos específicos contra Ki67 mostrando positividad nuclear en células de la granulosa y/o células de la teca en folículos antrales pequeños. (A) Se observó expresión de Ki67 en células de la granulosa y teca de folículos en crecimiento. (C) Las corderas expuestas a BPA presentaron mayor proliferación en ambos compartimentos celulares. El asterisco (*) indica la ubicación de la cavidad llena de fluido (antrum). Magnificación: 600X.

2.3.2.- Expresión de p27

La innumeración de p27 estuvo limitada al núcleo celular de células de la granulosa y ovocitos de todos los estadios foliculares (Fig. 30D-F). La marcación de p27 se localizó diferencialmente en las capas de células de la granulosa, ya que se detectó -preferentemente- en las capas basales (Fig. 30). En la Fig. 29 se muestran los resultados de la incidencia de células marcadas con p27, específicamente, en los folículos antrales pequeños. Tanto los animales expuestos a DES como a BPA presentaron una mayor expresión de p27 en las células de la granulosa de estos folículos (Fig. 29 y 30). Las células de la teca también expresaron p27 pero sin diferencias entre los grupos experimentales.

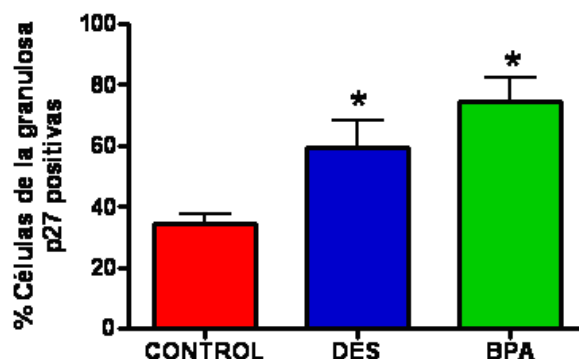


Figura 29: Expresión de p27 en células de la granulosa de folículos antrales pequeños en ovarios de corderas en DPN 30. Tanto los animales expuestos a DES como a BPA presentaron una mayor expresión de p27 en las células de la granulosa. El asterisco señala $p < 0.05$ vs control.

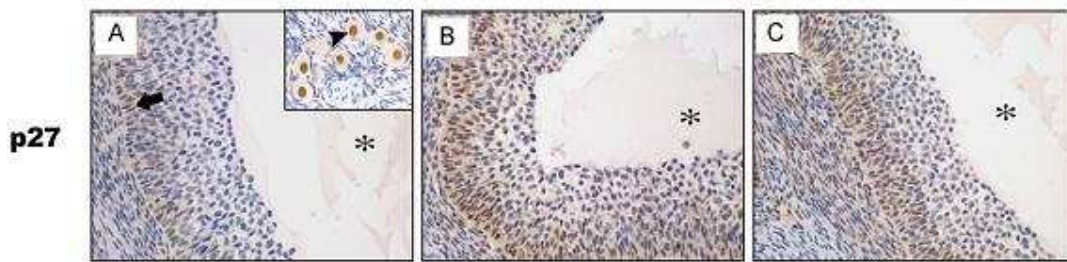


Figura 30: Exposición neonatal a DES ó BPA y expresión del inhibidor de ciclina dependiente de kinasa 1B (p27) en folículos ováricos de corderas de DPN 30. Fotomicrografías representativas de secciones ováricas inmunomarcadas para p27. Se detectó inmunomarcación nuclear en células de la granulosa, la teca y en ovocitos en folículos de diferentes estadios de maduración. (A) Expresión de p27 en el núcleo de ovocitos (inset, ovocitos inmunomarcados a mayor aumento en folículos primordiales) y células de la granulosa de folículo antral pequeño (la flecha indica la capa celular con mayor expresión). (B, C) Las corderas expuestas a DES ó BPA aumentaron la expresión de p27 en las células de la granulosa. El asterisco (*) indica la ubicación de la cavidad llena de fluido (antrum). Magnificación: 600X. Magnificación inset: 1000X.

2.3.3.- Incidencia de folículos atrésicos.

La identificación de los folículos atrésicos se realizó teniendo en cuenta que fueran folículos con un porcentaje de células de la granulosa positivas para Ki67 menor al 1%, de acuerdo a lo definido por Jolly y col. (1997). Los resultados de esta cuantificación mostraron que tanto DES como BPA promovieron un aumento en el porcentaje de folículos antrales atrésicos en el DPN 30 (Fig. 31).

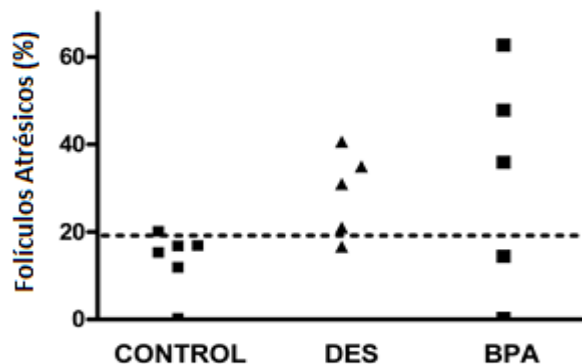


Figura 31: Efecto de la exposición neonatal a DES ó BPA sobre la atresia de folículos antrales en ovarios de corderas de DPN 30. Se graficaron los porcentajes de folículos atrésicos en cada cordera de cada grupo experimental. La línea cortada representa el porcentaje más alto de folículos atrésicos hallado en una cordera control. La mayoría de los animales expuestos a DES o BPA mostraron un porcentaje de folículos atrésicos más alto que el de las corderas controles.

2.4.- Efectos sobre la expresión de receptores esteroides y la esteroidogénesis ovárica.

2.4.1.- Expresión inmunohistoquímica de RE α , RE β y RA.

Como señalamos en el punto 1.1 de esta sección, en ovarios de corderas control en el DPN 30 la expresión de RE α fue negativa en todos los compartimentos tisulares (Fig. 19), mientras que se observó expresión de RE β y RA en el estroma medular y en las células corticales ováricas (Fig. 20 y 21). Las corderas expuestas neonatalmente a DES o BPA no presentaron cambios en el patrón de tinción de RE α , RE β y RA (Fig. 32).

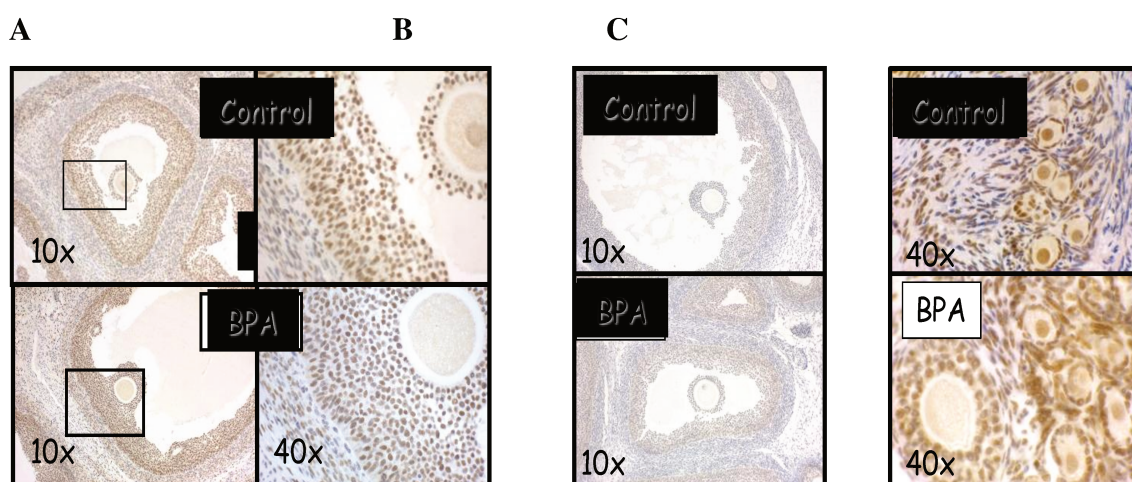


Figura 32: Expresión de RA (A) RE α (B) y RE β (C) en folículos ováricos de corderas (DPN 30) control y expuestas neonatalmente a BPA. Las corderas expuestas neonatalmente a BPA no presentaron cambios en el patrón de tinción de RE α , RE β y RA.

2.4.2.- Niveles séricos de E2 (estradiol) y T (testosterona).

Los efectos de la exposición a xenoestrógenos sobre la actividad esteroidogénica del ovario fueron investigados a través de los niveles séricos de E2 y T de las corderas en el DPN 30. La exposición a xenoestrógenos no alteró los niveles séricos de E2 (Control: 15,24 \pm 1,65 pg/ml, DES: 17,84 \pm 1,88 pg/ml, BPA: 14,38 \pm 1,44 pg/ml). Tampoco se detectaron cambios en los niveles de T (Control: 0,152 \pm 0,011 ng/ml, DES: 0,137 \pm 0,013 ng/ml, BPA: 0,125 \pm 0,008 ng/ml) (Fig. 33).

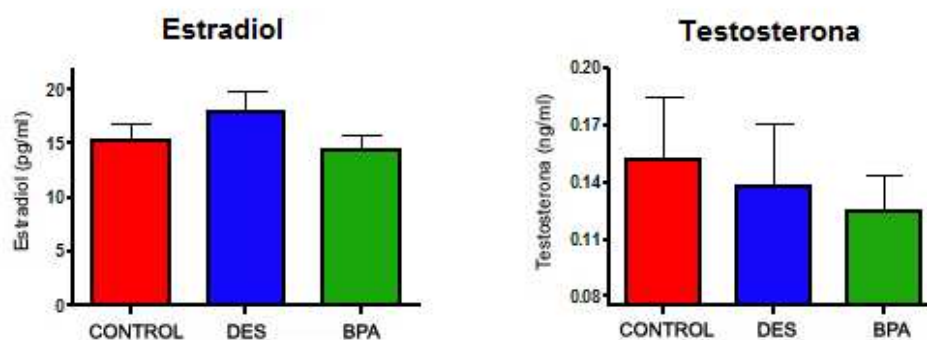


Figura 33: Concentración sérica de estradiol y testosterona en corderas control y tratadas con DES ó BPA en el DPN 30. La exposición neonatal a estos xenoestrógenos no alteró los niveles séricos de estradiol ó testosterona.

3.- Experimento 3. Respuesta ovárica a un estímulo gonadotrófico en corderas expuestas neonatalmente a xenoestrógenos

Este experimento fue diseñado para evaluar la funcionalidad ovárica, para lo cual se usó un esquema de estimulación gonadotrófica con FSH en corderas de 30 días de edad. Es importante resaltar, que para esta etapa del trabajo, estudiamos la respuesta ovárica utilizando dos grupos de corderas expuestas a diferentes dosis de BPA. Un grupo se trató con la misma dosis que usamos en el experimento 2 (definida como BPA50), y el nuevo grupo de animales fue expuesto a una dosis 100 veces menor de BPA (definida como BPA0.5: 0,5 μg /kg/día).

3.1.- Número de folículos ováricos en respuesta al estímulo gonadotrófico

La Fig. 34 muestra la apariencia de los ovarios de corderas sin estímulo gonadotrófico (A) y los correspondientes a las que recibieron el tratamiento con oFSH (B). Como era de esperar las corderas sin tratamiento gonadotrófico presentan ovarios de tamaño pequeño, rosados y con escaso desarrollo folicular. Por el contrario, la cordera sometida a estímulo con oFSH presentaron una marcada respuesta al tratamiento que fue comparable al descrito por Kelly y col. (2005) para corderas de 4 a 8 semanas de edad. Esta respuesta se evidencia por ovarios significativamente más grandes, altamente hemorrágicos y que, a simple vista, muestran la presencia de un gran número de folículos desarrollados (de 3 a 8 mm de diámetro) en la superficie del ovario.

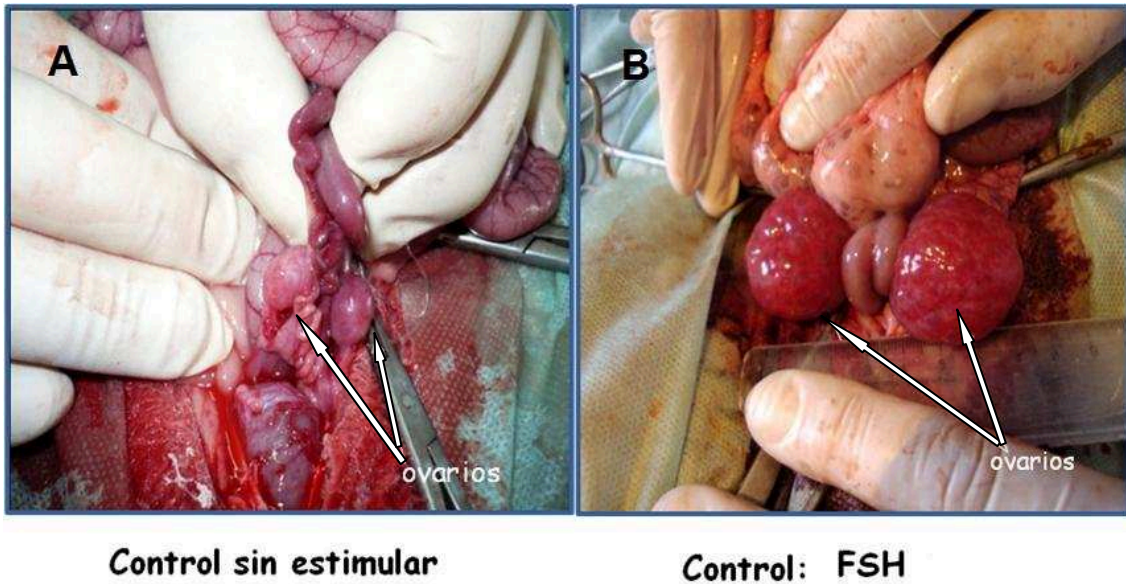


Figura 34: Fotografías representativas del aspecto macroscópico de ovarios de corderas control sin estimular (DPN 30) vs las estimuladas con oFSH (DPN 34). Los ovarios de las corderas estimuladas con oFSH (B) son comparativamente mucho más grandes y con desarrollo de gran número folículos sobre la superficie ovárica comparado con los ovarios de las corderas que no recibieron el estímulo gonadotrófico (A).

Cuando estudiamos la respuesta ovárica al estímulo gonadotrófico en dos grupos de corderas expuestas con diferentes dosis de BPA observamos que los animales expuestos a ambas dosis presentaron un menor número de folículos antrales ≥ 2 mm ($C=77,6\pm 8,8$, $DES=43,5\pm 11,9$; $BPA50=27,5\pm 10,7$, $p<0.01$; $BPA0.5=28,2\pm 9,3$, $p<0.05$) (Fig. 35).

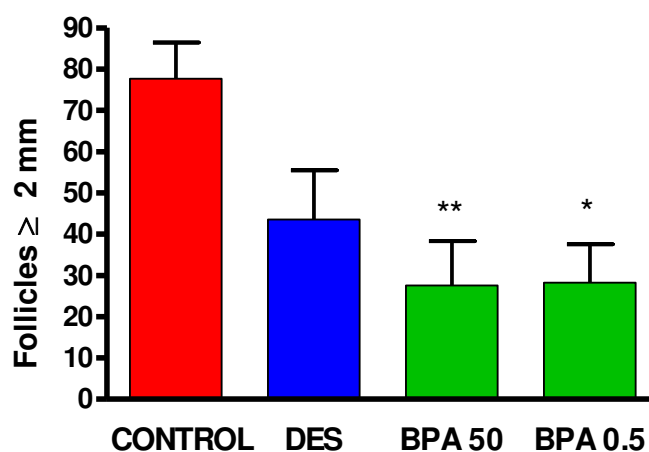


Figura 35: Número de folículos ≥ 2 mm en corderas expuestas neonatalmente con xenoestrógenos y tratadas con oFSH. Se observa un menor número de folículos mayores a 2 mm en las corderas expuestas a ambas dosis estudiadas de BPA. Las corderas expuestas neonatalmente a DES mostraron también un menor desarrollo folicular aunque esta respuesta alterada no alcanzó a mostrar diferencias estadísticamente significativas (** $p<0.01$, * $p<0.05$).

En la Fig. 36 y 37 se presenta el aspecto de los ovarios de una cordera control estimulada con oFSH en comparación con el de aquellas tratadas neonatalmente con DES ó BPA y luego estimuladas con oFSH. En la laparotomía exploratoria de las corderas expuestas a estos xenoestrógenos los ovarios son más chicos y de color rosado pálido. Las corderas expuestas a BPA (C) muestran una menor respuesta al estímulo gonadotrófico, lo propio ocurre con las expuestas a DES (B), aunque las diferencias en este último caso no alcanzan a ser estadísticamente significativas (Fig 36).

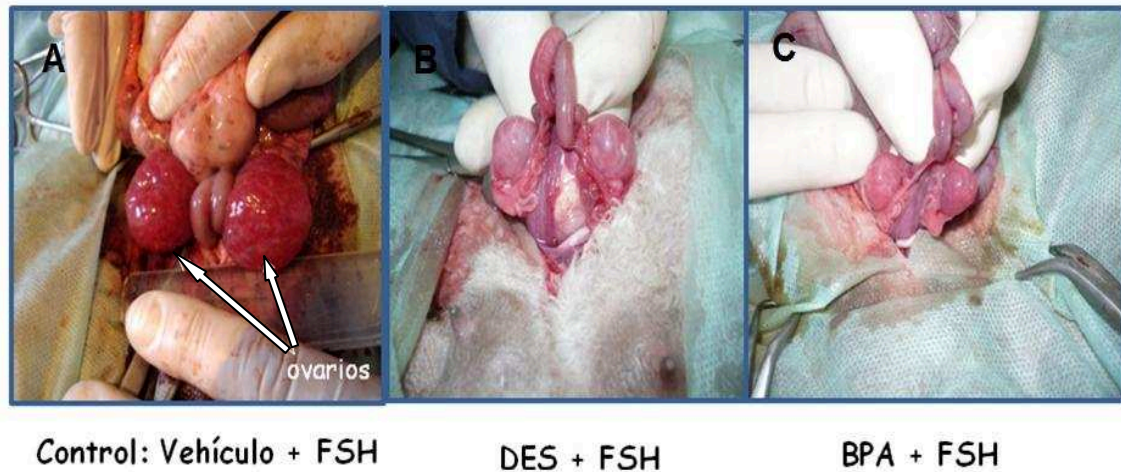


Figura 36: Fotografías representativas de ovarios de una cordera control (A) y de corderas expuestas neonatalmente a xenoestrógenos DES (B) y BPA (C) que posteriormente fueron estimuladas con oFSH (DPN 34). Las corderas expuestas a BPA (C) muestran una menor respuesta al estímulo gonadotrófico, lo mismo ocurre con las expuestas a DES (B) aunque las diferencias en este caso no alcanzan a ser estadísticamente significativas.

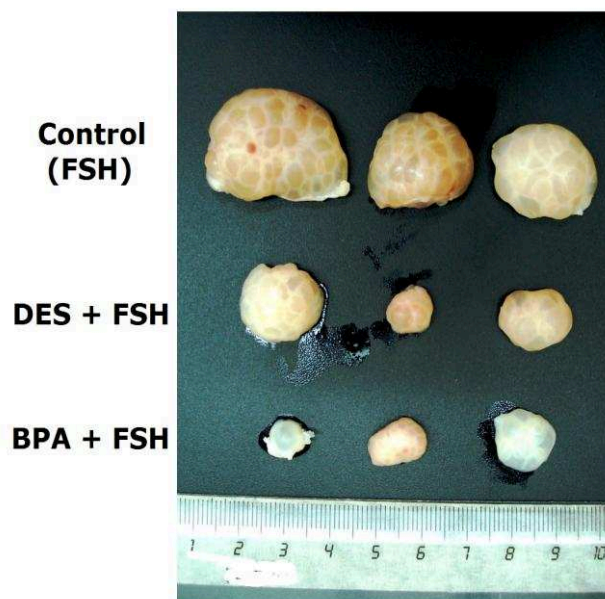


Figura 37: Fotografías representativa de ovarios (luego de ser sometidos a fijación en formol) de corderas del grupo control estimuladas con oFSH y de aquellas expuestas neonatalmente a xenoestrógenos y posteriormente estimuladas con oFSH (DPN 34).

3.2.- Número de folículos atrésicos

Al igual que lo efectuado en el experimento 2, la identificación de los folículos antrales atrésicos se hizo considerando sólo aquellos folículos que presentaban un porcentaje de células de la granulosa para Ki67, menor al 1%. Los resultados de la cuantificación indicaron que los animales expuestos a ambos xenoestrógenos mostraron un menor número de folículos antrales atrésicos (Fig. 38)

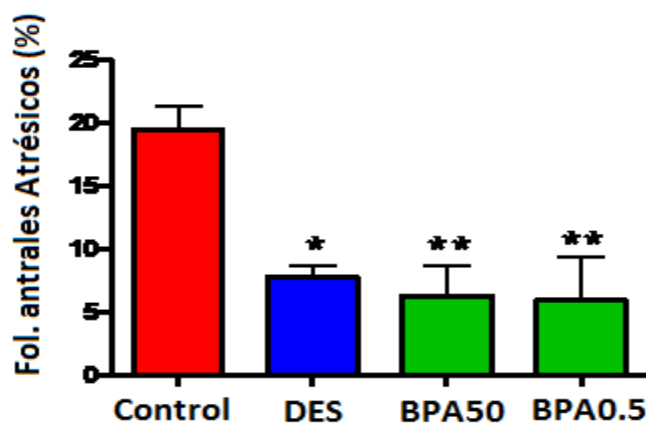


Figura 38: Porcentaje de folículos atrésicos en animales controles y expuestos a xenoestrógenos, todos tratados con oFSH. Los animales expuestos a DES ó BPA presentaron menor porcentaje de folículos antrales atrésicos. Un asterisco señala $p < 0.05$ y dos asteriscos indican un $p < 0.01$.

3.3.- Expresión de receptores esteroides

Se realizó una evaluación cualitativa de la expresión de receptores esteroides en los diferentes grupos experimentales. En corderas control en el DPN 30 no se detectó expresión de $RE\alpha$ en las células de la granulosa ni de la teca, mientras que ocurrió una alta expresión de $RE\beta$ y RA tanto en las células de la granulosa como en la teca (Tabla 5). Como comentamos previamente, la expresión de los receptores hormonales estudiados no se modificó frente a la exposición a DES ó BPA. En esta misma tabla se incluyen los animales expuestos a ambos xenoestrógenos (DPN 30) y además los sometidos a tratamiento con oFSH y obtenidos el día de la laparotomía exploratoria (DPN 34). En estos animales tratados con oFSH no se observaron diferencias en la expresión $RE\alpha$ y $RE\beta$ entre los diferentes grupos experimentales. Con respecto a la expresión de RA, en primer lugar se observó un aumento en la expresión tanto en células de la granulosa como de la teca en los animales controles estimulados con oFSH en relación a los controles sin estimular (C vs C+FSH). Sorpresivamente, se detectó una disminución en la expresión de RA en ambos compartimentos celulares,

tanto en células de la teca como de la granulosa, en los animales expuestos neonatalmente a xenoestrógenos y sometidos al tratamiento con oFSH (Fig. 39).

Por lo tanto, la inducción de RA que se observa en los animales controles estimulados con oFSH, no se detecta si los animales fueron expuestos a ambos xenoestrógenos. Adicionalmente, el nivel de RA detectado en estos animales fue menor a la expresión detectada en los animales controles que no fueron sometidos a estimulación con oFSH.

Tabla 5: Expresión de RE α , RE β y RA en folículos antrales de ovarios de corderas de los diferentes grupos experimentales.

	C*	DES*	BPA*	C + FSH**	DES + FSH**	BPA50 + FSH**
REα						
Granulosa	-	-	-	-	-	-
Teca	-	-	-	-	-	-
REβ						
Granulosa	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Teca	++	++	++	++	++	++
RA						
Granulosa	+++	+++	+++	++++	++	++
Teca	++	++	++	++	+	+

* PND 30, ** PND 34. (C) Control. DES y BPA, corderas tratadas neonatalmente con xenoestrógenos. (C+FSH) corderas controles estimuladas con oFSH y (DES+FSH, BPA50+FSH) corderas tratadas con xenoestrógenos y luego estimuladas con oFSH.

En la Fig. 39 se muestran fotomicrografías donde se observa una disminución en la expresión de RA en células de la granulosa y de la teca en el DPN 34 de animales expuestos a DES o BPA y estimulados con oFSH en comparación con los controles sin tratamiento y los controles estimulados con oFSH.

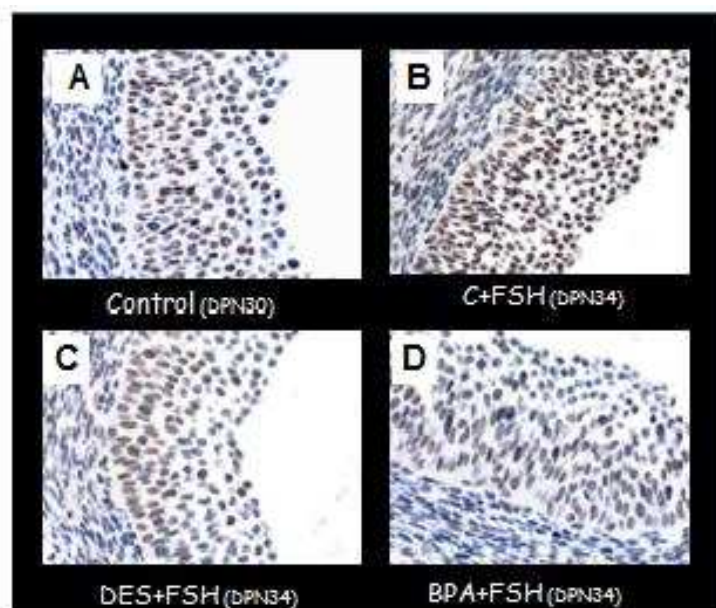


Figura 39: Expresión de receptor de andrógenos en ovario de corderas control (A), controles estimulados con oFSH (B) y animales expuestos a DES (C) ó BPA (D) y estimulados con oFSH. El tratamiento con oFSH indujo en las corderas control un aumento en la expresión de RA en las células de la teca y la granulosa. Esta inducción no se observó en los animales expuestos a xenoestrógenos, por el contrario, estos animales mostraron una menor expresión de RA que los controles sin estimulación con oFSH. Magnificación 600X.

3.4.- Efecto sobre la esteroidogénesis ovárica

Con el objetivo de evaluar si la esteroidogénesis ovárica se encuentra afectada por la exposición neonatal a xenoestrógenos, se determinaron los niveles de E2 sérico. Se determinó el nivel de E2 antes de comenzar el tratamiento con oFSH (C1) cuando los animales están en su PND 30 y en el momento en que las corderas reciben la última administración de oFSH (C2) (PND 32). Como era de esperar, las corderas controles que fueron sometidas a estimulación con oFSH presentaron un aumento en los niveles de E2 sérico a las 72 horas posteriores al inicio de la estimulación con oFSH (Fig. 40, C1 $3,3 \pm 2,3$ pg/ml vs C2 $44,3 \pm 18,8$ pg/ml del grupo control). Las corderas expuestas neonatalmente a DES y ambas dosis de BPA presentaron una respuesta ovárica alterada frente al estímulo gonadotrófico. Los niveles circulantes de E2 en las corderas expuestas a los xenoestrógenos, no mostraron diferencias entre los valores medidos antes y después del inicio del tratamiento con oFSH.

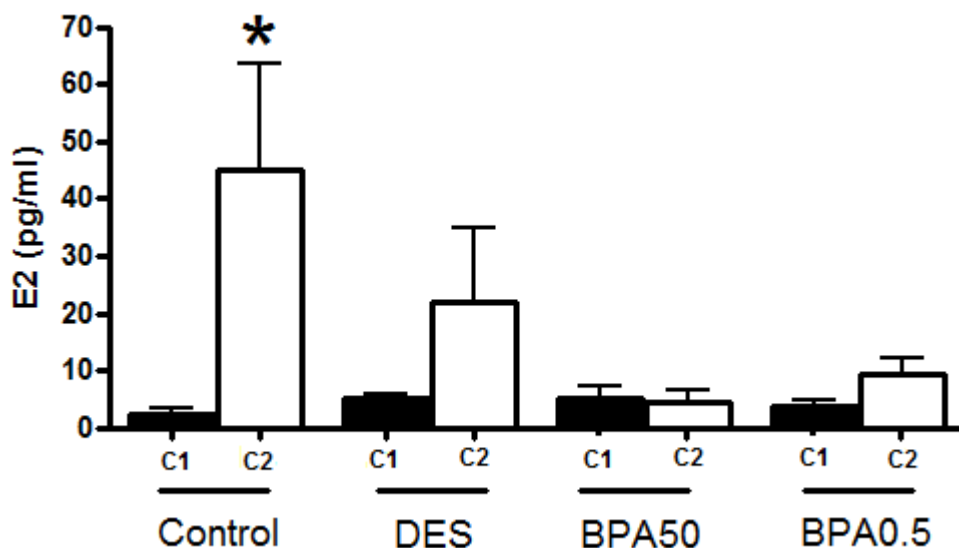


Figura 40: Efecto de la exposición neonatal a DES ó BPA sobre la esteroidogénesis ovárica en respuesta a oFSH. Se midieron las concentraciones séricas de E2 antes del inicio del tratamiento con oFSH (C1) y antes de la última dosis de oFSH (C2). Como lo demuestra la gráfica, el tratamiento con oFSH aumentó significativamente la secreción de E2 en las corderas control, mientras que en los animales expuestos neonatalmente a xenoestrógenos no se observan mayores niveles de E2 en respuesta al tratamiento con la gonadotropina. El asterisco indica un $p < 0.05$.

4.- Resumen de resultados

Los resultados experimentales alcanzados en este trabajo de tesis mostraron que:

- a) Durante el periodo de exposición a los xenoestrógenos seleccionados (DPN 1-14) el ovario de la cordera expresa $RE\alpha$, $RE\beta$ y RA en diferentes compartimientos tisulares: $RE\beta$ y RA se expresan con mayor intensidad mientras que la expresión de $RE\alpha$ es baja o nula.
- b) Las corderas expuestas neonatalmente a DES ó BPA presentaron una disminución de la reserva de folículos primordiales y un aumento del desarrollo folicular.
- c) La exposición a BPA redujo el peso ovárico e incrementó la incidencia de FMOs.
- d) El BPA promovió la proliferación de las células de la granulosa y de la teca de folículos antrales e incrementó tanto el número de folículos atrésicos como la expresión de p27.
- e) La exposición neonatal a BPA ó DES redujo el pool de folículos primordiales al estimular su reclutamiento inicial así como el subsecuente desarrollo folicular hasta el estadio antral. Esta aceleración en la foliculogénesis en corderas prepuberales (i.e.: no se producía la ovulación) tuvo como consecuencia un mayor número de folículos atrésicos.

- f)** Las corderas expuestas postnatalmente a BPA ó DES desarrollaron un menor número de folículos ≥ 2 mm y menor número de folículos atrésicos en respuesta al tratamiento con oFSH.
- g)** Los animales expuestos a DES ó BPA y tratados con oFSH presentaron menor expresión de RA en células de la granulosa y de la teca, además de menor respuesta esteroidogénica del ovario.
- h)** En su conjunto los resultados confirman la utilidad de la oveja como modelo adecuado para realizar estudios de perturbación endócrina.
- i)** La exposición postnatal a dosis bajas de BPA ó DES alteró tanto el desarrollo como la funcionalidad ovárica en el modelo utilizado.