

V.- Discusión

Experimento 1: Ontogenia de receptores de hormonas esteroides ováricas.

En una primera etapa de este trabajo de tesis nos propusimos determinar la expresión de receptores de hormonas esteroides en ovarios de corderas controles.

Como oportunamente señalamos, las hormonas esteroides 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 ovárica y en el mantenimiento de la fertilidad de la hembra (Drummond, 2006). El patrón de expresión de estos receptores durante la vida embrionaria y los primeros años de vida de la hembra presenta diferencias entre las especies. En ratón por ejemplo, los ovarios no producen hormonas esteroides durante la vida fetal (Greco y Payne, 1994) y los ratones que carecen de receptores esteroides tienen un desarrollo ovárico normal (Lydon y col., 1996, Couse y Korach, 1999). Por otra parte, la participación de los esteroides sexuales en la regulación del desarrollo folicular ha sido demostrada en ratones knock out para receptores esteroides cuyos fenotipos ováricos son anormales y están asociados a una fertilidad disminuida. Algunos de esos defectos están relacionados a cambios en otras hormonas (como las gonadotropinas) reguladas por las hormonas esteroides (Lydon y col., 1996; Drummond y col., 2002; Yeh y col., 2002). Durante el desarrollo folicular temprano, los estudios con ratones knock out para RE α han permitido detectar que se altera la foliculogénesis (arresto en estadio antral) (Couse y col., 1997) y que en ausencia de RE β se retarda el desarrollo folicular (incremento relativo de folículos primordiales) (Krege y col., 1998). Los estudios con ratones knock out para RA revelaron que éstos son esenciales para mantener la fertilidad de la hembra, optimizar el crecimiento folicular y la ovulación (Walters y col., 2010).

En hembras como la oveja o la mona el desarrollo del ovario está asociado con una activa esteroidogénesis (Mauleon y col., 1977; Weniger, 1990; George y Wilson, 1994; Lun y col., 1998). En estas especies, las hormonas esteroides tienen una función clave en el desarrollo gonadal. En la oveja, la expresión de receptores esteroides ováricos ha sido estudiada durante el desarrollo fetal y a partir del DPN 30 (Juengel y col., 2006). Se ha detectado la presencia de hormonas esteroides a partir del día 35 de gestación, momento que coincide aproximadamente con el comienzo de la diferenciación sexual en esta especie (Lun y col., 1998; Quirke y col., 2001).

Debido a que no se describió la dinámica de expresión de los receptores de hormonas esteroides en ovinos durante los primeros días desde el nacimiento, decidimos comenzar estudiando su expresión en el ovario de corderas durante el primer

mes de vida. En publicaciones de otros autores en ovejas se describió la expresión de receptores en ovarios de fetos, en corderas de 4 semanas de edad y en ovejas adultas (Juengel y col., 2006; Ortega y col., 2009). Dado que las edades estudiadas por estos autores no coinciden con el momento en que realizamos nuestro tratamiento experimental con xenoestrógenos, nos interesó conocer el patrón de expresión de algunos receptores de hormonas esteroides importantes para la funcionalidad ovárica. Se evaluó la expresión de los receptores en aquellos días en que las corderas iban a ser expuestas a xenoestrógenos (es decir durante las dos primeras semanas de vida). Para llevar adelante esta etapa del trabajo describimos la expresión de RE α , RE β y RA durante el desarrollo postnatal temprano en los DPN 1, 5, 10 y 30. Nuestros resultados muestran que la médula fue la región celular con mayor expresión de RE α en los DPN 1 y 5. Este receptor presentó una disminución de su expresión con la edad, hasta hacerse prácticamente indetectable en el DPN 30. Juengel y col. (2006) detectan una baja expresión de este receptor en el estroma y epitelio superficial del ovario en corderas de 4 semanas de edad. En nuestro estudio, la expresión de RE β se incrementó desde el DPN 1 al DPN 10, en todos los compartimientos celulares. En el DPN 30 se observó una disminución, principalmente, en la región medular y en las células del estroma cortical. El RA mostró una alta expresión en el estroma medular desde el DPN 1 al DPN 30. En general se detectó una elevada expresión de este receptor en los diferentes compartimientos celulares, la que fue disminuyendo con la edad. La mayor expresión de RA en folículos primordiales se observó en los DPN 1 y 5, disminuyendo gradualmente. Es interesante comentar que nuestras observaciones en el DPN 30 coinciden con los resultados de Juengel y col. (2006).

Los xenoestrógenos pueden ejercer su efecto al unirse a receptores estrogénicos y los ensayos bioquímicos han demostrado que el BPA es capaz de unirse tanto al RE α como RE β , con una afinidad 10 veces mayor por el RE β (Gould y col., 1998; Kuiper y col., 1998; Nagel y col., 2001). Los estudios recientes en relación al impacto de estrógenos ambientales (tanto los provenientes de pesticidas como de los plásticos) sobre la función reproductiva, han señalado la selectividad de estos tóxicos sobre el RE β , produciendo disfunciones reproductivas y alterando la fertilidad (Drummond y Fuller, 2010). Cabe destacar que en todos los momentos estudiados en nuestro experimento el RE β y el RA son los receptores que presentan una alta expresión. Por lo expuesto, fue de gran utilidad este experimento ya que demostró la presencia de receptores esteroides en el ovario de las corderas durante el período en que fueron

expuestas a DES ó BPA y así poder inferir la posible vía de acción de los xenoestrógenos.

Experimento 2: Exposición neonatal a xenoestrógenos y su efecto en el ovario.

La exposición in utero o postnatal temprana a PEs con actividad estrogénica puede tener efectos adversos debido a la mayor sensibilidad del organismo en desarrollo (Bern, 1992). En los últimos años, se ha ido acumulando evidencia científica (a partir de estudios realizados en animales de fauna, de laboratorio y primates no humanos) que ponen en evidencia el rol de los PEs en la patogénesis de diferentes trastornos reproductivos. Entre los problemas más frecuentes que se evidencian en humanos durante la vida adulta podemos mencionar: el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP), la Falla Ovárica Prematura (FOP), diferentes anormalidades del tracto reproductor, fibromas uterinos, endometriosis y gestación ectópica (McLachlan y col., 2006; Woodruff y col., 2008; Mendola y col., 2008).

La mayor parte de la información disponible en relación a los efectos de los PEs sobre el desarrollo del ovario proviene de estudios realizados en modelos animales de especies no precociales, principalmente roedores de laboratorio. Contrariamente, los potenciales efectos de los PEs sobre la reproducción de animales domésticos han recibido poca atención.

El objetivo de esta parte de la tesis fue evaluar si la exposición neonatal a dosis bajas de dos de los xenoestrógenos más ampliamente difundidos en el ambiente (DES y BPA) puede alterar la dinámica folicular y la funcionalidad del ovario de la oveja, una especie precocial con un desarrollo folicular del ovario similar al de la mujer (Juengel y col., 2002; Juengel y col., 2006).

Estudiamos los efectos de la exposición postnatal temprana a BPA y DES sobre el desarrollo del ovario. Como describimos en la sección M&M la vía de administración utilizada fue la subcutánea. En un trabajo realizado en ratas se estudió la toxicocinética del BPA (Snyder y col., 2000). En este estudio se determinó que la vía subcutánea y la vía intraperitoneal evitan el primer paso de metabolización que ocurre en el hígado donde el BPA es transformado en monoglucurónido cuando la vía utilizada es la oral (Yokota y col., 1999). En el año 2008, en un trabajo realizado por Taylor y col. se demostró que en animales expuestos durante los primeros días de vida postnatal, la vía de administración resulta irrelevante. Estos autores no observaron diferencias en la concentración sérica de BPA, independientemente de que éste se administrara oralmente

o por la vía subcutánea en ratones hembras de 3 días de edad. Los autores definieron que, a esta edad, las enzimas hepáticas no están expresadas de la misma manera que en el animal adulto por lo que esta vía de metabolización no se encuentra activa. En ovejas no se han realizado hasta la fecha, trabajos donde se comparen las diferentes vías de administración de BPA ó DES y los niveles séricos alcanzados. Nosotros consideramos que debido a que la etapa de exposición utilizada es durante las dos primeras semanas de vida, y teniendo en cuenta la información que existe en roedores, la vía subcutánea y al oral podrían ser similares a esta temprana edad de las corderas. Por otro lado, en un trabajo reciente se ha estudiado en perros adultos la vía de administración sublingual, demostrándose que el BPA es rápido y eficientemente absorbido por esta vía que evita el primer paso de metabolización hepática (Gayrard y col., 2013). En este caso se produce una mayor concentración sérica y un mayor nivel de absorción del BPA que por la administración oral convencional. De estos trabajos podemos deducir que el modelo utilizado para realizar la exposición (exposición postnatal o durante la vida adulta) influye de manera importante en los niveles de absorción alcanzados dependiendo de la vía de administración utilizada.

La exposición a BPA ó DES, ya sea prenatal o prepuberal, puede afectar el peso corporal, sin embargo, no existe consenso con respecto a este punto. Distintos estudios demostraron un aumento en la ganancia de peso corporal en ratonas hembras expuestas a BPA (Howdeshell y col., 1999; Nikaido y col., 2004) mientras que otros autores no observaron cambios en este parámetro (Kato y col. 2003; Tinwell y col., 2002). En nuestro experimento, la exposición a BPA ó DES no modificó el peso corporal de las corderas medido a los 30 días de edad.

En relación a los efectos de los xenoestrógenos sobre el ovario, en primer lugar determinamos si se producía un cambio en el peso del órgano. Las corderas expuestas a BPA mostraron una disminución en el peso ovárico cuando éste fue ajustado al peso vivo de las corderas. Este resultado es consistente con el descrito en ratas tratadas neonatalmente con valerato de estradiol, en donde el peso y tamaño de los ovarios es menor que en los controles (Sotomayor-Zarate y col., 2008). Sin embargo, contrastan con los de Evans y col. (2004) quienes señalan que los pesos ováricos fueron similares entre las ratas tratadas por vía i.m. (dos veces a la semana) con BPA, DES u octilfenol (perturbador endocrino clasificado como xenoestrógeno por ser agonista de los estrógenos) desde el DPN 30 hasta el DPN 50. Esta diferencia puede ser explicada si se

considera la diferencia en las dosis, las vías de administración y especialmente el momento de exposición.

En continuidad con la investigación de los efectos de BPA ó DES sobre el ovario, en este experimento nos propusimos determinar si se producían alteraciones en la dinámica folicular de las corderas. Se ha establecido que el desarrollo folicular en sus etapas iniciales se encuentra bajo la coordinación y regulación de distintos factores tanto del ovocito como de las células somáticas (Binelli y Murphy, 2010). La activación folicular es un proceso irreversible en el que los folículos primordiales inician su crecimiento y las células foliculares proliferan y cambian su morfología formándose los folículos primarios (Webb y Campbell, 2007; Binelli y Murphy, 2010). Es probable que este proceso de activación (que se produce en un período independiente de la acción de las gonadotrofinas) esté regulado a través de un balance entre factores inhibitorios o estimuladores de origen sistémico y/o local (van den Hurk y Zhao, 2005).

En las corderas tratadas con DES ó BPA se observó una disminución en la reserva de folículos primordiales asociado a un incremento en la transición de folículo primordial a primario. Este estímulo en los estadios tempranos de crecimiento folicular también afecta estadios de desarrollo folicular más avanzados, tal como lo demuestra el mayor porcentaje de proliferación de las células de la granulosa y de la teca en los folículos en crecimiento de los animales tratados con DES ó BPA. En el caso de DES, se observó un incremento en la proliferación celular en los folículos preantrales grandes y con BPA en los folículos antrales pequeños. Esta alteración en el patrón de crecimiento folicular producido por la exposición a DES ó BPA, sugiere que la presencia de un efecto perturbador (disruptor) del normal “diálogo” entre el ovocito y la granulosa podría ser el mecanismo de acción de elección cuando la exposición a xenoestrógenos se produce en los estadios tempranos del desarrollo ovárico. En otro trabajo realizado en nuestro laboratorio hemos obtenido resultados similares por la exposición neonatal de ratas a DES ó BPA (Rodríguez y col., 2010), indicando que la exposición neonatal a DES ó BPA altera el desarrollo folicular temprano en ambas especies.

Los ovarios de las corderas también presentaron un alto porcentaje de folículos antrales atrésicos. Es así como la población de folículos antrales puede ser dividida en dos subpoblaciones: una con alto porcentaje de proliferación y otra subpoblación con baja proliferación o de folículos atrésicos. Dado que el destino final de los folículos en crecimiento en animales prepúberes es la atresia (McGee y Hsueh, 2000), nuestros

resultados sugieren que el aumento en el porcentaje de folículos atrésicos puede ser causado por un acelerado desarrollo folicular provocado por los xenoestrógenos.

Recientemente, se ha demostrado que p27 es una molécula clave en la regulación del desarrollo ovárico en ratón (Rajareddy y col., 2007). Esta proteína participa en el control del desarrollo ovárico evitando el ensamblado y la activación folicular y promoviendo la muerte folicular (Kaldis, 2007). p27 es en sí misma un regulador negativo del ciclo celular y además se ha demostrado que es esencial para la ovulación y la luteinización en el ratón (Fero y col., 1996). En las corderas expuestas a DES ó BPA describimos un aumento en la expresión de p27 en ovocitos y en células de la granulosa de los folículos pequeños antrales atrésicos. Nuestros resultados son consistentes con los de Rajareddy y col. (2007) quien informó que, en ratón, la expresión de p27 en el núcleo de las células de la pregranulosa/granulosa activa las caspasas que resultan mediadoras de la atresia folicular (Robles y col., 1999; Johnson y Bridgham, 2000).

Tomados en conjunto, todos estos resultados demuestran que la exposición neonatal de las corderas a DES ó BPA altera la dinámica folicular promoviendo la activación e incrementando la proliferación de células granulosas y de la teca de folículos preantrales y antrales. En animales prepúberes, esta onda de desarrollo folicular podría causar un incremento en el número de folículos antrales que sobreexpresan p27 y que terminan en atresia. Queda por determinar el mecanismo preciso por el cual se altera la dinámica folicular y su impacto sobre la función ovárica en la hembra adulta.

En un estudio previo se sugirió que el efecto de una dosis única de octilfenol puede variar de acuerdo al estadio de desarrollo en el que la oveja es expuesta (Sweeney y col., 2000). Dado que los xenoestrógenos actúan a través de los receptores esteroides, los efectos pueden ser “organizacionales” ó “activacionales” (MacLusky y Naftolin, 1981). Los efectos organizacionales son aquellos que ocurren como resultado de la exposición al PE durante el desarrollo prenatal o los primeros días de vida, y tienen como consecuencia un cambio permanente en la función de un órgano o de un sistema. Mientras que los activacionales son cambios temporarios en la actividad de un sistema que se producen como resultado de la exposición al PE cuando el desarrollo de ese sistema ya se ha completado. Los cambios activacionales cesan cuando la exposición al compuesto químico desaparece, volviendo el sistema a las condiciones previas. Sería muy interesante realizar futuros estudios utilizando el mismo protocolo de exposición a

xenoestrógenos pero evaluando las alteraciones ováricas en la hembra adulta, para definir si los efectos descritos son transitorios (activacionales) o permanentes (organizacionales).

Otro resultado significativo de nuestro estudio fue la aumentada incidencia de FMOs en las corderas expuestas neonatalmente a BPA. Como ya señalamos uno de los eventos más importantes durante la foliculogénesis ovárica es el ensamblado folicular (McGee y Hsueh, 2000). Teniendo en cuenta que los FMOs son ovocitos que no se separan y que quedan incluidos en los nidos (clusters) (Pepling, 2006), la proporción de FMOs puede ser usada como un índice del grado de éxito en el proceso de ensamblado folicular y de inhibición de la ruptura de los nidos (nest breakdown) (Tilly, 2003). Por otra parte, dado que en nuestro estudio la exposición a BPA estimuló la transición de folículo primordial a primario y aumentó la incidencia de FMOs, ambos eventos podrían ser responsables de una reducción de la reserva folicular ovárica. Como antecedente, se ha demostrado que los ovarios de ratones expuestos prenatalmente o neonatalmente a compuestos estrogénicos presentan un aumento en la incidencia de FMOs (Suzuki y col., 2002; Jefferson y col., 2002; Kipp y col., 2007). La mayor incidencia de FMOs tiene consecuencias directas sobre la fertilidad de la hembra. Se demostró en ratón que los ovocitos de estos folículos tienen menor poder fecundante (Iguchi y col., 1990) y su capacidad para ovular también ha sido cuestionada (Silva-Santos y Seneda, 2011). Por lo tanto, la mayor incidencia de estos folículos en las corderas podría ser responsable de una menor fertilidad de las ovejas adultas.

Cuando se estudió el tipo de receptor estrogénico y su influencia sobre el proceso de ruptura de los nidos (nest breakdown), Jefferson y col. (2002) observaron que los ratones knock out para RE β expuestos a compuestos estrogénicos no formaban FMOs, mientras que si lo hacían los ratones knock out para RE α . Por lo tanto, se sugiere que la foliculogénesis temprana y los efectos de los estrógenos sobre el desarrollo de los folículos estarían mediados a través del RE β (Hegele-Hartung y col., 2004). En nuestro trabajo observamos que los folículos primordiales no expresan RE α y que las células de la granulosa de los folículos preantrales lo expresan sólo en poca cantidad durante el periodo de exposición a BPA. En cambio, los folículos poseen una alta expresión de RE β a partir del DPN 5 y en adelante. De esta forma, la exposición neonatal a BPA podría extender el período de estímulo estrogénico actuando a través del RE β y podría ser responsable del incremento en la incidencia de FMOs. Esto resulta sorprendente ya que se considera que en la oveja el proceso de ensamblado se ha completado antes del

nacimiento (Juengel y col., 2002). En nuestro trabajo, la alta y temprana expresión de RE β durante el primer mes de vida de la cordera sugiere que las alteraciones ováricas descritas en los grupos de DES ó BPA podrían estar mediadas, principalmente, a través del RE β .

Nuestros resultados aportan nueva evidencia a la hipótesis que sostiene que la exposición continua a estrógenos preserva la estructura de los nidos de células germinales probablemente a través del sistema de señalización en el que participa el RE β , manteniendo a las células de la pregranulosa rodeando a varios ovocitos (nidos). Estudios previos utilizando BPA han informado la inducción de FMOs por la inyección de una dosis alta de BPA (100 mg/kg/día) y no así con una dosis baja de este compuesto (10 mg/kg/día) (Suzuki y col., 2002). En nuestro estudio, la inducción de FMOs en corderas se observó con una dosis aún más baja de BPA (50 ug/kg/día, considerada como “dosis segura” según EPA). La exposición neonatal de la cordera a BPA alteró el proceso de ensamblado folicular, y este efecto como se mencionó antes podría afectar la fertilidad de la hembra ya que los ovocitos provenientes de FMOs –en estudios realizados en ratón- presentan un reducido porcentaje de fertilización (Iguchi y col., 1990).

A diferencia de lo obtenido en ratas y ratones (Iguchi y col., 1986; Rodríguez y col., 2010), la exposición neonatal de corderas a DES no indujo la mayor formación de FMOs, aunque detectamos alteraciones en la dinámica folicular. Estas diferencias pueden ser debidas a que la dosis de DES utilizadas en las corderas es mucho menor que la usada en roedores. Apoyando esta sugerencia, en estudios realizados en nuestro laboratorio con ratas observamos que la exposición neonatal a 20 ug/kg/día de DES indujo la formación de FMOs mientras esto no ocurrió con una dosis 100 veces más baja (Rodríguez y col., 2010).

En relación a la salud de la mujer, resulta interesante destacar que la exposición a BPA ha sido asociada a pérdidas repetidas de embarazos en mujeres (Sugiura-Ogasawara y col., 2005) y que los niveles séricos de BPA son más altos en mujeres que padecen SOP comparado con controles sanas (Takeuchi y col., 2004; Diamanti-Kandarakis, 2010). Resulta importante resaltar que algunos cambios observados en nuestro estudio tales como el incremento en la activación de la transición de folículo primordial a primario junto con el aumento en la proliferación de las células de la granulosa y de la teca por la exposición neonatal a DES ó BPA, son alteraciones similares a aquellas descritas en el SOP de la mujer (Franks y col., 2008). Según

nuestros resultados, los cambios que se producen en la dinámica folicular por la exposición postnatal de la cordera a DES ó BPA sugieren que se acelera el proceso de reclutamiento folicular y así se reduciría la reserva folicular ovárica. Esta disminución en la reserva folicular podría llevar a una cesación temprana de la ciclicidad de la hembra y/o a un aumento de la incidencia de FOP.

Experimento 3: Respuesta ovárica a un estímulo gonadotrófico.

La estimulación exógena de los ovarios con gonadotrofinas es una práctica reproductiva que se aplica en muchas especies de mamíferos con la intención de aumentar el número de folículos maduros en condiciones de ovular y de esta forma obtener un mayor número de embriones viables. La reducción del intervalo entre generaciones es uno de los elementos claves en la mejora genética del ganado (Lohuis y col., 1995; Ledda y col., 1999). Así, el uso de animales prepúberes como donantes de ovocitos en individuos de alto valor económico reduce el tiempo entre generaciones y adelanta los resultados del test de progenie en los programas reproductivos (Gordon, 1990). En la oveja, Ledda y col. (1997) demostraron que los ovocitos obtenidos de hembras prepúberes de 30 o 40 días de edad podían ser madurados y fecundados *in vitro*. Este mismo autor (1999) demostró que la estimulación con gonadotrofinas exógenas de corderas prepúberes promueve el desarrollo de folículos maduros y el número de ovocitos a recuperar, permitiendo la producción *in vitro* de embriones. Esto último, posibilita obtener los resultados de los test de progenie mucho antes de que la hembra donante de ovocitos comience a ciclar.

En la tercera etapa del trabajo de tesis evaluamos si la exposición neonatal a DES ó BPA altera la respuesta a un estímulo gonadotrófico exógeno. Para esto utilizamos un protocolo de tratamiento con oFSH en corderas prepuberales.

En el área de la toxicología reproductiva (que incluye a los PEs), la estimulación ovárica con gonadotrofinas demostró ser una herramienta útil y simple para detectar alteraciones a nivel de los órganos reproductivos de la rata y estudiar posibles alteraciones en los mecanismos de acción hormonal producidos por el compuesto en estudio (Sekiguchi y col., 2003). Sin embargo, hay muy pocos experimentos en los que se haya utilizado la estimulación con gonadotrofina exógena en animales inmaduros con el mencionado objetivo (Ushinohama y col., 2001; Petroff y col., 2000). Nuestro estudio es el primero en utilizar este diseño experimental en una especie de interés zootécnico evaluando la respuesta del ovario a gonadotrofinas exógenas en corderas prepuberales.

Hemos demostrando la utilidad de este modelo para evaluar los efectos de la exposición a PE, tales como BPA y DES, sobre la capacidad funcional del ovario de la cordera. Pudimos observar que las corderas expuestas a las dos dosis de BPA estudiadas y, sometidas posteriormente al tratamiento exógeno con oFSH, presentan un menor número de folículos maduros (iguales o mayores a 2 mm) con relación a los controles. Esto nos permite concluir que el ovario de la cordera fue afectado funcionalmente por la exposición neonatal a BPA. La falla en la respuesta ovárica al estímulo gonadotrófico demostrada en nuestro experimento, tanto con la dosis segura de BPA como con la dosis 100 veces menor, podría ser debida a una disrupción de la esteroidogénesis ovárica y/o del crecimiento folicular inducido por la exposición neonatal a BPA. Es importante determinar si este efecto del BPA ocurre de manera directa sobre el ovario o si es un efecto indirecto a través de cambios en el eje hipotálamo-hipofisario. Para responder este interrogante, estudios futuros con cultivos in vitro de ovarios de corderas expuestas a BPA están siendo realizados. Las corderas expuestas a DES presentaron también una disminución en la respuesta al estímulo gonadotrófico (medido en número de folículos ováricos maduros) aunque éste cambio no fue estadísticamente significativo. Esta diferencia puede ser atribuida a la dosis de DES utilizada. Por otra parte las corderas expuestas a DES presentaron un incremento en la atresia folicular, luego de la estimulación con oFSH, y este resultado coincide con lo observado en las corderas tratadas con BPA.

Las corderas controles (que no fueron expuestas a xenoestrógenos) tratadas con oFSH presentaron un aumento en los niveles de E2 sérico a las 72 horas posteriores al inicio de la estimulación con oFSH. Por el contrario, los niveles circulantes de E2 en las corderas expuestas a los xenoestrógenos no mostraron diferencias entre los valores medidos antes y después de 72 hs del inicio del tratamiento con gonadotrofinas. Esta alteración en la esteroidogénesis fue acompañada por disminución en la expresión de RA en células de la granulosa y de la teca en el DPN 34, de animales expuestos a DES ó BPA y estimulados con oFSH en comparación con los controles tratados con oFSH. Como mencionamos previamente, los estudios con ratones knock out para RA revelaron que éste receptor es esencial para mantener la fertilidad de la hembra por su participación en la regulación del crecimiento folicular y la ovulación (Walters y col., 2010). La menor expresión de este receptor en las corderas expuestas a DES ó BPA y tratadas con oFSH, podría explicar el menor desarrollo folicular observado en estos animales. Además, permite sugerir que en estas corderas podría afectarse su futura

fertilidad. En estudios realizados en rata se demostró que la expresión de RA está regulada negativamente por los niveles circulantes de FSH (Tetsuka y col., 1995). En nuestro estudio y teniendo en cuenta que las corderas recibieron estimulación con oFSH, la exposición a BPA ó DES podría haber sido la responsable de la mayor caída en la expresión de RA observada con relación a los controles.

Como se sabe, toda la producción de hormonas esteroides depende de la disponibilidad de su precursor lipídico, el colesterol. Uno de los pasos claves en la biosíntesis de estradiol es el transporte de colesterol por medio de la proteína StAR desde la gota lipídica en las células de la teca hasta su entrada en la matriz interna de la mitocondria. Sin este transporte, el colesterol no puede ser convertido a pregnenolona a través de la acción de la proteína esteroideogénica P450, y de este modo la producción hormonal en el folículo antral resulta inhibida (Peretz y col., 2011). En los últimos años se han llevado a cabo estudios con la intención de comprender los efectos del BPA sobre la esteroideogénesis ovárica. La mayoría de ellos fueron realizados in vitro en diferentes modelos. Por ejemplo, utilizando cultivo de folículos antrales de ratón, BPA (44–440 μ M, 96h) redujo la producción de progesterona, androstenediona, estrona, testosterona y E2. Dicha disminución estuvo acompañada de una menor expresión de diferentes enzimas relacionadas con la esteroideogénesis. Para estos autores el BPA afectó la capacidad de incorporar colesterol por parte de la mitocondria para su metabolización a pregnenolona, lo que explicaría la disminución de la producción hormonal (Peretz y col., 2011). Otros estudios con cultivo de células de la granulosa porcina (Grasselli y col., 2010; Mlynarcíková y col., 2005) y humana (Kwintkiewicz y col., 2010) expuestas a BPA también mostraron que se altera el mecanismo de esteroideogénesis. Son menos los trabajos realizados con modelos in vivo. Entre ellos podemos citar uno realizado en nuestro laboratorio, en donde hembras recién nacidas de yacaré (*Caiman latirostris*) expuestas in ovun a dos dosis de BPA (1.4 y 140ppm) presentaron un aumento en los niveles séricos de E2, mientras que la dosis de 1.4ppm de BPA disminuyó los niveles séricos de testosterona (Stoker y col. 2008). Aunque hay evidencias que muestran que el BPA altera la esteroideogénesis ovárica por disminución de la expresión de enzimas claves que regulan este proceso, queda aún por determinar el verdadero mecanismo por el cual se producen estos efectos. Recientemente, un estudio en ovejas demostró que la exposición prenatal a BPA altera la expresión de genes que controlan la esteroideogénesis ovárica y la expresión de microRNA de importancia en la diferenciación gonadal y la foliculogénesis (Veiga-Lopez y col., 2013). Como se sabe,

las células de la granulosa poseen receptores para FSH y responden al estímulo de esta gonadotropina incrementando la transcripción de genes que participan en el mecanismo enzimático necesario para la conversión de andrógenos a estrógenos (17 β estradiol y estrona) (Strauss y col. 1999; Craig y col., 2011). También se ha demostrado que el Growth differentiation factor-9 (GDF-9) sintetizado por las células de la granulosa estimula la proliferación de estas células, aunque en combinación con niveles séricos altos de FSH disminuye la producción de estrógenos y progesterona en el ovario (Vitt y col., 2000). En un estudio preliminar, hemos observado una mayor expresión del mRNA de GDF-9 en los ovarios de corderas expuestas a BPA ó DES y tratadas con gonadotropinas, siendo esta una posible explicación a la disminución de los niveles de E2 observada en nuestro experimento. Otra evidencia que avala un efecto directo del BPA sobre el ovario es que en un reciente trabajo, Seung y col. (2013) demostraron que la exposición a BPA en la rata adulta disminuye la concentración sérica de E2 acompañada por un aumento en la atresia folicular, de la regresión luteal por vía de la caspasa-3 asociada a apoptosis y de cambios en la ciclicidad con una fase estral extendida. En este trabajo, la exposición oral por 90 días a 1 μ g/kg ó 100 μ g/kg de BPA provocó que los niveles de las proteínas esteroidogénicas StAR y aromatasa disminuyeran. Como consecuencia, los niveles de LH se incrementaron como respuesta al mecanismo homeostático de retroalimentación con las hormonas ováricas mientras que los niveles séricos de FSH no sufrieron cambios (Seung col., 2013). Cabe destacar que esta disminución en los niveles de proteínas esteroidogénicas se produjo con una dosis 50 veces más baja que la dosis segura.

Si los cambios observados en nuestro experimento (falla en la respuesta ovárica, aumento de la atresia folicular y falla en el mecanismo de esteroidogénesis) por el efecto disruptor de los PEs resultaran de tipo organizacional (permanentes), podrían entonces mantenerse en el tiempo afectando negativamente la función reproductiva de la oveja adulta.

Comentario general

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo de tesis y de otros obtenidos durante los últimos años, podemos decir que se ha ido acumulando importante evidencia científica, a partir de la utilización de modelos animales, acerca del rol que juegan los PEs en las alteraciones tanto en el desarrollo como en la funcionalidad de órganos asociados a la reproducción (Craig y col., 2011; Dessi-Fulgheri y col., 2002; Evans y

col., 2004; Gupta, 2000). En algunos casos, los resultados aportan importante información sobre las posibles causas de la menor fertilidad en el ganado (Adams, 1990; Adams, 1995). También permiten suponer posibles asociaciones con animales de la fauna y de especies en peligro de extinción (Beldomenico y col., 2007; Colborn y col., 1993). En otros casos los resultados de estos modelos experimentales ayudan a entender la posible etiología de patologías humanas tales como obesidad, diabetes mellitus, enfermedades reproductivas y tumores hormonodependientes (De Ferranti y col., 2007; Diamanti-Kandarakis y col., 2009, Davis y col., 1993; Durando y col., 2007).

Creemos muy necesario revisar los datos surgidos de la investigación básica y compararlos con las observaciones en humanos. Un buen ejemplo de cómo convergen las observaciones en humanos y la investigación científica básica fue el caso de la exposición de humanos a DES. El efecto en humanos fue claramente replicado en modelos experimentales utilizando roedores de laboratorio. Es así como ahora sabemos que la exposición a DES en momentos críticos del desarrollo puede provocar un amplio espectro de alteraciones en la reproducción de machos y hembras, obesidad y cáncer de pulmón (Diamanti-Kandarakis y col., 2010; Davis y col. 1993; Gupta, 2000; Newbold y col., 2007b). Para el caso de cáncer de pulmón, el modelo de exposición a DES utilizado en ratones predijo los resultados observados en humanos 20 años antes de que los datos en humanos estuvieran disponibles (Ekblom y col., 1992; Calle y col., 1996). Específicamente, en el caso de los tumores en el tracto reproductor los datos ya han sido confirmados además en otras especies como en ratas, hamsters y primates no humanos (McLachlan, 2006).

Si nos referimos específicamente a BPA, éste compuesto ha sido relacionado a una amplia variedad de disfunciones endocrinas. La exposición a esta sustancia particularmente durante las etapas tempranas del desarrollo incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama (Durando y col., 2007), cáncer de próstata (Prins y col., 2008), diabetes, (Shankar y Teppala, 2011), desórdenes reproductivos (Diamanti-Kandarakis y col., 2009) y neuroendocrinos (Ramos y col., 2003).

El BPA es un PE que actúa como xenoestrógeno. Las posibilidades de exposición a este químico son muy altas debido a la amplia variedad de productos que lo contienen. Así lo demuestran los datos de Calafat y col. (2005) quienes describieron niveles detectables de BPA en muestras de orina de una población humana sana y no expuesta laboralmente al químico. La evidencia en humanos ya está a la vista. Lang y

col (2008) publicaron un trabajo relacionando la concentración de BPA en orina con enfermedades crónicas en más de 1400 adultos en USA. Estos investigadores observaron una correlación directa entre las concentraciones de BPA en orina y la enfermedad cardiovascular. También demostraron su relación con alteraciones en la concentración de las enzimas hepáticas. Sería realmente interesante poder correlacionar estos hallazgos con la exposición pre y posnatal a BPA u otros xenobióticos en humanos. Sin embargo, la investigación epidemiológica en nuestra especie resulta logísticamente dificultosa y costosa ya que los datos deben ser tomados en numerosos y diferentes momentos (desde la gestación, etapa prepuberal, puberal y quizás hasta 50 o más años después, cuando podrían ponerse de manifiesto las consecuencias de aquella temprana exposición).