

## **Efectos de la exposición postnatal a estrógenos ambientales (xenoestrógenos) sobre el desarrollo folicular en ovejas**

Med. Vet. Oscar Rivera. Grado Doctor en Ciencias Biológicas, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, 2014.

Calificación: Sobresaliente 10 (diez).

Director de Tesis: Prof. Dr. Enrique H. Luque

Co-director de Tesis: Dra. Jorgelina G. Varayoud

Lugar de realización: Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH), FBCB, UNL.

La presente Tesis doctoral se realizó por el Convenio de cooperación celebrado entre el LETH-FBCB-UNL y la Cátedra de Anatomía y Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora (UNLZ). La mencionada Tesis se llevo a cabo en el marco de la ejecución de los proyectos de Investigación que a continuación se mencionan y que fueran acreditados oportunamente en la FCA-UNLZ:

“Efecto de la exposición postnatal a estrógenos ambientales (xenoestrógenos) sobre el desarrollo folicular y del tracto genital en ovejas” 2006-2009. Director. Dr. Enrique H Luque, Co-director. Med Vet. Oscar E Rivera.

“Exposición postnatal temprana a estrógenos ambientales (xenoestrógenos) en la cordera y respuesta del ovario al estímulo hormonal” 2010/2013. Director. Dr. Enrique H Luque, Co- director. Med Vet. Oscar E Rivera.

### **Introducción.**

Durante el desarrollo fetal y postnatal temprano los ovarios presentan cambios morfológicos significativos que están controlados hormonalmente. 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. El término perturbador endocrino (PE) hace referencia a aquellas sustancias que tienen la capacidad de imitar o antagonizar a las hormonas endógenas. El primer trabajo publicado al respecto data de 1993, y a partir de él comenzó a hacerse más evidente que la presencia de PEs en el ambiente podía representar un riesgo para la salud humana y animal. Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos se define a un PE como una **“sustancia o mezcla de sustancias exógenas que altera una o más funciones del sistema endócrino y en consecuencia causa efectos adversos en la salud de un organismo intacto, su progenie o subpoblaciones”** (USEPA, 1997). El descubrimiento de la existencia de sustancias químicas en el ambiente con actividad agonista/antagonista de hormonas endógenas se asoció con el interés en conocer sus efectos sobre el desarrollo y la capacidad reproductiva en animales de la fauna silvestre, especies de interés zootécnico y seres humanos. Aunque todo el sistema endocrino puede verse implicado en esta alteración, la información disponible sobre la perturbación hormonal causada por químicos con actividad estrogénica (conocidos como xenoestrógenos) es, cualitativa y cuantitativamente, la más abundante. Algunos PEs que han sido asociados con efectos sobre el desarrollo y la reproducción imitan la actividad del 17 $\beta$ -estradiol (E2) y se hipotetizó que estas sustancias podrían ser responsables de varias patologías reproductivas como cáncer de mama, deficiencias y anomalías en la cuenta espermática, aumento de la incidencia de cáncer de próstata y testículo y otras disfunciones reproductivas en el macho. La mayor parte de la

evidencia actual sugiere que los mamíferos son más susceptibles a los PE durante la vida fetal y postnatal temprana que cuando son adultos. Esto podría deberse a una mayor susceptibilidad de las células del feto y/o neonato durante el desarrollo que durante la vida adulta. Adicionalmente los mecanismos endocrinos de retroalimentación y el sistema inmune no están aún completamente desarrollados, lo que podría favorecer la aparición de los efectos adversos. Entre los PE más utilizados y estudiados podemos mencionar a dos xenoestrógenos sintéticos: BPA y DES. Contrariamente a lo que ocurre con animales de laboratorio y fauna silvestre, es poca la atención que hasta el momento se le ha dado al efecto de los PE sobre los animales de interés zootécnico. DES es un potente xenoestrógeno representante de los químicos con actividad estrogénica demostrada. Fue ampliamente utilizado en mujeres embarazadas durante las décadas de 1950 y 1960 administrándose para evitar abortos espontáneos y complicaciones del embarazo. BPA es uno de los químicos industriales con más alto volumen de producción en todo el mundo. Anualmente se producen más de 3 millones de toneladas. Todos los años se incrementa en aproximadamente un 10% su producción y más de 100 toneladas por año son liberadas a la atmósfera. BPA es también uno de los xenoestrógenos más estudiados e investigados. El BPA atrajo la atención de las agencias regulatorias y de científicos de varios países debido a sus propiedades estrogénicas tanto *in vitro* como *in vivo* dado el conocido rol que juegan los estrógenos en la regulación de la fisiología y la fisiopatología animal y humana. Una de las mayores preocupaciones en relación a la exposición a BPA radica en los efectos que puede tener sobre el hombre especialmente cuando es expuesto durante las etapas más susceptibles del desarrollo: fetal, neonatal, prepuberal y puberal. Las investigaciones realizadas en los últimos años sugieren que las patologías hormonales que se hacen evidentes en mujeres a partir de la pubertad podrían tener su origen en la vida fetal o neonatal cuando los ovarios se están formando. En la oveja, la exposición prenatal a BPA reduce el peso de la cría al momento del nacimiento, y cuando son adultas terminan su temporada reproductiva más tarde. Sin embargo, poco se conoce acerca de los efectos de la exposición neonatal a BPA ó DES sobre el desarrollo del ovario de la oveja. Los compuestos seleccionados para el presente estudio poseen alto impacto ambiental, tanto en el medio rural como en el urbano. Cabe destacar que las dosis utilizadas en nuestros experimentos fueron semejantes a las determinadas por otros estudios como presentes en el ambiente y a las cuales los animales y el hombre están cotidianamente expuestos

### Objetivos:

Determinar si la exposición postnatal temprana a los xenoestrógenos DES ó BPA altera el desarrollo del ovario de la oveja lo que podría provocar consecuencias reproductivas durante la vida adulta. Nos interesó investigar si se producen efectos sobre el desarrollo del ovario a corto plazo (en animales prepuberales) luego de la exposición a los xenoestrógenos y si se observan alteraciones en la funcionalidad del órgano. Específicamente en hembras de *Ovis aries* (oveja doméstica) prepuberales, expuestas durante las dos primeras semanas de vida a los xenoestrógenos BPA ó DES estudiamos: a) la dinámica folicular ovárica estableciendo el número de folículos de cada una de las distintas poblaciones foliculares (primordiales, de transición, primarios, preantrales pequeños, preantrales grandes y antrales pequeños); b) la expresión de moléculas asociadas al ciclo de división celular, mediante la detección por inmunohistoquímica (IHQ) de la expresión de Ki67 y p27; c) el porcentaje de folículos atrésicos y la incidencia de folículos multiovulares (FMOs); d) los niveles séricos de E2 y T para analizar cambios en la esteroidogénesis ovárica; e) la respuesta a un tratamiento gonadotrófico de superestimulación folicular.

Adicionalmente estudiamos el patrón de expresión de receptores esteroides en el ovario de corderas controles durante el primer mes de vida, con el propósito de determinar la ontogenia de RE $\alpha$ , RE $\beta$  y RA en el momento que los animales serán

expuestos a los xenoestrógenos.

### **Materiales y Métodos:**

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

**Experimento 1:** Este primer experimento fue diseñado para estudiar mediante IHQ la ontogenia de los receptores de hormonas esteroides ( $RE\alpha$ ,  $RE\beta$ , RA) en muestras de ovario de corderas en los días postnatales 1, 5, 10 y 30.

**Experimento 2:** Luego del nacimiento, las corderas se identificaron y fueron asignadas al azar a alguno de los siguientes tratamientos postnatales administrados diariamente por vía subcutánea 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  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (n=6); 3) BPA50 (99% pureza, Aldrich, Milwaukee, WI): 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (n=6) (Figura 13). En el DPN 30 se pesaron las corderas y con anestesia general se les practicó ovariectomía bilateral. 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 ovario se evaluó: 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 por IHQ 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 corderas expuestas postnatalmente a xenoestrógenos según el diseño del experimento 2 con el agregado de un grupo de animales expuestos a BPA con una dosis 100 veces inferior a la dosis segura (0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ). Luego en el DPN 30 todos los animales fueron sometidos a un tratamiento gonadotrófico de superestimulación folicular con FSH ovina. 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. También 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).

### **Resultados:**

Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo de tesis muestran 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 con mayor intensidad mientras que la expresión de  $RE\alpha$  es baja o nula. b) Las corderas expuestas neonatalmente a DES y 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 y 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 tuvo como consecuencia un mayor número de folículos atrésicos. f) Las corderas expuestas postnatalmente a BPA o DES desarrollaron un menor número de folículos  $\geq 2$  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 menores niveles circulantes de E2 sugiriendo una alteración en la 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 y DES alteró tanto el desarrollo como la funcionalidad ovárica en el modelo utilizado.

### **Conclusiones:**

Los resultados presentados en esta tesis nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

Los ovarios de las corderas control (no tratadas) presentaron una alta y temprana expresión de RE $\beta$  durante el primer mes de vida. Debido al rol fundamental de RE $\beta$  en el desarrollo y funcionalidad ovárica, sugerimos que podría ser un mediador de los efectos de xenoestrógenos sobre el ovario.

La exposición postnatal temprana de la cordera a los xenoestrógenos DES y BPA alteró en el normal desarrollo del ovario: disminución en el peso del órgano, en la reserva de folículos primordiales por estimulación y aceleración del desarrollo folicular, aumento de la atresia folicular y de la incidencia de FMOs.

Las dosis utilizadas para el trabajo son dosis bajas y en el caso de BPA seleccionamos la dosis definida como segura (50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  BPA). Los efectos detectados no sólo en este trabajo sino en publicaciones previas con otras especies, implican la necesidad de una revisión en las dosis definidas como seguras para BPA.

La administración por vía sc desde el nacimiento y hasta el DPN 14 produjo alteraciones en el ovario, detectadas en el día 30 de vida. Como en trabajos previos realizados en rata y ratón, la exposición durante las primeras semanas de vida postnatal en corderas, representa un período de alta susceptibilidad a los efectos de PEs.

Algunos de los cambios detectados (aumento de la proliferación de las células de la granulosa y de la activación folicular) son similares a los descritos en el síndrome de ovario poliquístico (SOP) de la mujer. En base a esto sugerimos que el modelo utilizado es apto para aportar información acerca de la posible etiología y aumento de la incidencia de ésta y/u otras patologías reproductivas.

La exposición postnatal temprana de la cordera a xenoestrógenos seguido de la estimulación con gonadotrofinas exógenas (en el DPN 30) permitió evidenciar alteraciones funcionales en el ovario: disminuyendo el número de folículos estimulados como la respuesta esteroidogénica.

Podemos concluir que la oveja resulta ser un modelo animal útil para estudiar el efecto de los PEs y que el diseño de estimulación con gonadotrofinas es eficaz para poner de manifiesto alteraciones funcionales en tejidos hormonodependientes, como el ovario.

El estudio futuro de la performance reproductiva de estas corderas permitirá definir si las alteraciones observadas, producen consecuencias durante la vida adulta. El mantenimiento de corderas expuestas hasta la vida adulta permitirá determinar si los efectos producidos por la exposición a xenoestrógenos son efectos organizacionales (es decir, permanentes).

### **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. En algunos casos, los resultados aportan importante información sobre las posibles causas de la menor fertilidad en el ganado.

También permiten suponer posibles asociaciones con animales de la fauna y de especies en peligro de extinción. 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.

### Lista de publicaciones realizadas como resultado del trabajo de tesis doctoral

#### Publicaciones *full paper*:

Rivera OE, Varayoud J, Rodriguez HA, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. "Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb". ***Reproductive Toxicology*** 32 (3), 304– 312, 2011.

Rivera OE, Varayoud J, Belmonte MN, Dioguardi GH; Rodriguez HA, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Neonatal exposure to xenoestrogens impaired the ovarian response to exogenous gonadotrophins in lamb (*manuscrito en elaboración para ser enviado a publicar*)

#### Presentaciones en congresos y publicación de resúmenes

Boimvaser S, Lower M, Varayoud J, Rivera OE. "La Exposición postnatal a Xenoestrógenos altera el desarrollo uterino de la oveja", XI Encuentro Jóvenes Investigadores Universidad Nacional del Litoral y II Encuentro Jóvenes Investigadores Universidades de Santa Fe. Ciudad Universitaria, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, 10 de Noviembre 2007. Este trabajo recibió Mención Especial en el Área de Ciencias Biológicas y de la Salud, subárea Veterinaria.

Rivera OE, Varayoud J, Rodríguez H, Di Mauro CE, Blanco MR, Muñoz de Toro M, Luque EH. "La Exposición postnatal a Dietilstilbestrol (DES) y Bisfenol A altera el desarrollo folicular de la oveja". XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas, I Congreso Internacional de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas, I Encuentro de Histotecnólogos. Córdoba, 14, 15 y 16 de Mayo 2008. ***Journal of International Morphology***, 3 (26), 2008.

Rivera OE, Varayoud J, Rodríguez H, Di Mauro CE, Muñoz de Toro M, Luque EH. "La Exposición neonatal a Bisfenol A (BPA) altera la dinámica folicular de la cordera". Presentación oral. LIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología. Mar del Plata, 19 al 22 de Noviembre de 2008. ***Medicina***, Buenos Aires 68:194, 2008.

Rivera OE, Varayoud J, Rodríguez H, Di Mauro CE, Muñoz de Toro M, Luque EH. "Xenoestrogens Exposure at Environmentally Relevant Doses Adversely Affects Ovine Follicular Development". 36th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society and 23rd Annual Meeting of the Sociedad Brasileira de Transferencia de Embriones. Enero 2010, Córdoba, Argentina. ***Reproduction, Fertility and Development*** (5305) 268–269, 2010.

Rivera OE, Varayoud J, Rodriguez H, Belmonte NM, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. "Expresión de receptores esteroides durante el desarrollo neonatal del ovario de oveja". LV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología 2010 y XLII Reunión de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Noviembre 2010, Mar del Plata. ***Medicina***, Buenos Aires 70:182 (Supl. II), 2010.

Milesi MM, Varayoud J, Rivera OE, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. "La exposición neonatal al pesticida endosulfán afecta la expresión de moléculas que regulan el desarrollo y la diferenciación del útero". LV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión Sociedad Argentina de Fisiología 2010 y XLII Reunión Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Noviembre 2010, Mar del Plata. ***Medicina***, Buenos Aires 70:75

(Supl. II), 2010.

Varayoud J, Ramos JG, Rivera OE, Belmonte N, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. "La exposición neonatal a bisfenol A y dietilestilbestrol altera el desarrollo glandular uterino de la oveja". LVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, 16-19 de Noviembre 2011. **Medicina**, Buenos Aires, 71:193, 2011.

Santamaría C.G., Abud J., Rivera O.E., Muñoz de Toro M., Luque E.H., Rodríguez H.A. "La exposición perinatal (prenatal/postnatal) a Bisfenol A (BPA) altera la tasa de ovulación/luteinización en la vida adulta". LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, 14-17 de Noviembre, 2012. **Medicina**, Buenos Aires, 72: 143, 2012.

Milesi MM, Alarcón R, Rivera OE, Muñoz-de-Toro M, Luque EH y Varayoud J."La exposición postnatal temprana al pesticida endosulfán altera la diferenciación del útero durante la implantación y disminuye la fertilidad". IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina, Resumen P77, pag. 154, 16 al 19 de Octubre 2012, Buenos Aires. Este trabajo recibió el **Primer premio** al mejor póster área temática Disrupción Endócrina.

Rivera OE, Varayoud J, V Bosquiazzo, Osti M, Belmonte NM, Rodríguez HA, Dioguardi G, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. "La exposición neonatal a Dietilstilbestrol (DES) ó Bisfenol A (BPA) altera la respuesta ovárica a un estímulo gonadotrófico". LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, 14-17 de Noviembre 2012. **Medicina**, Buenos Aires 72: 106, 2012.

Varayoud J., Milesi M.M, Alarcón R., Rivera O.E., Muñoz-de-Toro M.,Luque E.H. "Postnatal endosulfan exposure alters endocrine signalling and endometrial proliferation in the rat". Congreso de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Mendoza, Octubre 2012., **Biocell**, 36 (suppl.), 41, 2012.

Santamaría C.G., Abud J., Rivera O.E., Muñoz de Toro M., Luque E.H., Rodríguez H.A. "La exposición perinatal (prenatal/postnatal) a Bisfenol A (BPA) altera la tasa de ovulación/luteinización en la vida adulta". IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina, pag. 157, 16 a 19 de Octubre 2012, Buenos Aires.