

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A
PERTURBADORES ENDOCRINOS SOBRE EL
DESARROLLO OVÁRICO Y LA FERTILIDAD DE
LA HEMBRA**

Bioquímica Clarisa Guillermina Santamaría

Director de Tesis: Dr. Horacio A. Rodríguez

Co-director de Tesis: Dr. Enrique H. Luque

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral



I S A L

2016

A mi familia...

***A mis abuelos, por apoyarme en este camino,
por su respeto y confianza.***

***A mi tía y primos hermanos por ser
incondicionales a la distancia.***

***A mi madre por incentivarme cada día, por ser
mi guía y ejemplo a seguir, por enseñarme y
amarme.***

***Estoy muy orgullosa y feliz de tenerlos a mi
lado.***

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar un profundo agradecimiento a quienes fueron partícipes de esta tesis y sin los cuales no la hubiera logrado:

A mi querido director el Dr. Horacio Rodríguez por haberme elegido, brindándome sus conocimientos, confianza y cariño, y en lo personal por escucharme y aconsejarme cuando lo necesite.

A Mi co-director el Dr. Enrique Luque, quien me brindó todo el apoyo y la confianza necesarios para poder crecer.

A los directores del ISAL, antiguamente LETH, el Dr. Enrique Luque y la Dra. Mónica Muñoz de Toro, quienes generosamente me abrieron las puertas de sus laboratorios.

A mis compañeros de laboratorio con los que comparto la mayor parte de mis días y a los que ya no están, quienes aportaron su valioso esfuerzo y tiempo para ayudarme a lograr este objetivo.

A mi familia, a los que están y a los que se han ido.

A mis amigos de Santa Fe quienes estuvieron en todo momento, y amigos de Concepción del Uruguay, quienes estuvieron presentes incondicionalmente.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por brindarme los medios para realizar este trabajo de tesis.

A las autoridades de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional del Litoral, por haber hecho posible la realización de este trabajo.

A cada una de las personas que entraron en mi vida en estos 5 años para enseñarme, ayudarme y guiarme a ser cada día una mejor persona.

ÍNDICE GENERAL

Publicaciones y presentaciones a congresos	1
Abreviaturas generales	3
I-Introducción general	6
I.1 Panorama de la salud humana y de la fauna silvestre a nivel global	7
I.2 Perturbadores Endocrinos	9
I.2.1 ¿Qué son los PE?	9
I.2.2 ¿Cómo actúan los PE?	12
I.2.3 Conceptos claves en perturbación endocrina: efecto no lineal, momento de la exposición y dosis	12
I.2.3.A <i>Los PE pueden producir respuestas no lineales y no monotónicas</i>	12
I.2.3.B <i>Los PE pueden impactar a lo largo de toda la vida</i>	15
I.2.3.C <i>Los PE pueden actuar a bajas dosis</i>	17
I.2.4 ¿Por qué es importante el estudio de los PE?	17
I.3 Xenoestrógenos	18
I.3.1 BPA	18
I.3.1.1 ¿Cuán seguro es el BPA?	20
I.3.1.1.A <i>Dosis segura</i>	20
I.3.1.1.B <i>Exposición al BPA y las enfermedades humanas</i>	21
I.3.1.1.C <i>BPA y fertilidad femenina: múltiples acciones a distintos niveles podrían contribuir al deterioro de la capacidad reproductiva de las hembras expuestas a BPA</i>	22
I.3.2 DES	23
I.4 Ovario	25
I.4.1 Formación de la reserva de folículos primordiales en el ovario de mamíferos	25
I.4.2 Foliculogénesis	28
I.4.2.1 Activación folicular y reclutamiento inicial	28
I.4.2.2 Reclutamiento cíclico y ovulación	31
I.4.3 Hormonas esteroides y sus receptores	36
I.4.3.1 Andrógenos	37
I.4.3.2 Estrógenos	38

I.4.3.3 Progesterona	39
I.5 Ovario y xenoestrógenos	41
II- Capítulo 1. Disfunciones ováricas en ratas adultas nacidas de madres expuestas a bajas dosis de BPA	43
1.1 Introducción	44
1.2 Materiales y Métodos	45
1.2.1 Animales	45
1.2.2 Dosificación	46
1.2.3 Diseño experimental	47
1.2.4 Toma de muestras	48
1.2.5 Dinámica folicular	48
1.2.6 Expresión proteica de los receptores esteroideos y p27 por IHQ	51
1.2.7 Expresión génica de las enzimas de la esteroidogénesis y de los receptores de gonadotrofinas por RT-PCR en tiempo real	53
1.2.8 Ensayos hormonales	55
1.2.9 Ciclo estral	56
1.2.10 Análisis estadístico	56
1.3. Resultados	56
1.3.1 <i>Los ovarios de los animales expuestos a BPA mostraron un menor peso y una disminución del reclutamiento inicial</i>	57
1.3.2 <i>Los animales expuestos a BPA mostraron un aumento en el número de CL y en los niveles de P4</i>	59
1.3.3 <i>La expresión del ARNm de la enzima Hsd3b se incrementó en los ovarios de las hembras expuestas perinatalmente a ambas dosis de BPA</i>	60
1.3.4 <i>Los folículos reclutados mostraron menores niveles de RA, sin observarse cambios en REα, REβ y p27</i>	61
1.3.5 <i>La expresión del ARNm de FSHR fue alterada por la exposición a BPA</i>	65
1.4 Discusión	65
III- Capítulo 2. Efectos del BPA sobre la respuesta ovárica al tratamiento con gonadotrofinas exógenas en rata	70
2.1 Introducción	71
2.2 Materiales y Métodos	72
2.2.1 Diseño experimental	72

2.2.2 Toma de muestras	74
2.2.3 Análisis histológico	75
2.2.4 Conteo de ovocitos ovulados	76
2.2.4.1 Elección del momento óptimo para el conteo de ovocitos ovulados	76
2.2.5 Ensayos hormonales	77
2.2.6 Expresión proteica de los receptores esteroideos por IHQ	78
2.2.7 Expresión génica de las enzimas de la esteroidogénesis y de los receptores de gonadotrofinas por RT-PCR en tiempo real	79
2.2.8 Análisis estadístico	79
2.3 Resultados	79
2.3.1 Estado gonadotrófico basal	79
2.3.2 Estado ovárico luego del tratamiento exógeno con PMSG	80
2.3.2.a <i>La exposición perinatal a BPA condiciona la respuesta folicular ovárica a PMSG</i>	80
2.3.2.b <i>Expresión de receptores hormonales: REβ y RA</i>	81
2.3.2.c <i>Expresión de las enzimas de la esteroidogénesis y los receptores de gonadotrofinas</i>	82
2.3.2.d <i>Niveles de hormonas esteroideas circulantes</i>	82
2.3.3 Respuesta ovárica al tratamiento exógeno con PMSG+hCG	83
2.3.3.a <i>Dinámica folicular</i>	83
2.3.3.b <i>Tasa de ovulación</i>	84
2.3.3.c <i>Expresión de las enzimas de la esteroidogénesis y los receptores de gonadotrofinas</i>	85
2.3.3.d <i>Niveles de hormonas esteroideas circulante.</i>	86
2.3.3.e <i>Expresión del PR</i>	87
2.4. Discusión	88
2.4.1 Tratamiento con PMSG	88
2.4.2 Tratamiento con PMSG+hCG	89
IV- Capítulo 3. Acción del BPA en el ensamblado folicular en cultivos de ovarios enteros	92
3.1 Introducción	93
3.2 Materiales y Métodos	96
3.2.1 Optimización de la técnica de cultivo de órgano entero	96

3.2.1.1 Animales	97
3.2.1.2 Diseño experimental	97
3.2.1.3 Ensamblado folicular <i>in vivo</i> vs <i>in vitro</i>	98
3.2.1.4 Efecto inhibitorio de E2 sobre el ensamblado folicular <i>in vitro</i>	98
3.2.1.5 Optimización de la extracción de ARN del cultivo de ovario entero	99
3.2.2 Efectos del BPA sobre el ensamblado folicular <i>in vitro</i>	101
3.2.2.1 Conteo de ovocitos por inmunofluorescencia	102
3.2.2.2 Análisis de la ruptura de nidos y de la formación de folículos primordiales	103
3.2.2.3 Expresión de genes reguladores del <i>nest-breakdown</i>	104
3.2.3 Análisis estadístico	105
3.3. Resultados	105
3.3.1 Optimización de la técnica de cultivo de órgano entero	105
3.3.2 Efectos del BPA sobre el ensamblado folicular	106
3.3.2.1 Efectos de la exposición a estradiol y BPA sobre la expresión de genes reguladores del <i>nest-breakdown</i>	107
3.4 Discusión	108
V- Capítulo 4. La exposición neonatal a xenoestrógenos altera la respuesta ovárica al tratamiento con gonadotrofina exógena en corderas	111
4.1 Introducción	112
4.2. Materiales y Métodos	113
4.2.1 Animales y diseño experimental	113
4.2.2 Expresión génica de BMP, GDF9 y FSHR por RT-PCR en tiempo real	115
4.2.3 Análisis estadístico	116
4.3 Resultados	117
4.4 Discusión	118
VI- Conclusiones	121
VII- Anexo	124
A.1 Dinámica folicular en ratas prepuberales expuestas perinatalmente a BPA0.5 luego del tratamiento con PMSG	125
VII- Resumen en español	126
IX- Resumen en inglés (Abstract)	132
X- Bibliografía	135

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis han sido presentados en congresos y/o han sido publicados.

a) “Full paper”:

- Rodríguez HA; Santambrosio N; Santamaría CG; Muñoz-de-Toro M; Luque EH. Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod Toxicol.* 2010 Dec;30(4):550-7. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.07.008.
- Rivera OE, Varayoud J, Rodríguez HA, Santamaría CG, Bosquiazzo VL, Osti M, Belmonte NM, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Neonatal exposure to xenoestrogens impairs the ovarian response to gonadotropin treatment in lambs. *Reproduction.* 2015 Jun;149(6):645-55. doi: 10.1530/REP-14-0567.
- Porro V, Pagotto R, Harreguy MB, Ramírez S, Crispo M, Santamaría C, Luque EH, Rodríguez HA, Bollati-Fogolín M. Characterization of Oct4-GFP transgenic mice as a model to study the effect of environmental estrogens on the maturation of male germ cells by using flow cytometry. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015 Jul 4. pii: S0960-0760(15)30006-6. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.06.006.
- Santamaría CG, Durando M, Muñoz de Toro M, Luque EH, Rodríguez. Ovarian dysfunctions in adult female rat offspring born to mothers perinatally exposed to low doses of Bisphenol A. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015 Dec 4. pii: S0960-0760(15)30141-2. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.11.016.

b) Resumen:

- Santamaría C, Porro V, Jacob A, Bollati M, Kass L, Muñoz de Toro MM, Luque EH, Rodríguez HA. “La exposición prenatal/neonatal a bisfenol A (BPA) altera el desarrollo folicular en la vida adulta”. *Medicina (Bs As)* vol. 69, supl I: pág. 131, 2009.
- Santamaría C.; Jacob A.; Abud J.; Muñoz del Toro M.; Luque H.; Rodríguez H.” Cambios en la expresión del receptor de andrógenos en folículos ováricos

de rata adulta por exposición perinatal a bisfenol A”. *BIOCELL* 35(3), 2011. Pág. A264, 237.

- Santamaría CG.; Durando M.; Jacob A.; Abud J.; Muñoz de Toro M.; Luque EH.; Rodríguez HA. “Disfunciones ováricas producidas por la exposición perinatal (prenatal/postnatal) a bisfenol a (BPA) por vía oral”. *Medicina (Bs As)* vol. 71, supl. III: pág. 207, 2011.
- Santamaría CG; Abud, J; Durando M; Jacob A; Muñoz-de-Toro M; Luque EH; Rodríguez HA. “Evaluación toxicológica de estrógenos ambientales en cultivo de organo entero: bisfenol a y ensamblado folicular en ovarios de rata”. *V Simposio Latinoamericano de Tecnología de Cultivos Celulares (S3.9 pág.51)*. Santa Fe 2012.
- Santamaría CG; Abud J; Rivera OE; Muñoz de Toro M.; Luque EH.; Rodríguez HA. “La exposición perinatal (prenatal/postnatal) a Bisfenol A (BPA) altera la tasa de ovulación/luteinización en la vida adulta”. *Medicina (Bs As)* vol. 72, supl II: pág. 143, 2012.
- Santamaría C.; Abud J.; Rivera O.; Belmonte N.; Muñoz De Toro M.; Luque E.; Rodríguez H. La exposición perinatal a Bisfenol A (BPA) o Dietilestilbestrol (DES) altera la expresión de GDF-9 en ovejas”. *Medicina (Bs As)* vol. 73, supl III: pág. 161, 2013.
- Santamaría C.; Pagotto R.; Porro V.; Harreguy M.; Ramírez S.; Goyeneche L.; Fernández G.; Crispo M.; Abud J.; Bolzan B.; Luque E.; Bollati-Fogoln M.; Rodríguez H. “Empleo de un modelo transgénico murino (OCT4-GFP) para el estudio del efecto de perturbadores estrogénicos sobre la diferenciación de células germinales”. *Medicina (Bs As)* vol. 73, supl III: pág. 235, 2013.
- Santamaría C.; Abud J.; Rivera O. Muñoz De Toro M.; Luque E.; Rodríguez H. La exposición perinatal a Bisfenol A (BPA) modifica la expresión de las enzimas de la esteroidogénesis en rata. *Medicina (Bs As)* vol. 73, supl III: pág. 296, 2013.

ABREVIATURAS GENERALES

AFP	Alfa fetoproteína
ARKO	<i>Knock out</i> para receptor de andrógenos
BPA	Bisfenol A
BERKO	<i>Knock out</i> para receptor de estrógenos beta
CCAC	Adenocarcinoma cervico-vaginal de células claras
CG	Células germinales
CL	Cuerpo/s lúteo/s
COP	Contaminantes orgánicos persistentes
DES	Dietilstilbestrol
DG	Día gestacional
Downstream	Río abajo
dpc	Día posterior a la concepción
DPN	Día post natal
E2	17- β estradiol
ECV	Enfermedad cardiovascular
ED	Endocrine disruptor/s
EPA	Agencia de protección ambiental
ERKO	<i>Knock out</i> para receptor de estrógenos
FDA	Food and Drug Administration
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
FMO	Folículo/s multiovocitario/s

FOP	Falla ovárica prematura
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHR	Receptor de FSH
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
hCG	Hormona coriónica humana
IHQ	Inmunohistoquímica
i.m.	Intramuscular
i.p.	intraperitoneal
LOAEL	Lowest observed adverse effect level (nivel mínimo de efecto adverso observable)
M&M	Materiales y Métodos
Nest-breakdown	Ruptura de nidos
oFSH	Hormona folículo estimulante ovina
P4	Progesterona
PE	Perturbador/es Endocrino/s
P-H	Picrosirius-Hematoxilina
PMSG	Pregnant mare's serum gonadotropin (gonadotropina coriónica equina)
PRKO	<i>Knock out</i> para receptor de progesterona
REα	Receptor de estrógeno alfa
REβ	Receptor de estrógeno beta
RP	Receptor de progesterona
s.c.	Subcutánea

SOP	Síndrome ovárico poliquístico
T	Testosterona
TDI	Tolerable daily intake (Ingesta diaria tolerable)

I-INTRODUCCIÓN

Cuando hagas algo noble y hermoso y nadie se dé cuenta, no estés triste. El amanecer es un espectáculo hermoso y sin embargo la mayor parte de la audiencia duerme.

John Lennon

I.1 Panorama de la salud humana y de la fauna silvestre a nivel global

Las enfermedades crónicas, no infecciosas, son la principal causa de enfermedad y muerte en todo el mundo (Alwan 2011; Hanson y Gluckman 2011). Este panorama es preocupante tanto en la población infantil como adulta. En la población pediátrica estas incluyen asma, defectos congénitos, desórdenes del desarrollo neuronal, cáncer, diabetes y obesidad (Bloom y col., 2009). La prevalencia de asma infantil se ha duplicado en los últimos 20 años, transformándose en la principal causa de hospitalizaciones y ausentismo escolar (Landrigan y Goldman 2011). Además, se han podido establecer ciertas tendencias alarmantes en la salud pediátrica (Woodruff y col., 2004), como por ejemplo el incremento de más del 30% en el índice de nacimientos prematuros registrados desde 1981, en los Estados Unidos, el Reino Unido y Escandinavia (Martin y col., 2009; Medicine 2007). Los defectos congénitos son una de las principales causas de muerte infantil, y la frecuencia de ciertos defectos de nacimiento, como los asociados a los órganos reproductores masculinos, está creciendo en muchos países (Caione 2009). Las incidencias de leucemia infantil y cáncer de cerebro también han aumentado (Woodruff y col., 2004), así como la de cáncer testicular, registrándose en este caso aumentos de hasta el 400%, que lo confirma como el cáncer más común en los hombres jóvenes de muchos países industrializados.

En los adultos, dentro de las enfermedades crónicas se incluyen enfermedades cardiovasculares (ECVs), cáncer, diabetes y obesidad, así como también enfermedades autoinmunes y alérgicas (Pleis y col., 2010). Algunos ejemplos importantes son el incremento de los índices de obesidad global, presión arterial elevada, diabetes y síndromes metabólicos. Los cánceres en la población adulta son una de las mayores causas del incremento de mortalidad en todo el mundo y son superados sólo por las ECVs. En particular, dentro de los cánceres del sistema endocrino, el de mama es el segundo cáncer más común en el mundo y el más frecuente en las mujeres. Otros cánceres de etiología endocrina son el de próstata y el cervical, los cuales están entre los 10 cánceres más comunes a nivel global, junto con el colorrectal, el de estómago, de hígado, de esófago, de cabeza, cuello y vejiga. Por otro lado, en las últimas dos décadas se identificaron dificultades entre las mujeres para concebir y mantener el embarazo (Chandra y col., 2013). Enfermedades como el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), la fibrosis uterina y la endometriosis impactan produciendo cuadros de subfertilidad e

infertilidad en las mujeres en edad reproductiva, en 3 al 15%, 25 al 50%, y 10 al 35 %, respectivamente.

En la población juvenil el cuadro también merece un análisis. En las niñas de América y Europa hay una tendencia al inicio precoz de la pubertad. Este nuevo escenario es preocupante porque puede conducir a la reducción de la talla adulta, a un mayor riesgo de cáncer de mama y al aumento en la frecuencia de SOP (Castellino y col., 2005; DiVall y Radovick 2009; Euling y col., 2008; Semiz y col., 2008). La incidencia de cáncer testicular también ha aumentado notablemente, hasta un 400%, estableciéndose como el cáncer más común en los hombres jóvenes en muchos países industrializados (Huyghe y col., 2003; Richiardi y col., 2004). Notablemente, en algunos países se han observado grandes proporciones (hasta un 40%) de hombres jóvenes que tienen una baja calidad espermática, lo cual impactaría negativamente en su capacidad reproductiva (Bonde y col., 1998; Guzick y col., 2001; Skakkebaek 2010).

Estas estadísticas de salud pública no sólo se registran en la población humana, sino que presentan paralelismos importantes en poblaciones de animales domésticos y de la vida silvestre. Por ejemplo, los animales que viven cerca de asentamientos humanos tienen tendencia a incrementar el peso corporal (Klimentidis y col., 2011). En el estuario de San Lorenzo, Quebec, Canadá, tanto la ballena beluga como las poblaciones humanas tuvieron tasas más altas de cáncer que los habitantes de otras regiones de Canadá, y algunos de estos cánceres estarían epidemiológicamente relacionados a la exposición a contaminantes químicos. Otros datos en el mismo sentido provienen de un estudio con más de 8000 perros, los cuales mostraron cáncer de vejiga con una distribución similar a la de cáncer de vejiga de sus dueños (Hayes y col., 1981).

Las similitudes en la distribución de enfermedades y distintos trastornos entre humanos y diversas poblaciones de la fauna silvestre no son sorprendentes, dado que a menudo existe una considerable superposición entre sus entornos y cadenas alimentarias, así como también en su fisiología. Se ha estimado que hasta un 24% de las enfermedades y trastornos humanos a nivel mundial se deben, al menos en parte, a factores ambientales (Prüss-Üstün 2006). Esto proporciona una oportunidad para contrarrestar esta situación mediante el accionar adecuado sobre los elementos del ambiente que impactan en la salud humana y animal (Landrigan y Goldman 2011). Para ello, en principio es

necesario tener la capacidad de identificarlos y comprender su mecanismo de acción, para poder luego diseñar y ensayar distintas estrategias destinadas a minimizar su impacto. Uno de estos elementos está representado por las distintas sustancias presentes en el ambiente y a las cuales la población está expuesta. De hecho, vivimos en un mundo en el cual convivimos con sustancias químicas antropogénicas o naturales y que se han convertido en parte de nuestra vida diaria. Algunas de estas sustancias pueden afectar el sistema endocrino, y como tal pueden interferir con los procesos controlados hormonalmente. El hecho de que muchas de las enfermedades descritas previamente estén asociadas con alteraciones del sistema endocrino ha llevado a enfocar la atención en la creciente exposición a estos químicos que tienen la capacidad de alterar las vías endocrinas, los que son conocidos como perturbadores endocrinos (PE).

I.2. Perturbadores Endocrinos

I.2.1 ¿Qué son los PE?

En los últimos años, uno de los principales debates científicos internacionales refiere a las consecuencias adversas sobre la salud humana y animal causadas por la exposición a un grupo de compuestos químicos naturales o sintéticos que contaminan el medio ambiente y que se caracterizan por interferir con la actividad de eventos regulados hormonalmente. A estos químicos se los conoce como PE o *endocrine disrupting chemicals* (Knobil 1999). Un PE se define por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) como "*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*" (U.S. EPA. 1997). Dado el papel central del sistema endocrino en la fisiología de los organismos, las perturbaciones comprendidas en esta definición incluyen procesos tan variados y diversos como alteraciones de la lactancia, la maduración sexual, la capacidad de producir descendencia fértil, el comportamiento sexual, o la senescencia prematura reproductiva.

Se conocen cientos de compuestos químicos producidos por el hombre (antropogénicos) o naturales, capaces de producir alteraciones en los sistemas endocrinos de los seres humanos y la vida silvestre. Sus fuentes de exposición, las propiedades químicas y el destino ambiental varían ampliamente entre ellos. A los efectos de esta tesis, adoptaremos una clasificación de estos químicos agrupándolos en 11 grandes

categorías, en función de sus características físico-químicas y las zonas de origen o aplicación (Bergman 2012). Las categorías incluyen productos químicos que se producen actualmente, y otros que ya no se fabrican o se están eliminando de la producción. Una primera clasificación de los PE abarcó principalmente los *contaminantes orgánicos persistentes* o COP (IPCS 2002), pero esto se amplió recientemente para incluir productos químicos orgánicos menos persistentes y menos bioacumulables (por ejemplo pesticidas, plastificantes, productos farmacéuticos, hormonas naturales, fitoestrógenos, aditivos de productos) y metales. Algunos PE son persistentes en el medio ambiente, se bioacumulan a través de las redes alimentarias a altas concentraciones en la fauna y en los seres humanos, y pueden ser transferidos al feto en desarrollo y al recién nacido a través de la placenta o de la leche materna, respectivamente. Otros PE son menos persistentes y poseen vidas medias cortas, como el bisfenol A (BPA), que posee una vida media de 4-8 horas (Volkel y col., 2002). Si bien no son bioacumulables, su presencia en el ambiente también representa una preocupación porque la exposición a ellos puede ser continua. Estos productos químicos se han clasificado como *pseudo-persistentes*, ya que mediante la emisión continua al medio ambiente prácticamente se convierten en contaminantes "persistentes", aunque sus vidas medias sean cortas (Daughton 2003). Mientras que algunos productos químicos afectan el sistema endocrino en su forma original, otros sufren transformaciones metabólicas en el cuerpo o se transforman en variantes más activas en los sistemas endocrinos. En contraste con la situación respecto a 10 años atrás, hay una mejor apreciación de la sociedad general de que los productos industriales y de consumo pueden contener PE conocidos o potenciales. Cosméticos y otros productos para el cuidado personal (champús y otros productos para el cabello, pasta de dientes, jabones, lociones) pueden contener fragancias (por ejemplo, galaxolide), disolventes (metilsiloxanos cíclicos), conservantes (parabenos), plastificantes (ésteres de ftalato), antimicrobianos (triclosan), agentes químicos de estabilización (ftalatos), y metales (plomo, arsénico, mercurio) capaces de alterar alguna vía hormonal. Los productos farmacéuticos para uso humano o veterinario contienen PE e incluyen a los anticonceptivos u otra terapia hormonal, reguladores de lípidos, betabloqueantes, antidepresivos y antibióticos. Productos para el hogar, la escuela y el lugar de trabajo, tales como productos de limpieza, juguetes, electrónica, muebles, materiales de construcción, pinturas, papel, ropa y suministros de jardinería contienen una amplia gama de productos químicos considerados como PE, incluyendo retardantes de llama,

agentes antimicrobianos y estabilizantes químicos, plastificantes, perfumes, disolventes, conservantes, metales y plaguicidas (Tabla I.1).

Tabla I.1. Clasificación de los PEs y algunos ejemplos.

CLASIFICACIÓN		EJEMPLOS ESPECIFICOS DE PEs
Químicos halogenados persistentes y bioacumulables		
Contaminantes orgánicos persistentes (COP)		PCB (como agentes de transferencia de calor, en aceites de transformadores y condensadores de aislamiento), DDT(para controlar las enfermedades transmitidas por vectores), Endosulfán (Pesticida de uso agrícola)
Otros químicos persistentes y bioacumulables		HBCDD (retardante de llama en los materiales aislantes en la construcción) , PFOA (emulsionante de polímeros fluorados y surfactante industrial)
Químicos menos persistentes y menos bioacumulables		
Plastificantes y otros aditivos en materiales y productos		Esteres de ftalatos: DEHP (plastificante depolímeros)
Químicos aromáticos policíclicos (PACs)		Benzo(a)pireno (producto de combustión incompleta como en la combustión de combustibles fósiles)
Químicos fenólicos halogenados		Triclosan (antimicrobiano en productos de cuidado personal)
Químicos fenólicos no halogenados		BPA (policarbonatos plásticos)
Ingredientes de pesticidas, productos farmacéuticos y de cuidado personal		
Pesticidas de uso actual		Atrazina (herbicida), , Clorpirifos
Ingredientes de los productos farmacéuticos, promotores del crecimiento y cuidado personal		DES, Etinilestradiol y Levonorgestrel (anticonceptivos orales), Tamoxifeno (tratamiento oncológico) , galaxoide, parabenos
Otros químicos		
Químicos metálicos y organometálicos		Arsénico, Mercurio, Metilmercurio (cosméticos y otros productos para el cuidado personal)
Fitoestrógenos		Isoflavonas: Genisteina, Daidzein

HBCDD: Hexabromocyclododecano. PCB: Bifenilopoliclorados. DDT: diclorodifeniltricloroetano. PFOA: ácido perfluorooctanoico. DEHP: Di (2-etilhexil) ftalato. DES: Dietilstilbestrol.

I.2.2 ¿Cómo actúan los PE?

En general, hay dos vías por las que un PE podría alterar la acción hormonal:

- por una acción directa sobre el complejo de proteínas de receptores hormonales;
- por una acción directa sobre una proteína específica que controla algún aspecto de la síntesis y transporte de la hormona al lugar adecuado en el momento adecuado. Por ejemplo, proteína que está implicada en la producción de hormonas (por ejemplo, la aromatasas), un transportador importante (por ejemplo, el de sodio/yoduro), o una proteína transportadora sérica (por ejemplo, la proteína de unión a cortisol) (Tabb y Blumberg 2006).

De esta manera, un PE podría modificar la síntesis de una hormona, aumentando o disminuyendo los niveles séricos de la misma. El impacto en la acción *downstream* (río abajo) de esa hormona en principio sería el mismo que para una enfermedad o defecto genético que causara la inhibición o estimulación de la síntesis hormonal. En contraste, si una sustancia química interactúa directamente con un receptor hormonal, podría actuar con una acción similar a la de las hormonas endógenas (agonistas), o inhibir/bloquear su acción (antagonistas) (Bergman 2012).

La perturbación endocrina representa una forma especial de toxicidad, dado que ciertas características de su accionar representan similitudes con las características de acción de las hormonas. Es muy importante que estos aspectos sean tenidos en cuenta tanto a la hora de interpretar los resultados de los estudios de alteración endocrina de productos químicos, como en el diseño de los estudios cuyo objetivo es investigar los efectos de algún PE y cuantificar los riesgos para la salud humana y la vida silvestre (Bergman 2012).

I.2.3 Conceptos claves en perturbación endocrina: efecto no lineal, momento de la exposición y dosis

I.2.3.A Los PE pueden producir respuestas no lineales y no monotónicas

Dado que la interacción de las hormonas naturales con sus receptores se da en una forma no lineal, dando origen a curvas dosis-respuesta no lineales, se espera que los PE

también produzcan respuestas no lineales. La curva dosis-respuesta puede tomar varias formas: en su forma más simple adopta una forma sigmoideal, las que se producen porque las hormonas actúan sobre receptores que son limitados en número y también porque la propia respuesta es "saturable". Eso significa que hay una dosis de hormona (o PE) más allá de la cual no hay un incremento en la respuesta (Figura I.1). Por otro lado, otra característica es que a medida que aumenta la concentración de los receptores, y en iguales condiciones de otros factores que afectan la respuesta (co-represores, co-estimuladores, componentes de la vía de señalización, etc.), la hormona se convierte en "más potente"; es decir, se necesita significativamente menos hormona para producir la misma respuesta (Figura I.2). Sin embargo, la curva dosis-respuesta puede adoptar formas más complejas, llegando a producir respuestas no monotónicas en las que la pendiente de la curva cambia en el transcurso de la relación dosis-respuesta (Figura I.3). Estas curvas dosis-respuesta son referidas frecuentemente como curvas en forma de U (con respuestas máximas observadas a dosis bajas y altas) o de U invertida (con respuestas máximas observadas a dosis intermedias).

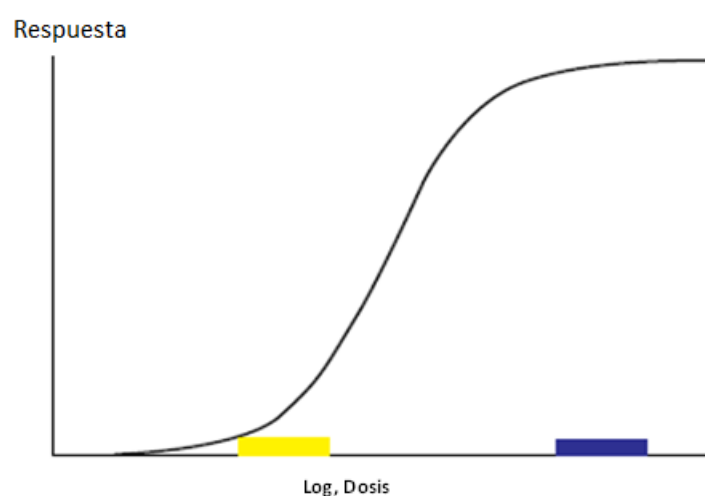


Figura I.1. Curva dosis-respuesta para las hormonas. Cuando aumenta la dosis de la hormona, la respuesta aumenta de forma exponencial hasta el punto de saturación. Como se observa en la curva un pequeño cambio en la concentración de la hormona en el extremo inferior de la curva (recuadro amarillo) da mayores diferencias sobre la respuesta que un cambio similar en la concentración de la hormona en el extremo superior de la curva (caja azul). De esta manera, concentraciones muy bajas de PE podrían aumentar el efecto de la hormona endógena, generando una respuesta mucho mayor que la que se podría predecir teniendo en cuenta sólo los niveles de la hormona (Modificado de Bergman 2012).

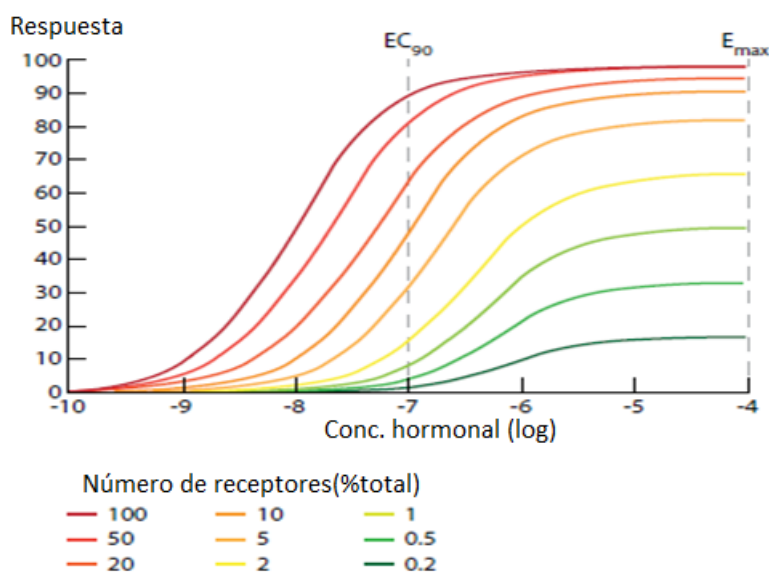


Figura I.2. La curva dosis-respuesta a la hormona depende de la concentración del receptor. Los receptores hormonales se pueden expresar a diferentes concentraciones, y esto afectará las diversas características de la curva de dosis-respuesta (y en iguales condiciones de otros factores que afectan la respuesta como co-reguladores, componentes de la vía de señalización, etc.). En este caso, a medida que aumenta la concentración de los receptores, la curva de dosis-respuesta se desplaza a la izquierda; es decir, el mismo efecto biológico se produce a concentraciones hormonales inferiores (Modificado de Charlton 2009).

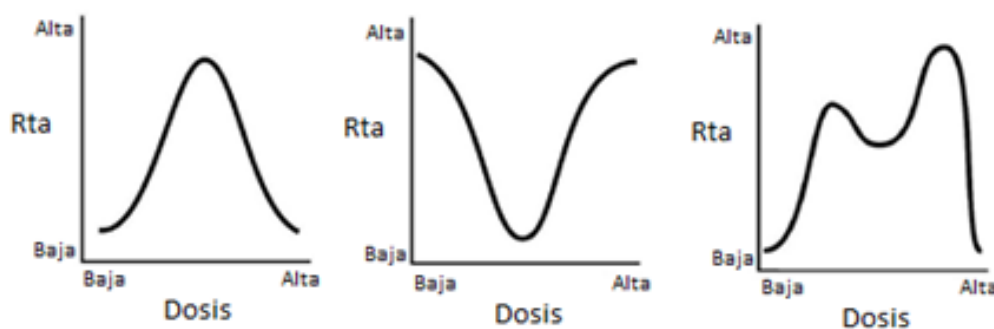


Figura I.3. Respuestas no monotónica o bifásicas. Dado que las hormonas interactúan con sus receptores de una manera no lineal, las curvas dosis-respuesta pueden ser no monotónicas. Dentro de éstas las más frecuentes son las que adoptan forma de U (con respuestas máximas observadas a dosis bajas y altas) o en forma de U invertida (con respuestas máxima observada a dosis intermedias) (Modificado de Vandenberg y col., 2012).

Es importante reconocer que es muy frecuente observar este tipo de curva dosis-respuesta en los estudios de PE. De hecho, este tipo de respuestas no monotónicas

(Figura I.3) se ha demostrado en más de una docena de hormonas naturales y en más de 60 PE, tanto en cultivo de células animales como en experimentos *in vivo* (Vandenberg y col., 2012).

Los estudios *in vitro* han sido fundamentales para la comprensión de los mecanismos que subyacen a las respuestas de dosis no monótonicas. Distintas investigaciones que utilizan líneas celulares sensibles a muchas hormonas han demostrado que las respuestas no monótonicas pueden ser producidas por una variedad de mecanismos (Vandenberg y col., 2012). Un mecanismo implica la integración de dos (o más) poblaciones celulares con respuestas monótonicas diferentes que afectan a un punto final común (Soto y col., 1995). Otro mecanismo es resultado de la regulación en baja del receptor: cuando las hormonas están presentes en altas concentraciones, se unen a sus receptores causando una disminución del número de receptores. La degradación de los receptores se incrementa cuando la hormona es abundante, y la capacidad de la célula para reemplazar estos receptores es más lenta que la velocidad a la cual se eliminan. Por lo tanto, las altas concentraciones de hormonas conducen a un menor número de receptores disponibles, y un cambio natural en la respuesta mediada por el receptor (Shankaran y col., 2007). Un tercer mecanismo de las respuestas no monótonicas sería el aumento de la toxicidad de una hormona (citotoxicidad) a dosis altas (Welshons y col., 2003). Finalmente, las respuestas no monótonicas pueden ocurrir debido a las diferencias en la afinidad por el receptor a baja dosis frente a dosis altas. Más específicamente, a dosis bajas de BPA, éste se une casi exclusivamente a los receptores de estrógeno, pero a dosis altas también puede unirse débilmente a otros receptores de hormonas, como receptor de andrógenos y el receptor de la hormona tiroidea. Por lo tanto, los efectos observados a dosis altas pueden ser debidos a la acción a través de múltiples receptores, en comparación con los efectos de dosis bajas, que sólo serían causados a través de un único receptor o familia de receptores (Moriyama y col., 2002; Sohoni y Sumpter 1998). A bajas dosis ciertos PE pueden actuar de manera dependiente de RE, mientras que a dosis mas altas a través de un mecanismo independiete de éstos como por ejemplo cambios en le balance redox (Ventura y col., 2012).

1.2.3.B Los PE pueden impactar a lo largo de toda la vida

Los PE pueden actuar durante toda la vida al igual que lo hacen las hormonas. Cuando los PE están presentes durante las etapas tempranas del desarrollo, pueden afectar la

programación celular y el desarrollo del tejido y por lo tanto sus efectos son potencialmente permanentes. Cuando el mismo PE actúa en la adultez, en general los efectos tienden a ser transitorios (Figura I.4). Por lo tanto, es importante diseñar la exposición al PE en el momento del desarrollo que sea apropiado para el proceso específico que se pretende evaluar. Esto puede ser incluso más difícil para aquellos PE que no persisten en el organismo, en comparación con aquellos PE que sí lo hacen. Por otro lado, los efectos durante una etapa temprana del desarrollo, en principio, se producirán con dosis más bajas que las requeridas para producir efectos en los adultos (Alonso-Magdalena y col., 2010). En algunos casos, el efecto de la exposición a un contaminante puede no ser evidente hasta la edad adulta, debido a que sus efectos son sobre la programación de la diferenciación celular asociada al desarrollo de los tejidos, resultando, por ejemplo, en un tejido con una predisposición diferente para una enfermedad en la edad adulta (Prins y col., 2008).

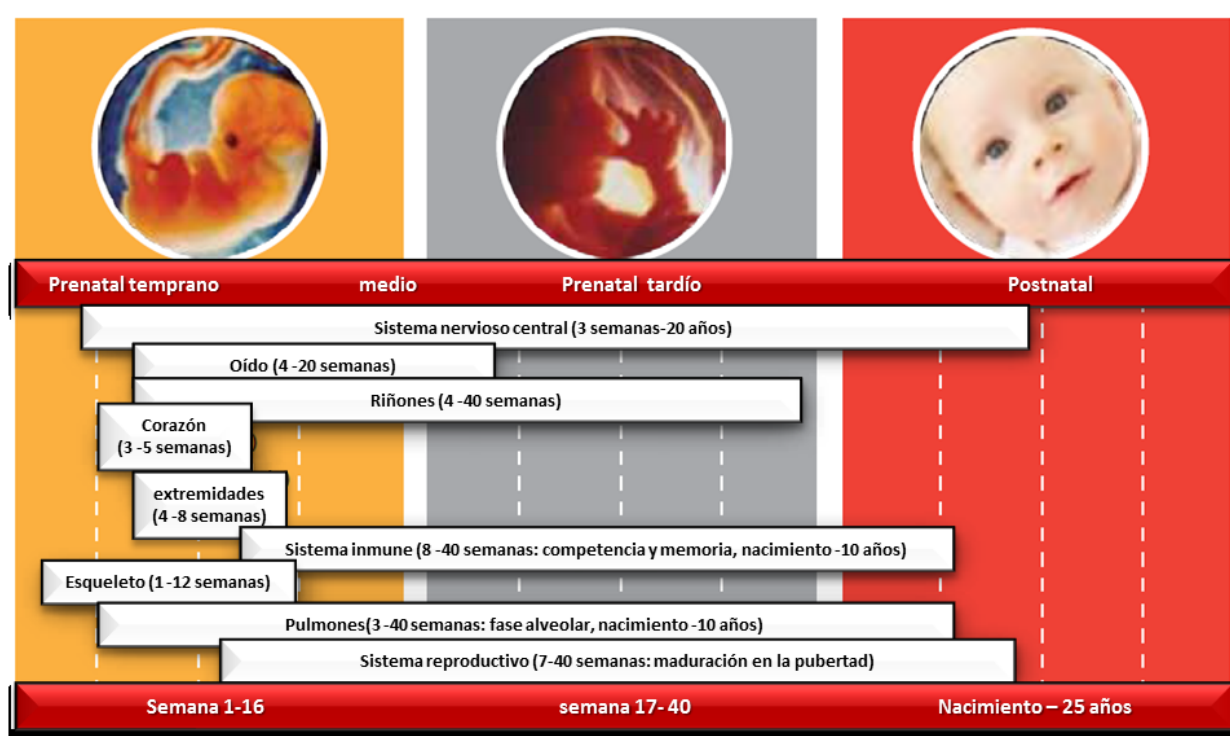


Figura I.4. Períodos de desarrollo de órganos en las etapas prenatal y postnatal. Al igual que las hormonas, los PE pueden afectar procesos de desarrollo que influyen durante toda la vida en el desarrollo, la vida temprana, en la niñez, la pubertad y la adultez (Modificado de Bergman y col., 2012).

1.2.3.C Los PE pueden actuar a bajas dosis

Las hormonas pueden actuar a dosis bajas, en parte, en virtud de su fuerte afinidad por sus receptores. Algunos PE tienen una muy alta afinidad por los receptores nucleares y como resultado pueden actuar a dosis muy bajas. Sin embargo, es importante reconocer que los PE pueden actuar a dosis bajas incluso si su afinidad por los receptores hormonales es menor que la de la hormona nativa. Se ha enfatizado que una baja afinidad (capacidad para unirse) no se traduce necesariamente en una baja potencia (capacidad para causar efecto), (Ruenitz y col., 1996). Esto puede ocurrir, porque el impacto de pequeños cambios en la acción de la hormona en el extremo inferior de la curva de dosis-respuesta es mucho mayor que en el extremo superior de la curva de dosis-respuesta (véase la figura I.1). Además, las diferencias en la abundancia del receptor tienen un efecto muy grande sobre la concentración de la hormona o PE necesaria para producir una respuesta determinada (véase la figura I.2). Los PE pueden tener diferentes potencias según las isoformas del receptor (por ejemplo, receptores de estrógenos α , RE α , o β , RE β). Por lo tanto, la "potencia" de un PE dependerá de varios factores importantes. Esto explica por qué algunas células y tejidos, o determinados momentos del desarrollo, son mucho más sensibles a unos PE que a otros. Hay varios ejemplos de PE que producen efectos a bajas dosis (Welshons y col., 2006; Witorsch 2002). Además, y tradicionalmente dentro del campo de la perturbación endocrina, la definición de dosis baja es objeto de debate. El término "dosis baja" se define de dos maneras. La primera se refiere a una dosis inferior a la que tradicionalmente es aceptada por los toxicólogos como el nivel sin efecto adverso observable, NOAEL. La segunda corresponde a la de una dosis que es ambientalmente relevante para los seres humanos o población animal objeto del estudio (Owens y Chaney 2005).

1.2.4 ¿Por qué es importante el estudio de los PE?

La hipótesis general de trabajo en el campo científico de la perturbación endocrina es que el incremento en la incidencia de ciertas patologías reproductivas está causado, al menos en parte, por la creciente exposición a los PE presentes en el medio ambiente. De esta manera, diversas enfermedades como cáncer de testículo y mama, subfertilidad o infertilidad y bajo recuento espermático, han sido asociadas a la creciente exposición a PE (Cook y col., 2011; Dallinga y col., 2002; Mendola y col., 2008; Woodruff y col., 2008). Esta asociación también encuentra fundamentación en el ámbito local, ya que se ha detectado una alta concentración de organoclorados clasificados como PE en la grasa

adyacente a lesiones mamarias de mujeres que habitan el sur del Litoral argentino (Munoz-de-Toro y col., 2006). También se han demostrado alteraciones reproductivas en ovinos, porcinos y bovinos atribuibles a la exposición a PE, afectando sus rendimientos económicos (Magnusson 2012). En la fauna silvestre local, tanto nuestro propio grupo de investigación como otros, hemos demostrado alteraciones de numerosos biomarcadores (Stoker y col., 2011; Stoker y col., 2013). Además, los altos índices de pérdidas embrionarias durante la pre-implantación en humanos, observadas también en especies de interés zootécnico, podrían reflejar defectos relacionados con el desarrollo del tracto reproductor producidos durante períodos organizacionales críticos que son de gran sensibilidad a los efectos de los PE.

Esta variedad de patologías reproductivas podría ser el resultado de defectos en el desarrollo de tejidos y órganos del sistema reproductor, producidos durante períodos organizacionales críticos de alta sensibilidad a los PE durante la vida fetal y postnatal temprana (Bern 1992). De hecho, muchos de los efectos adversos de los PEs ocurren por exposición a bajas dosis, similares a las que se encuentran en el ambiente y que son consideradas inocuas por organismos de regulación ambiental. Esto podría deberse a una mayor susceptibilidad de las células durante su diferenciación, a la inmadurez del sistema endocrino y/o inmune (Crisp y col., 1998), o a la falta de madurez de los procesos de detoxificación en el feto/neonato (Taylor y col., 2008).

Dado el enfoque de este trabajo de tesis doctoral, en el resto de esta introducción describiremos algunos conceptos importantes relativos a un grupo particular de PE, los xenoestrógenos, y al desarrollo ovárico en mamíferos.

I.3 Xenoestrógenos

Los estrógenos ambientales o xenoestrógenos son compuestos antropogénicos que se unen a los receptores de estrógenos y desencadenan una respuesta agonista o antagonista (Safe 1999). De particular interés para esta tesis doctoral son dos xenoestrógenos ampliamente difundidos en el ambiente: el BPA y el DES.

I.3.1 BPA

El BPA es uno de los compuestos químicos más producidos en el mundo. Las estimaciones actuales indican que aproximadamente 100 toneladas se liberan a la atmósfera cada año (Vandenberg y col., 2010). A partir de las décadas de 1940 y 50 y

hasta la actualidad, el BPA es usado como monómero en la manufactura de policarbonatos plásticos y resinas epoxy que recubren la mayor parte de latas de alimentos y bebidas. También es utilizado en selladores dentales y como aditivo en otros plásticos (Figura I.5). Otros artículos de uso diario que contienen BPA y con los cuales entramos en contacto en el hogar y en el lugar de trabajo incluyen CDs, DVDs, partes de equipos eléctricos, electrónicos y de automóviles, y papel termosensible (Rubin 2011). Así, el BPA está presente en el revestimiento de algunos contenedores de alimentos y en algunos productos de papel tales como recibos de caja registradora (Liao y Kannan 2011; Muncke 2009).

Las moléculas de BPA se unen por enlaces éster formando polímeros. Cuando los polímeros se exponen a altas temperaturas o a sustancias ácidas o básicas se hidrolizan, liberando los monómeros de BPA hacia el contenido del recipiente, como es el caso de los biberones calentados al microondas que liberan BPA a la leche (Welshons y col., 2006).

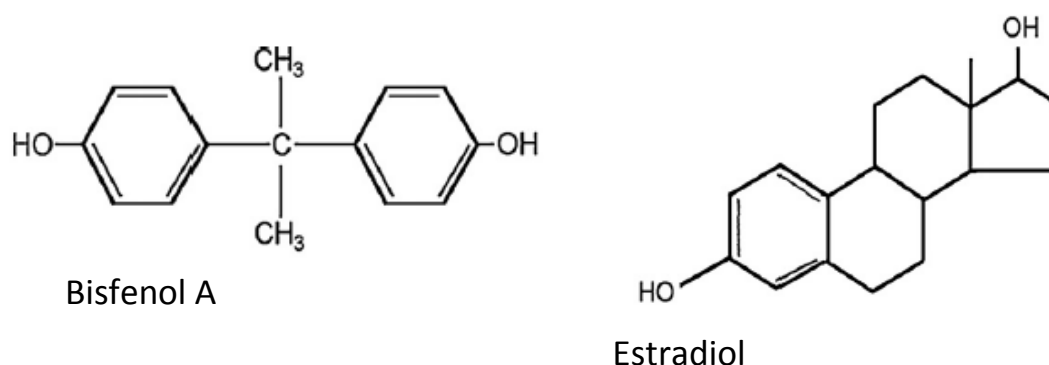


Figura I.5. Estructura química del BPA y estradiol (Modificado de Rubin y col., 2011).

La ingestión es considerada la principal vía de exposición al BPA en los seres humanos (Richter y col., 2007). Después de la ingesta, se estima que el BPA es rápidamente metabolizado y excretado en la orina, siendo las concentraciones internas del BPA no conjugado de 1 ng/ml aproximadamente (Vandenberg y col., 2010). Un amplio estudio de la población estadounidense reveló niveles detectables de BPA en muestras de orina en el 93.4 % de los individuos incluidos en este trabajo. En promedio, los niveles de BPA observados fueron de 4,5 ng/ml en niños (6-11 años de edad), 3,0 ng/ml en los adolescentes (12-19 años de edad) y 2,5 ng/ml en adultos (mayores de 20 años de edad) (Calafat y col., 2008; Vandenberg y col., 2010). Sin embargo, fue en la subpoblación

más vulnerable, en bebés prematuros de menos de 44 semanas de edad con al menos 3 días en cuidados intensivos, donde se encontraron los mayores niveles de BPA en comparación con los de la población general, alcanzando un nivel promedio de 30,3 ng/ml (Calafat y col., 2009). Además, también se ha detectado BPA en líquido amniótico humano, sangre neonatal, placenta, sangre del cordón umbilical y leche materna humana (Richter y col., 2007). Estos datos fundamentan la preocupación por la exposición a BPA en un momento del desarrollo de los seres humanos de elevada vulnerabilidad a la acción de agentes ambientales, planteando la necesidad de un estudio de seguimiento de esta población desde la infancia hasta la adultez.

Si bien la ingesta es considerada la principal vía de exposición a BPA, tanto en ratones como en simios se ha observado que no se alcanzan los niveles séricos de BPA cuando la exposición es sólo por la vía oral (Tharp y col., 2012). Otros estudios sugieren que: (1) la vida media del BPA es más larga de lo esperada, (2) el BPA se almacena en el cuerpo (Fernandez y col., 2007), y/o (3) la ingestión no es la única vía de exposición para BPA (Stahlhut y col., 2009). Es posible que, además de la vía oral, el aire y la absorción a través de la piel deban ser consideradas vías de exposición al BPA significativas para la población humana (Biedermann y col., 2010; Zalko y col., 2011). De hecho, en la última década se ha hecho evidente que los seres humanos, en particular los niños pequeños, también están expuestos a los PE a través de otras vías de ingreso, como el polvo y partículas en ambientes internos como viviendas, escuelas, centros de cuidado de niños y oficinas. Estos PE son liberados de materiales y mercaderías en los hogares y en el trabajo. Por ejemplo, para la mayoría de los adultos, la exposición a los PE y algunos compuestos organo-halogenados persistentes ocurre principalmente a través del consumo de alimentos grasos. Sin embargo, se ha podido observar que los bebés y los niños pequeños corren un riesgo especial para la exposición a estas sustancias químicas a través de su actividad de tocar todo con la mano e introducirlo en la boca (Goosey y Harrad 2011; Haug y col., 2011; Lunder y col., 2010; Trudel y col., 2011).

I.3.1.1 ¿Cuán seguro es el BPA?

I.3.1.1.A *Dosis segura*

El nivel más bajo de efectos adversos observados (LOAEL: *lowest observed adverse effect level*) para el BPA es 50 mg/kg de peso corporal/día. Este valor de LOAEL se estableció por los resultados obtenidos a partir de un estudio de carcinogénesis realizado

en roedores adultos expuestos diariamente a altas dosis de BPA (Vogel 2009). A continuación, para determinar los límites de exposición diaria permitida, el LOAEL establecido (50 mg/kg de peso corporal/día) se dividió por un factor de incertidumbre de 1.000 a fin de proporcionar un margen de seguridad. Por lo tanto, la dosis segura o ingesta diaria permitida (tolerable daily intake o TDI) de BPA establecida por la EPA en 1988 y adoptada por la FDA (Food and Drug Administration) para la población humana, se fijó en 50 µg/kg de peso corporal/día (Vandenberg y col., 2009).

I.3.1.1.B Exposición al BPA y las enfermedades humanas

Esta dosis de referencia sigue siendo hoy en día un estándar de seguridad del BPA, a pesar de los nuevos conocimientos sobre el mismo y de los numerosos informes de efectos de dosis-respuesta no monotónicas del BPA (Alonso-Magdalena y col., 2008; Hugo y col., 2008; Vandenberg y col., 2009; Welshons y col., 2006). En los seres humanos, se ha podido establecer numerosas correlaciones entre los niveles urinarios elevados de BPA en los adultos con diversas enfermedades (Lang y col., 2008). Por ejemplo, se han reportado correlaciones entre los niveles séricos de BPA y abortos involuntarios recurrentes (Sugiura-Ogasawara y col., 2005). Niveles urinarios elevados de BPA se han asociado con un mayor número de partos prematuros (Cantonwine y col., 2010) y también con una reducción del número de ovocitos recuperados en mujeres bajo tratamiento de FIV (Fertilización *in vitro*) (Mok-Lin y col., 2010). En mujeres posmenopáusicas, los altos niveles urinarios de BPA están relacionados con un aumento de biomarcadores genéricos de inflamación y estrés oxidativo (Yang y col., 2009). En hombres, la disminución de la calidad del semen y el daño del ADN del esperma se han asociado también con mayores niveles urinarios de BPA (Li, D. K. y col., 2011).

La exposición a BPA también se ha asociado a alteraciones de tipo conductual. Un estudio reciente muestra que la exposición prenatal a BPA (según la evaluación de las mediciones de los niveles de BPA maternos) estaría relacionada con un aumento en los niveles de agresividad e hiperactividad en niños de 2 años de edad, especialmente en las niñas (Braun y col., 2009). Este tipo de estudios prospectivos que correlacionan la exposición temprana al BPA con diversos resultados de salud en niños, así como marcadores tempranos o predictores de la enfermedad en la adultez, son fundamentales y altamente necesarios para comprender plenamente el impacto del BPA en la salud humana.

En cuanto al momento de intoxicación, al considerar los efectos de la exposición prenatal a BPA, es importante tener en cuenta que el hígado fetal y neonatal produce altos niveles de alfa fetoproteína (AFP), la principal proteína plasmática de unión a E₂ del roedor en desarrollo. Se piensa que la AFP protege los tejidos del roedor en desarrollo de la exposición excesiva al estradiol endógeno (Toran-Allerand 1984). En contraste con estradiol, el BPA muestra una unión limitada a las proteínas séricas (Milligan y col., 1998); de esta manera evadiría este mecanismo protector y tendría relativamente libre acceso a los tejidos sensibles a estrógenos del feto en desarrollo o el neonato. Por esta razón, las acciones de BPA durante el desarrollo tendrían un impacto mayor al esperado ya que estaría actuando sobre las vías estrogénicas en tejidos que normalmente no están expuestos a los estrógenos en ese momento. Esto es particularmente relevante para el cerebro. En roedores, la esteroidogénesis no comienza en el ovario hasta la segunda semana de vida, mientras que los machos tienen un aumento de testosterona (T), antes y después del nacimiento, y la T se puede convertir *in situ* en estradiol en presencia de la aromatasas. Esta conversión de T a estrógenos es un mecanismo importante para la diferenciación sexual del cerebro de machos en los roedores. Se ha observado que la exposición de ratones hembras preñadas, a muy bajos niveles de BPA (0.025 µg/kg de peso corporal/día y 0.25 µg/kg de peso corporal/día) causa la masculinización de una región del cerebro esencial para la liberación cíclica de gonadotrofinas en su descendencia femenina, junto con masculinización del comportamiento (Rubin y col., 2006).

I.3.1.1.C BPA y fertilidad femenina: múltiples acciones a distintos niveles podrían contribuir al deterioro de la capacidad reproductiva de las hembras expuestas a BPA

La exposición temprana a BPA afecta a diversos componentes de la reproducción femenina. Produce alteraciones en la regularidad del ciclo estral (Markey y col., 2003; Monje y col., 2010; Rubin y col., 2001) y también se ha demostrado que tiene efectos en el ovario en desarrollo (Hunt y col., 2003; Susiarjo y col., 2007). La exposición al BPA durante el desarrollo puede aumentar la expresión de ciertos receptores como el receptor de RE α y del receptor de progesterona (RP) (Markey y col., 2005) y modificar la sensibilidad a los estrógenos en el útero (Bromer y col., 2010; Varayoud y col., 2008b; Vigezzi y col., 2015).

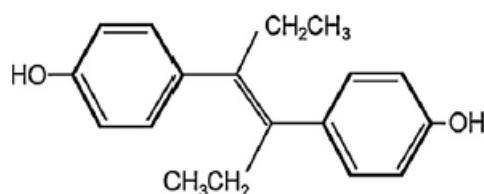
La exposición temprana al BPA también tiene efectos marcados sobre el desarrollo de la glándula mamaria (Munoz-de-Toro y col., 2005; Vandenberg y col., 2007), promoviendo la aparición de hiperplasias intraductales y lesiones mamarias precancerosas en roedores (Murray y col., 2007; Vandenberg y col., 2008). Los cambios observados en cada uno de estos niveles del eje reproductivo podrían contribuir a la alteración de la fertilidad observada en roedores hembras expuestas perinatalmente a BPA (Cabaton y col., 2011).

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la exposición de roedores a BPA altera el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, reduce el número de sitios de implantación (Ramos y col., 2003; Varayoud y col., 2011), modifica el patrón de diferenciación de la glándula mamaria y reduce el número de folículos primordiales en el ovario neonatal (Kass y col., 2012; Ramos y col., 2003; Rodriguez y col., 2010; Varayoud y col., 2011). En un animal de interés zootécnico como la oveja, hemos demostrado que el BPA actúa como un activador del reclutamiento inicial de folículos ováricos (Rivera y col., 2011). En una especie de la fauna silvestre como *Caiman latirostris* (yacaré overo), hemos detectado que el BPA, administrado en una única dosis en huevos de yacarés incubados a 33°C (temperatura que produce machos) revierte el sexo de los embriones y nacen hembras. En esta misma especie, también describimos alteraciones en las gónadas de hembras y machos tratados *in ovo* con dosis bajas de BPA (aquellas que no provocan reversión sexual) (Beldomenico y col., 2007; Stoker y col., 2008; Stoker y col., 2003).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, pensamos que muchos de los trabajos mencionados plantean serios interrogantes sobre la dosis de exposición al BPA considerada como segura. Si bien en otros países la misma ha sido revisada ((INFOSAN) 2009), la TDI referida por EPA y que es la que en nuestro país sigue adoptando, ha prevalecido sin cambios durante muchos años.

I.3.2 DES

Otro xenoestrógeno ampliamente difundido es el DES, un estrógeno sintético con una bioactividad mayor que el 17 β -estradiol (E2) (Figura I.6). El DES se utilizó ampliamente en la medicina humana y veterinaria, principalmente relacionado con las áreas de engorde (McLachlan y col., 1984).



Dietilestilbestrol (DES)

Figura I.6. Estructura química del DES (Modificado de Rubin y col., 2011).

La evidencia más clara de que la exposición a los estrógenos durante el desarrollo fetal puede afectar la salud reproductiva humana surgió del uso generalizado del potente estrógeno sintético DES. A partir de 1938, el DES fue inicialmente prescrito para prevenir abortos espontáneos, luego se lo administró a mujeres embarazadas para producir "bebés más fuertes" e incluso se administró a los recién nacidos para mejorar la ganancia de peso (Karnaky 1953; Kuchera 1971; Palmlund 1996). Se estima que el DES fue tomado por 4 a 6 millones (y posiblemente hasta 10 millones) de mujeres embarazadas en los EE.UU., antes de que fuera suspendido en 1971 (Giusti y col., 1995). El uso del DES con propósitos no medicinales también era común, por ejemplo se utilizó con frecuencia en los cosméticos, lociones, champú, y como promotor del crecimiento en pollos y ganado. Los implantes de DES en aves de corral fueron prohibidos en 1959, cuando se encontraron residuos de DES en el hígado de pollo. Sin embargo, esta medida no se aplicó al uso de DES en el ganado bovino, que se mantuvo hasta que fue finalmente eliminado en 1979. En la década de 1980, más del 80% del ganado de Estados Unidos había sido expuesto (Metzler 1981).

Desafortunadamente el DES fue ineficaz en la prevención de abortos involuntarios (Parkes y col., 1938), pero las consecuencias en la salud reproductiva de los hijos (tanto hombres como mujeres) fueron extensas. Una consecuencia de la exposición intrauterina a DES fue identificada por primera vez en 1971 por un grupo de médicos, que se percataron de que las niñas nacidas de madres que tomaron DES durante el embarazo eran más propensas a desarrollar un tipo muy raro de adenocarcinoma cervico-vaginal de células claras (CCAC) (Herbst y col., 1971). Estas niñas fueron referidas colectivamente como "hijas del DES". Actualmente se estima que una de cada 1.000 hijas del DES, han desarrollado CCAC a la edad de 34 años (Giusti y col., 1995; Rubin 2007), una tasa extraordinariamente alta para una variante tan poco frecuente de cáncer. El DES ha sido asociado también con un aumento en la incidencia de displasia

vaginal, adenosis vaginal y cervical y con las anomalías en el cuello del útero, la vagina y el útero. En las “hijas del DES” también se comprobó reducción de la fertilidad, un mayor riesgo de infertilidad y una mayor frecuencia de complicaciones en el embarazo. Las complicaciones detectadas incluyen embarazo ectópico, abortos espontáneos tardíos y parto prematuro (Palmlund 1996; Palmlund y col., 1993). Los daños causados por la exposición al DES no se limitó a las mujeres. Los “hijos del DES” también se vieron afectados y mostraron altas tasas de malformaciones urogenitales, testículos no descendidos, cáncer testicular, baja densidad de espermatozoides y menor movilidad de los espermatozoides (Gill y col., 1976; Palmer y col., 2006; Wilcox y col., 1995).

La mayoría de los resultados reproductivos tras la exposición del feto al DES fueron observadas también en modelos animales (Newbold 2008; Newbold y col., 1983). Por lo tanto, este desafortunado evento en la historia clínica humana pone de relieve tanto la vulnerabilidad del feto en desarrollo a los xenoestrógenos como la importancia de los modelos animales para predecir los posibles efectos adversos de las sustancias químicas a las que nos exponemos los seres humanos.

I.4. Ovario

Los ovarios tienen dos funciones interrelacionadas: la producción de un ovocito fertilizable apto para el desarrollo (gametogénesis), y la producción de hormonas esteroides requeridas para la preparación del tracto reproductivo para la fertilización y subsiguiente mantenimiento de la gestación (esteroidogénesis). Para poder realizar ambas funciones, una serie de eventos complejos debe tener lugar de manera sincronizada (Oktem y Oktay 2008; Ross 2005).

I.4.1 Formación de la reserva de folículos primordiales en el ovario de mamíferos

Las células germinales (CG) se originan en el endodermo del saco vitelino del embrión y migran, mediante movimientos ameboides, hacia la cresta genital entre el día 7 al 11 en roedores (Anderson y col., 2000), entre los días 17 a 21 en la oveja (Ledda y col., 2010), y alrededor de las 5 semanas de gestación en humanos (Grive y Freiman 2015). La cresta genital tiene una corteza y una médula. En la mayoría de las especies, el ovario maduro es principalmente de origen cortical y los cordones medulares se transforman en el tejido conectivo que da origen al hilio ovárico. En la corteza, se desarrolla un conjunto de cordones sexuales secundarios o corticales. Estos cordones

corticales se convierten en las células somáticas de ovario, las cuales se subdividen en grupos de células alrededor de las células germinales que llegan a la cresta genital (Suter 2005).

Las CG invaden la corteza del ovario en desarrollo e inician su proliferación mediante mitosis activa. En estas mitosis la citocinesis no se completa, por lo que las células germinales se convierten en grupos de ovogonias interconectadas llamados “nidos de células germinales”. Tras el cese de las divisiones mitóticas, las CG entran en meiosis en el día embrionario 13,5 en roedores (Pepling 2012; Tinggen y col., 2009), en la semana 11-12 de gestación en el ser humano (Cohen y Holloway 2010; Gondos y col., 1986), y en el día post coito 60 en ovejas (Monniaux y col., 2014; Scaramuzzi y col., 2011). Las CG que entraron en meiosis (CG diploides) se denominan ovocitos primarios.

Las células somáticas de los cordones sexuales secundarios rodean completamente cada ovocito individual con una sola capa de células, rompiendo los nidos de CG (*nest-breakdown*) y formando los folículos primordiales. Este proceso es denominado ensamblado folicular, y la supervivencia de un ovocito en el ovario fetal depende de su encapsulamiento por las células de la pre-granulosa y por el contacto con ellas. Los ovocitos que no forman folículos sufren atresia y degeneran. Algunos de los ovocitos que no completan el ensamblado permanecen agrupados y rodeados de una capa simple de células planas. Este es uno de los mecanismos propuestos para explicar el origen de los denominados folículos multiovulares o multiovocitarios (FMO) (Figura I.9.F).

En la oveja el proceso de ensamblado folicular ocurre a mediados de la gestación, mientras que en los roedores el ensamblado folicular se da durante la primera semana de vida posnatal (Fabre y col., 2006; Monniaux y col., 2014; Pepling 2006), y desde la semana de gestación 17-20 hasta el nacimiento en los seres humanos (Motta y col., 1997). Una vez que se forman los folículos primordiales, los ovocitos progresan a través de la meiosis I hasta la fase de diploteno de la profase I (Pepling 2012). En este punto se detiene la meiosis I, y de esta manera permanece en “arresto” hasta el momento de la ovulación del ovocito, semanas o décadas después de la pubertad según la especie. Por lo tanto, siempre y cuando se encuentren en el ovario, las células germinales son ovocitos primarios diploides (Figura I.7) (Cohen y Holloway 2010; Suter 2005).

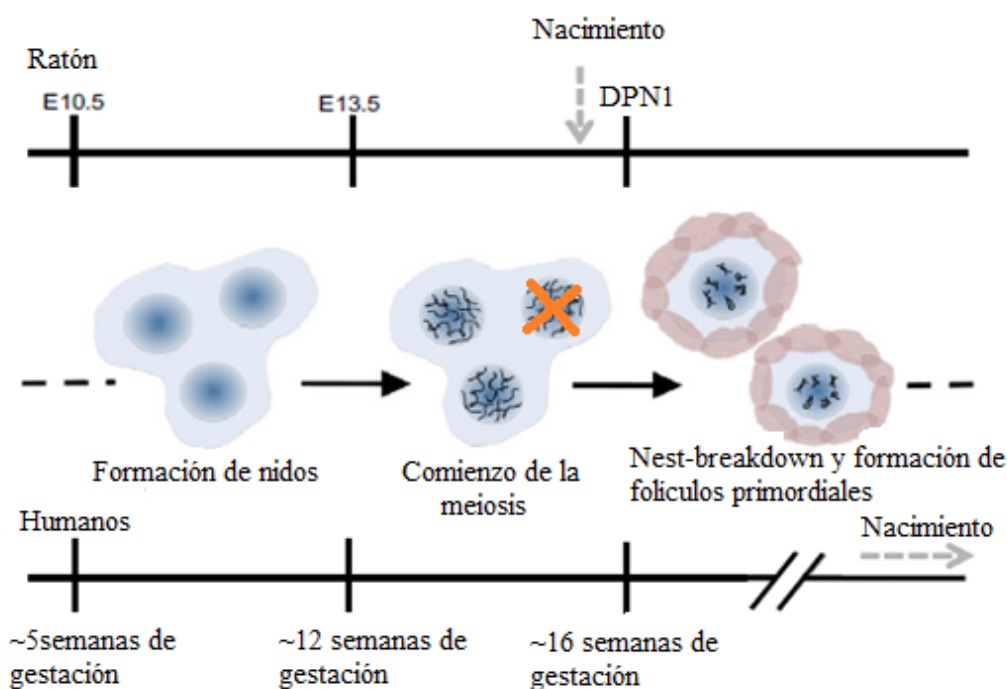


Figura I.7. Líneas de tiempo representativas de la formación de nidos de células germinales, el inicio de la meiosis y la formación del folículo primordial en ratones y seres humanos. Las células germinales colonizan la gónada alrededor del día embrionario 10.5 (E10.5) en ratones y ~ 5 semanas de gestación en el ser humano. Estas células realizan divisiones mitóticas con citocinesis incompleta, quedando interconectadas y formando nidos. Luego cesa la mitosis y entran en la meiosis I alrededor de E13.5 en ratones y entre 10-12 semanas de gestación en seres humanos. Por último, se da la ruptura de estos nidos a través de la migración e invasión al interior del nido de las células somáticas, rodeando ovocitos de manera individual y dando origen al folículo primordial. Las células germinales que no son ensambladas en folículos son eliminadas mediante muerte celular por apoptosis. La formación de folículos primordiales tiene lugar en el momento del nacimiento en ratones, mientras que en los seres humanos comienza a mediados de la gestación (alrededor de la semana 16). Abreviaturas: E, día embrionario; DPN, día post natal (Modificado de Grieve y Freiman, 2015).

Los folículos primordiales representan toda la reserva de gametos que una hembra posee para su vida reproductiva. La comunicación bidireccional y el intercambio de moléculas de señalización entre ovocitos y las células de la granulosa que los rodean son necesarios tanto para el crecimiento del ovocito como para el desarrollo del folículo después del nacimiento (Oktem y Oktay 2008; Skinner 2005). De esta manera, la adecuada regulación del ensamblaje del folículo primordial durante los periodos fetal y/o neonatal según la especie, condiciona claramente la capacidad reproductiva a largo plazo de las hembras.

I.4.2 Foliculogénesis

La foliculogénesis es el proceso que abarca desde la formación del folículo primordial, su reclutamiento dentro del pool de folículos en crecimiento como folículo primario y posterior progresión por diferentes etapas de crecimiento y desarrollo correspondiente a los estadios preantral, antral y preovulatorio, hasta que se produce la ovulación o entran en atresia (Oktem y Oktay 2008).

I.4.2.1 Activación folicular y reclutamiento inicial

Una vez formados, los folículos primordiales quedan quiescentes hasta su transición a folículo primario. Se considera que los folículos primordiales conforman una estructura que, una vez establecida, no se multiplica, por lo que esta población folicular representaría el potencial reproductivo de la hembra en los mamíferos (Fortune 2003; Skinner 2005).

La transición de folículo primordial a primario es el primer paso por el cual los folículos primordiales latentes son reclutados al pool de *folículos en crecimiento*. Este *reclutamiento inicial* es un proceso continuo e irreversible, ya que un folículo que es reclutado es activado para salir de la etapa de quiescencia y continúa creciendo hasta su destrucción por atresia o hasta su ovulación (Kezele y Skinner 2003; McGee y Hsueh 2000; Skinner 2005). La activación folicular está caracterizada por un rápido crecimiento del ovocito y la proliferación de las células de la pre-granulosa aplanadas a células cúbicas de la granulosa (Wassarman 1994). Esta fase incluye el crecimiento de algunos folículos primordiales mientras que otros permanecen quiescentes por meses, años o décadas dependiendo de la especie (Hirshfield 1991). De esta forma, los folículos primordiales que inicialmente se mantienen quiescentes son gradualmente reclutados a lo largo de la vida reproductiva de la hembra (Figura I.8).

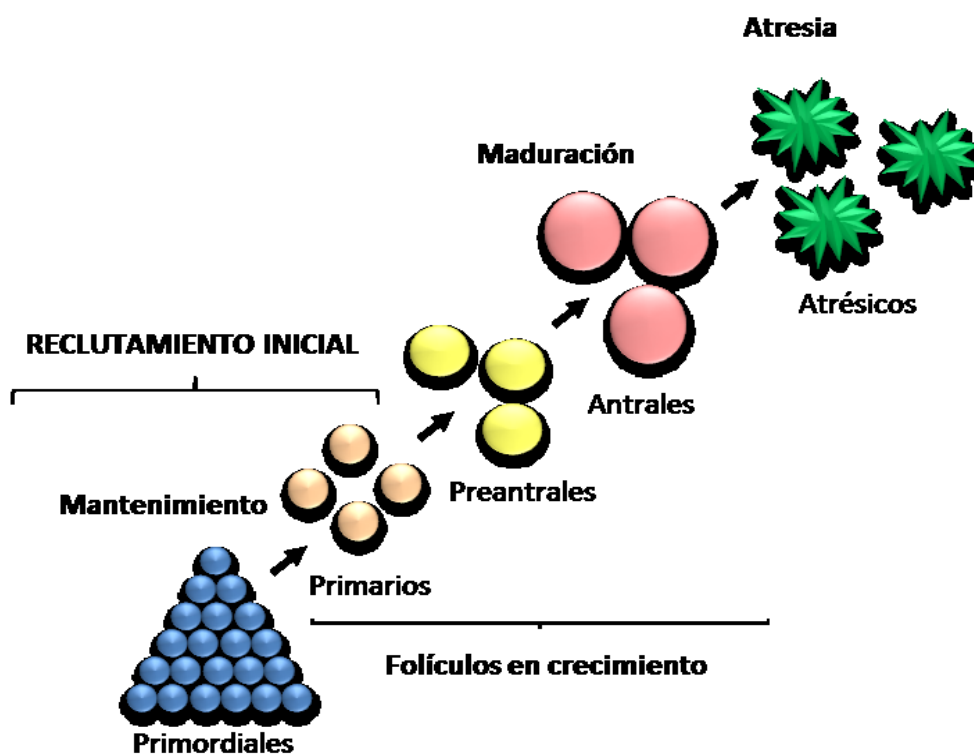


Figura I.8. Reclutamiento inicial. Un número fijo de folículos primordiales son ensamblados durante la vida temprana, y la mayoría de ellos se mantienen en estado de reposo. La activación de algunos de estos folículos inactivos marca el ingreso de los mismos al pool de folículos en crecimiento (reclutamiento inicial). Los folículos se desarrollan hasta la adquisición de una cavidad antral. En la etapa de folículo antral la mayoría experimentan atresia folicular, excepto que sean rescatados (ver más adelante). Este proceso de reclutamiento inicial ocurre desde el momento en que la reserva de folículos primordiales está formada y continúa a lo largo de la vida reproductiva (Modificado de Mc Gee y Hsueh 2000).

Después del reclutamiento inicial, las células de la granulosa proliferan en más de dos capas, adquieren características diferenciales de células epiteliales, el ovocito continúa creciendo, se forma la zona pelúcida y las células estromales son reclutadas para formar la capa de la teca alrededor del folículo preantral (Figura I.9).

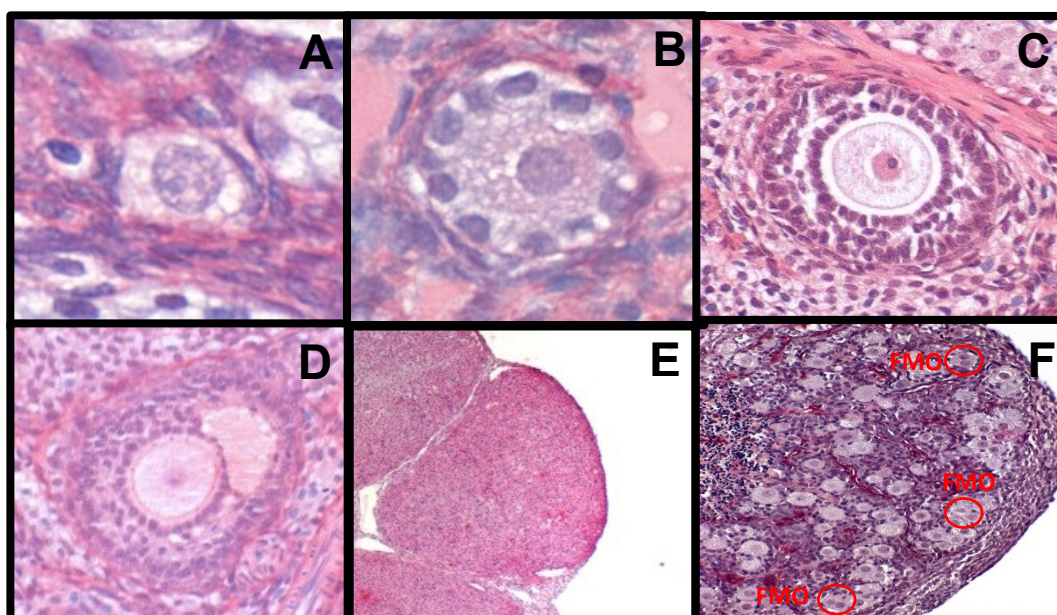


Figura I.9. Estadios foliculares. Los folículos primordiales se caracterizan por un ovocito encapsulado por células escamosas de la pre-granulosa aplanadas (A). Cuando el folículo primordial es activado e inicia la foliculogénesis, se observan algunas células de la granulosa que cambian de morfología aplanada o escamosa a cúbicas. Los folículos primarios se identifican por una capa completa de células cúbicas de la granulosa rodeando el ovocito (B). Los folículos preantrales, contienen de dos o más capas completas de células cúbicas de la granulosa (C); y los folículos antrales, más de cinco capas de células de la granulosa y una cavidad antral completamente formada (D). El Cuerpo Lúteo es formado luego de la expulsión del ovocito y de la diferenciación de las células de la granulosa remanente en células luteínicas (E). F: Folículos multiovocitarios (FMO). Tinción Picrosirius- Hematoxilina. Magnificación: A y B, 60X; C y D, 40X; E, 10X; F, 20X.

En general, el progreso de los folículos desde el estadio primario hasta preantral es operacional hasta la menopausia, y se considera que es independiente de gonadotrofinas, porque se da en animales y humanos en ausencia de la hormona folículo estimulante (FSH) o de sus receptores (Barnes y col., 2002; Dierich y col., 1998). Sin embargo, hay estudios en roedores que sugieren que el desarrollo folicular temprano puede ser influenciado por gonadotrofinas. Los folículos preantrales expresan receptores para FSH y algunos experimentos demuestran que FSH puede inducir el desarrollo folicular en estos estadios in vivo (Oktay y col., 1997; Oktem y Oktay 2008). De esta manera, en cuanto a su desarrollo, se pueden dividir las poblaciones foliculares en aquellas que son sensibles a gonadotrofinas y aquellas que son dependientes de las mismas (Figura I.10).

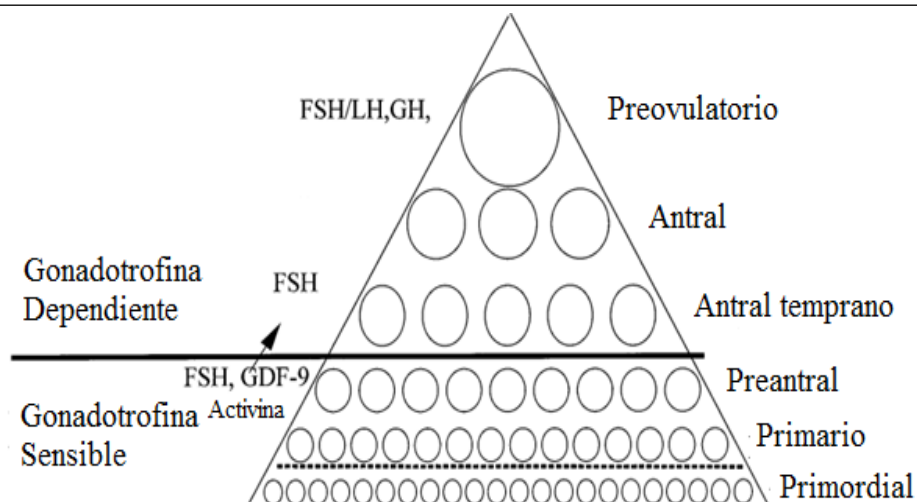


Figura I.10. Pirámide folicular: factores hormonales específicos de cada etapa están involucrados en la supervivencia y el desarrollo de los folículos. Estudios en roedores indican que el desarrollo de los folículos primordiales y primarios hasta el estadio preovulatorio requiere diferentes factores estimulantes y de supervivencia que dependen de cada etapa. Aunque los mecanismos exactos para el reclutamiento inicial a partir de la reserva de folículos primordiales inactivos aún no están claros, se ha demostrado que la FSH, la activina, y el factor de diferenciación del crecimiento 9 (Growth differentiation factor 9: GDF-9) estimulan el crecimiento y la diferenciación de los folículos primarios y/o secundarios. La FSH es el principal factor de supervivencia para rescatar folículos antrales tempranos de la apoptosis durante el reclutamiento cíclico. Una vez que los folículos antrales alcanzan un mayor tamaño, se producen múltiples factores intrafoliculares a nivel local para asegurar la maduración y una ovulación exitosa. Aunque se sabe que el crecimiento de los folículos antrales y preovulatorios es dependiente de la estimulación adecuada de gonadotropina, estudios recientes *in vitro* e *in vivo* indican que el crecimiento de los folículos preantrales también podría ser influenciado por gonadotropinas endógenas y exógenas. Por lo tanto, el desarrollo de los folículos se puede dividir en etapas de gonadotropina-dependiente y gonadotropina-sensible. Durante el tratamiento con gonadotropinas exógenas, es probable que tanto los folículos antrales grandes como los folículos preantrales más pequeños sean estimulados para crecer (Modificado de McGee y col., 2000). FSH: Hormona folículo estimulante. LH: Hormona luteinizante. GH: Hormona de crecimiento.

I.4.2.2 Reclutamiento cíclico y ovulación

La progresión del estadio preantral a antral está caracterizado por la proliferación continuada de las células de granulosa y de la teca, una vasculatura incrementada, crecimiento del ovocito, y la aparición de un espacio ocupado por un líquido

coalescente, formando el antro o cavidad antral (Oktem y Oktay 2008). El líquido folicular es una fuente importante de sustancias reguladoras y moduladoras (esteroides, factores de crecimiento, enzimas, lipoproteínas) que se originan a partir de la sangre y de las secreciones de las células foliculares. Los folículos antrales miden 0,2-0,4 mm de diámetro en ratas, 2-5 mm en humanos y ovejas, y tienen un antro bien desarrollado (Driancourt 2001; Scaramuzzi y col., 2011; Shikone y col., 1997; Yuan y Giudice 1997). Si bien los folículos en estado preantral pueden responder a FSH, es en el estadio antral que la FSH se vuelve un factor determinante crítico para el posterior crecimiento y supervivencia del folículo.

La pubertad es un estado de transición que comprende cambios fisiológicos, morfológicos y conductuales, los cuales conducirán a la formación de un adulto potencialmente fértil. En el ser humano ocurre entre los 12 y 14 años de edad, entre los 6 y 7 meses en la oveja y entre los 30-35 días en roedores. Esta etapa es impulsada por un cambio primario en la liberación hipotalámica de GnRH (hormona liberadora de gonadotrofinas) y la secreción pulsátil de LH y FSH. El inicio de la pubertad es activado por mecanismos hipotalámicos los cuales liberan pulsos de GnRH a la hipófisis anterior. Una vez que esto ocurre la hipófisis y el ovario son capaces de responder instantáneamente y mantener las interacciones de feedback positivos y negativos mediadas por los esteroides sexuales con los mecanismos secretores de gonadotrofinas y GnRH (Johnson 2007). De esta manera, después de la pubertad, la estimulación cíclica por parte de las gonadotrofinas rescata a los folículos antrales de la atresia, permitiendo la supervivencia y el crecimiento continuo de un limitado número de folículos antrales que alcanzarán el estado preovulatorio. A diferencia del inicial, a éste se lo denomina *reclutamiento cíclico* (Figura I.11).

La FSH y LH son factores tróficos para la proliferación y supervivencia de las células somáticas y para el reclutamiento cíclico de los folículos antrales. Como vimos, el reclutamiento cíclico comienza después de la pubertad y es el resultado del incremento de FSH circulante durante cada ciclo reproductivo que rescata una cohorte de folículos antrales de la atresia.

Durante el reclutamiento cíclico, solo un número limitado de folículos antrales sobreviven y los demás mueren debido a atresia folicular. Al reclutamiento cíclico le sigue la selección del folículo o folículos dominante(s): uno (o algunos) de los folículos

seleccionados crece más rápido que los demás y produce altos niveles de estrógenos e inhibina. Este folículo sería más sensible a FSH (Fauser y Van Heusden 1997) por una mayor expresión de receptores de FSH y/o LH o por un incremento local de factores de crecimiento que aumentan su respuesta a FSH (Bao y col., 1997; Evans y Fortune 1997; Xu y col., 1995). Los estrógenos y la inhibina suprimen la liberación de FSH hipofisaria y como resultado los folículos antrales remanentes son desprovistos de la estimulación requerida para la supervivencia (diZerega y Hodgen 1981). Adicionalmente este rápido crecimiento del folículo está acompañado de la producción de altos niveles de factores de crecimientos paracrinos o autocrinos constituyendo un mecanismo local de selección positiva. Los altos niveles de estrógenos incrementan notoriamente la liberación de LH hipofisaria por un mecanismo de retroalimentación positivo, produciendo un pico de secreción de LH que conduce a la ovulación de los folículos seleccionados.

De esta manera, en el transcurso de la vida reproductiva, la activación folicular y posterior foliculogénesis a través de los distintos estadios de desarrollo folicular lleva a la disminución gradual del pool inicial de folículos primordiales. La disminución de la reserva folicular sería parte del reloj biológico que determina el momento del comienzo de la menopausia (Fortune 2003; McGee y Hsueh 2000).

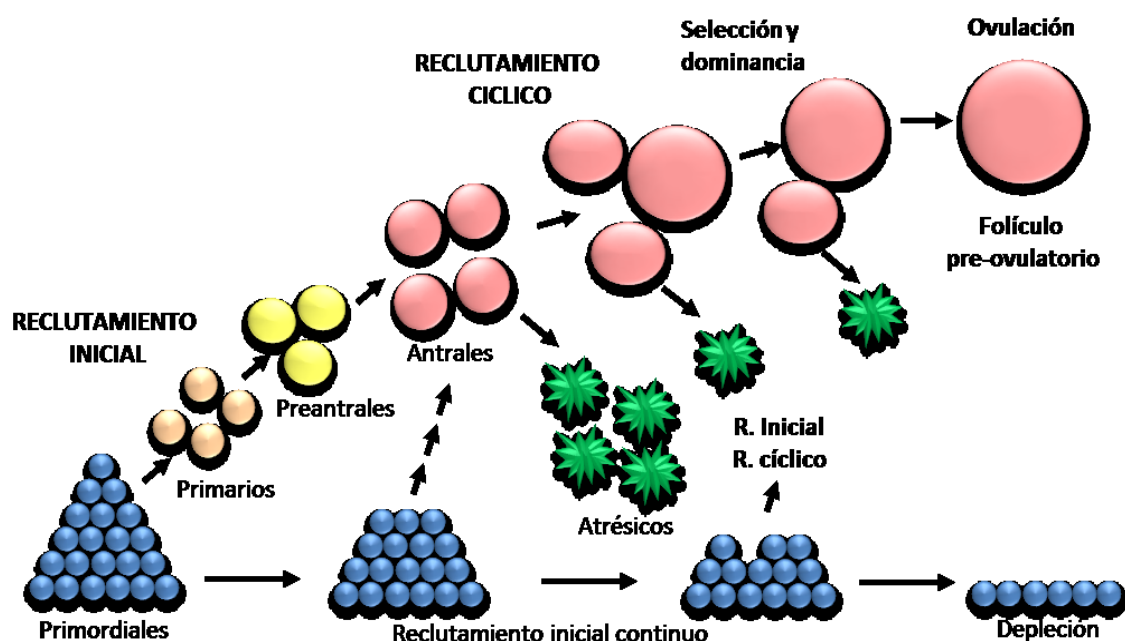


Figura I.11. Reclutamiento cíclico. Bajo una óptima estimulación gonadotrófica, que sucede a partir de la pubertad, algunos de los folículos antrales son rescatados para llegar a la fase pre-ovulatoria (reclutamiento cíclico). Según la especie, la sucesión de ciclos conduce finalmente al

agotamiento de la reserva de folículos en reposo, determinando el agotamiento folicular y la senescencia ovárica. (Modificado de McGee y col., 2000).

Las diferencias entre reclutamiento inicial y cíclico se pueden resumir en una serie de características, que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla I.2. Diferencias entre reclutamiento inicial y reclutamiento cíclico de los folículos ováricos.

	Reclutamiento inicial (iniciación del crecimiento)	Reclutamiento cíclico (escape de la atresia)
Estadio	Primordial	Antral (humanos: 2-5 mm de diámetro, roedores: 0,2-0,4 mm de diámetro)
Hormonas involucradas	No determinado	FSH
Ruta por defecto	Permanece latente	Apoptosis
Sincronización	Continua durante toda la vida, comienza luego de la formación del folículo	Cíclico (humanos: 28 días, roedores: 4-5 días), comienza a partir de la pubertad

Luego de cada ovulación, el folículo remanente se convierte en una nueva estructura conocida como cuerpo lúteo (CL). En el antro folicular remanente luego de la expulsión del ovocito, se produce la ruptura de la membrana basal entre las células de la granulosa y la teca y los vasos sanguíneos invaden el folículo. Ambas células, las de la granulosa y de la teca interna, contribuyen a la formación del CL (ver figura I.9). Las células de la granulosa cesan su proliferación y se hipertrofian para formar células lúteas grandes, esta transformación es referida como *luteinización* y se asocia a un constante aumento de la secreción de progesterona (P4). Las células de la teca forman células lúteas pequeñas, producen progesterona y andrógenos y son ricas en receptores de LH (Johnson 2007).

Por último, un concepto muy importante a tener en cuenta es que el momento en que ocurren los procesos de iniciación de la meiosis y formación de folículos primordiales, y de foliculogénesis, varía entre las especies. En la figura I.12 se muestra un esquema temporal que ubica estos procesos para distintas especies de mamíferos.

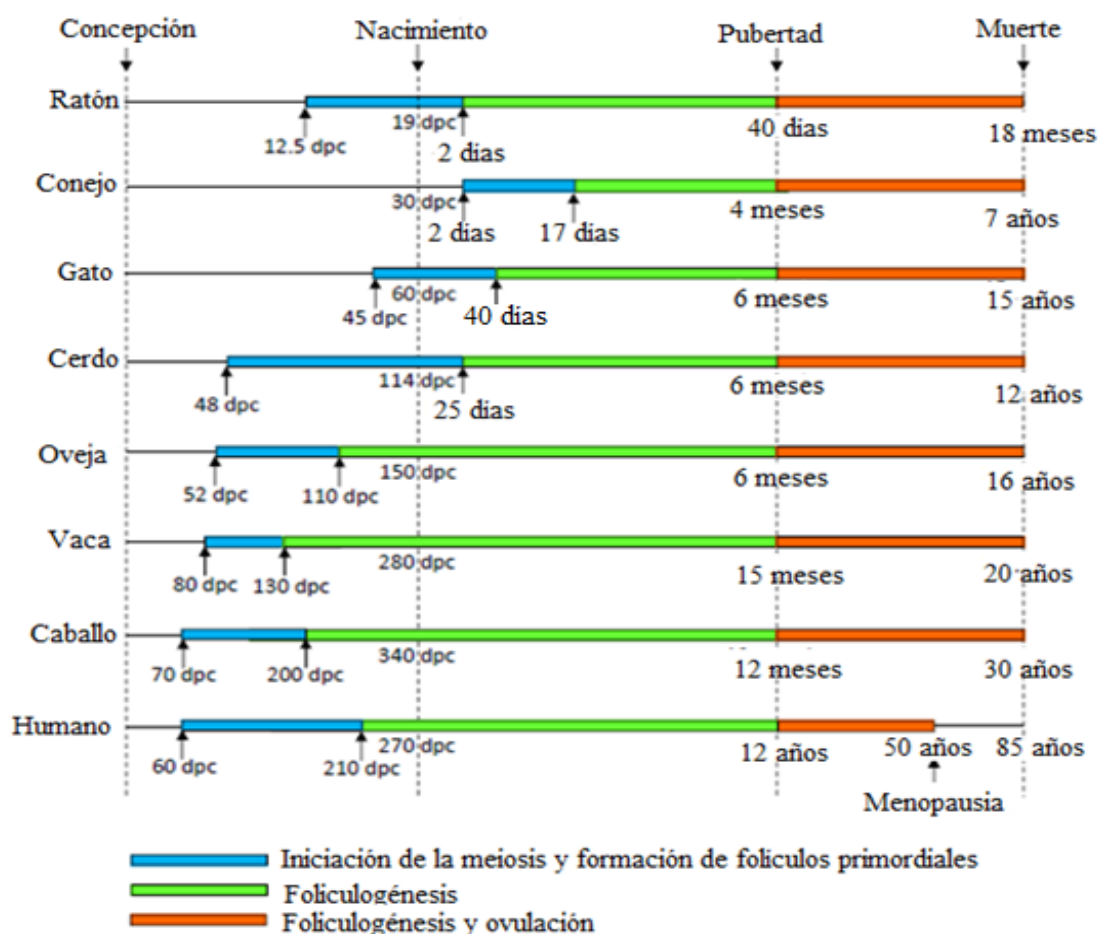


Figura I.12. Comparación de la secuencia temporal de la ovogénesis y foliculogénesis en la vida de diferentes mamíferos. Para cada especie, las fases de desarrollo correspondiente a (1)

la iniciación de la meiosis y la formación de la reserva de folículos primordiales, (2) la foliculogénesis antes de la pubertad, y (3) la foliculogénesis y ovulación después de la pubertad, se asignan como barras de color azul, verde y naranja, respectivamente. Antes del nacimiento, las edades se indican como día posterior a la concepción (dpc). Después del nacimiento, las edades se indican como días, meses o años. El límite entre las barras azules y verdes corresponde a la etapa en la que se han formado la mayoría de los folículos primordiales. El límite entre las barras verdes y naranja corresponde a la primera ocurrencia del desarrollo folicular completo culminando en la ovulación. En la mayoría de las especies, se forma la reserva de folículos primordiales antes del nacimiento o en los primeros días posterior al parto, sin embargo la meiosis se inicia sólo después del nacimiento en el conejo (Modificado de

Monniaux y col., 2014).

I.4.3 Hormonas esteroides y sus receptores

Los esteroides sexuales cumplen un rol esencial en el crecimiento y diferenciación de los tejidos reproductivos y en el mantenimiento de la fertilidad. La producción *de novo* de colesterol, progestágenos, andrógenos y estrógenos es realizada por el ovario. El modelo conocido como “dos células-dos gonadotrofinas” describe la producción ovárica de esteroides como un proceso conjunto entre las células de la teca y de la granulosa, destacándose este aspecto “colaborativo” entre los dos tipos celulares para la producción de estrógenos (Figura I.13).

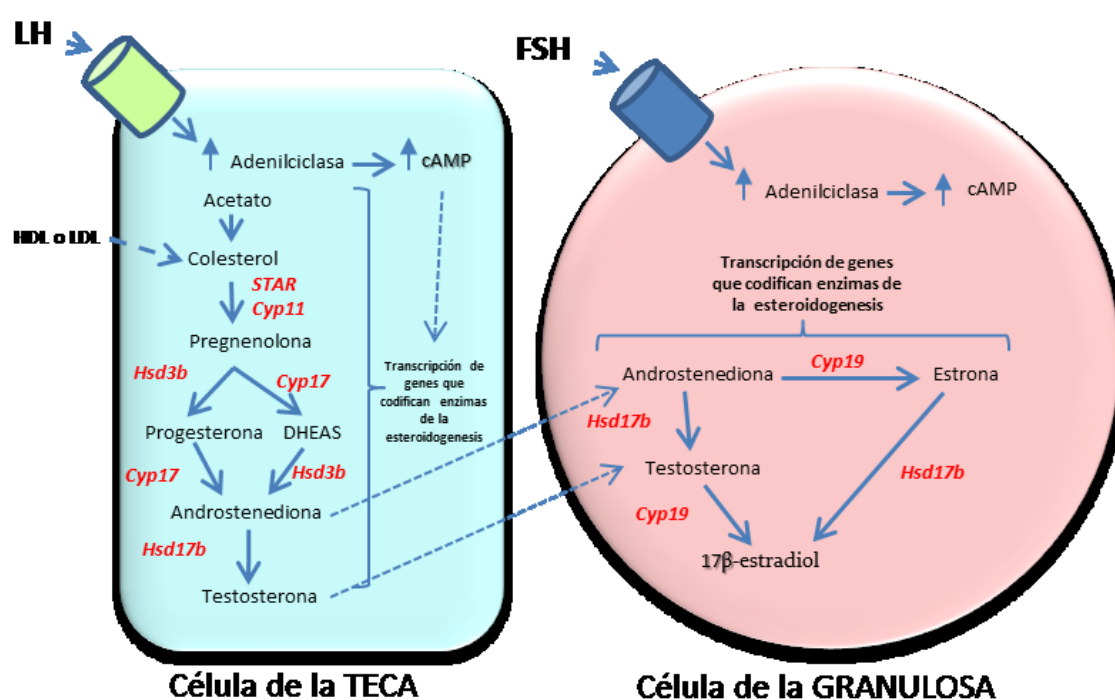


Figura I.13. Esteroidogénesis ovárica: modelo de “dos células- dos gonadotrofinas”. Las células de la teca responden al estímulo de la LH incrementando la expresión de las enzimas necesarias para la conversión de colesterol en androstenediona y testosterona. Las células de la granulosa responden al estímulo de la FSH aumentando la expresión de las enzimas necesarias para la conversión de la androstenediona y la testosterona derivadas de la teca en los estrógenos estradiol y estrona. Referencias: HDL, Lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; Cyp11, citocromo P450 11 o cholesterol side-chain cleavage; Hsd3b, 3b-hidroxiesteroide dehidrogenasa; Cyp17, citocromo P450 17 o 17a-hidroxilasa, 17,20-desmolasa; Hsd17b, 17b-hidroxiesteroide dehidrogenasa; Cyp19, citocromo P450 19 o aromatasa (Modificado de Craig y col., 2011).

I.4.3.1 Andrógenos

Los andrógenos androstenediona y testosterona son producidos por las células de la teca en respuesta a LH (Figura I.13). Los andrógenos actúan a través de sus receptores (RA) localizados en las células de la granulosa, del estroma (Hillier y Tetsuka 1997), de la teca en humanos (Horie y col., 1992), y ovocitos de rata, ratón y cerdo (Gill y col., 2004; Szoltys y Slomczynska 2000). Los andrógenos actúan principalmente sobre las células de la granulosa donde inician distintos procesos dependiendo del estadio de desarrollo del folículo y de la especie (Prizant y col., 2014).

La expresión de RA es mayor en las células de la granulosa de folículos antrales y preantrales de los ovarios de primates (Hillier y Tetsuka 1997); folículos antrales y preantrales pequeños de ratas (Tetsuka y col., 1995); folículos antrales pequeños de cerdos (Slomczynska y Tabarowski 2001; Szoltys y Slomczynska 2000); preantrales y antrales tempranos de ovarios bovinos (Hampton y col., 2004), y los folículos secundarios y dominantes de ovarios humanos (Horie y col., 1992). La expresión del RA puede estar influenciada por factores secretados por el ovocito. Tetsuka y sus colegas describieron un gradiente de inmunotinción de RA en los folículos antrales grandes del ovario de rata, con células del cúmulo y células de la granulosa que expresan fuertemente la proteína del RA y las capas periféricas que expresan menos RA (Tetsuka y col., 1995).

En las primeras etapas de la foliculogénesis, los andrógenos parecen promover el crecimiento folicular. Durante las últimas etapas del desarrollo folicular, el RA disminuye en la mayoría de los mamíferos, y los andrógenos son metabolizados en lugar de ejercer efectos directos sobre la foliculogénesis (Hillier y Tetsuka 1997). En la actualidad está ampliamente aceptado que los andrógenos afectan principalmente a los folículos pre-antrales, y que sus actividades son importantes para el crecimiento del folículo pre-antral y la prevención de la atresia folicular (Prizant y col., 2014). Aunque aún falta evidencia sustancial, también se ha sugerido que los andrógenos estimularían la activación de los folículos primordiales (Figura I.14). Sin embargo, sólo unos pocos estudios han sugerido hasta ahora este concepto (Abbott y col., 2005; Smith y col., 2009), y en los modelos globales de ratones knockout para RA, y knockout específicamente para RA en las células de la granulosa, el número de folículos primordiales es normal. Si el efecto sobre el reclutamiento inicial de los folículos

primordiales se trata de una respuesta primaria o secundaria a los andrógenos, sigue siendo una pregunta abierta que necesita mayor investigación (Prizant y col., 2014) (Figura I.14).

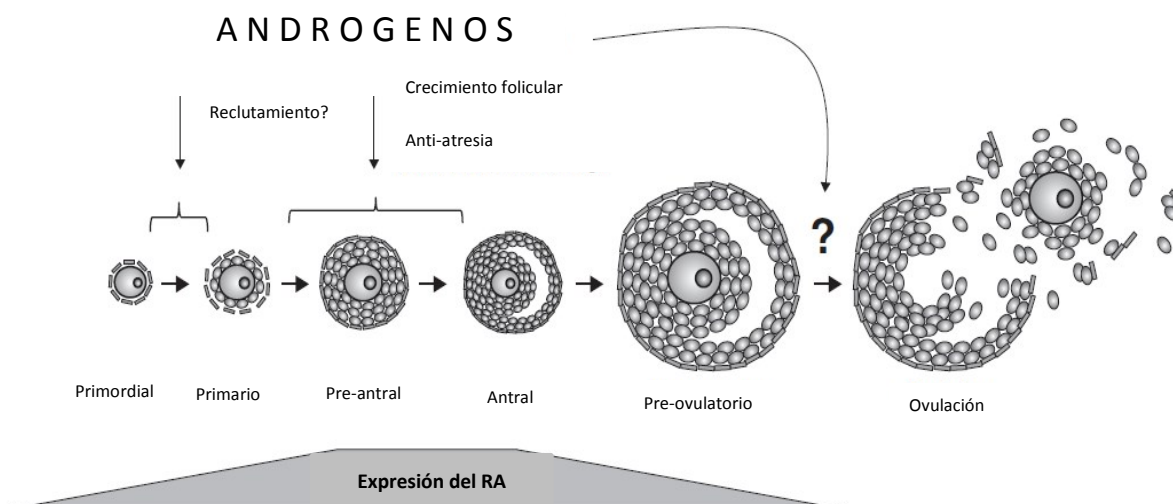


Figura I.14. Acciones fisiológicas de los andrógenos en el desarrollo folicular. Los andrógenos a través de los RA regulan directamente el crecimiento del folículo pre-antral, previenen la atresia folicular, y están involucrados en la formación de folículos antrales. También se han propuesto que los A desempeñan un papel en el reclutamiento del folículo primordial, así como en la ovulación. Sin embargo, se necesitan más estudios para establecer estas acciones propuestas de los andrógenos (Modificado de Prizant y col., 2014).

Además de los efectos sobre el crecimiento, se ha demostrado que los andrógenos influyen sobre la diferenciación de células de la granulosa mediada por FSH, evidenciado por un aumento en la producción de progesterona y estradiol en respuesta a FSH en presencia de andrógenos (Hillier y De Zwart 1981; Hillier y Tetsuka 1997). Por último, uno de los roles más importantes de los A en el ovario es la síntesis de estrógenos sirviendo como sustrato de la P450 aromatasa, (Dorrington y col., 1975; Hillier y Tetsuka 1997).

I.4.3.2 Estrógenos

El crecimiento del folículo más allá del estadio de antral pequeño está caracterizado por un incremento de la actividad aromatasa y la síntesis de andrógenos, que culmina con la

producción folicular de estrógenos. Es el folículo pre-ovulatorio el que tiene el nivel intrafolicular más alto de estrógenos, principalmente debido al tamaño de su población de células de la granulosa y de su capacidad para la aromatización de andrógenos (Hillier y De Zwart 1981).

Los estrógenos actúan a través de sus receptores de los cuales existen dos tipos, el RE α y RE β , (Green y col., 1986; Petersen y col., 1998), siendo el RE β la forma predominante en el ovario (Byers y col., 1997; Drummond y col., 1999). Durante el desarrollo postnatal, la expresión del ARNm del RE β incrementa con la proliferación de las células de la granulosa en el ovario de rata. En los últimos años se han identificado los principales roles de cada uno de estos receptores en la reproducción de la hembra: el RE α tendría un rol en el mecanismo de la ovulación, mientras que el RE β estimula el crecimiento folicular, disminuye la atresia y aumenta el número de ovocitos liberados luego de una ovulación inducida (Hegele-Hartung y col., 2004). Los estrógenos también son responsables de facilitar la diferenciación de células de la granulosa, incluyendo la inducción de sistemas de receptores de FSH, LH y prolactina e influir en los mecanismos post-receptor. En conjunción con LH y FSH, los estrógenos estimulan la acumulación de AMPc (Richards y Kersey 1979) y aumenta el número de sitios de unión de AMPc en las células de la granulosa (Richards y Rolfes 1980).

I.4.3.3 Progesterona

En el tracto reproductivo femenino, la progesterona (P4) juega un papel clave en la ovulación, la implantación y el mantenimiento del embarazo (Graham y Clarke 1997). Los receptores de progesterona (RP) comprenden dos formas RP-A y RP-B (Kastner y col., 1990; Spelsberg y col., 1972), si bien provienen de un solo gen. La proteína del RP ha sido localizada por inmunohistoquímica (IHQ) en las células de la teca de folículos antrales pequeños y en las células de la granulosa de los folículos pre-ovulatorios previamente expuestos a LH/hCG en ovarios de primates y conejos (Hild-Petito y col., 1988; Iwai y col., 1991).

En la ovulación, el folículo se rompe expulsando el ovocito. A partir de entonces, el folículo realiza un proceso de remodelación para formar el CL, que secreta P4. Resultados obtenidos en trabajos con ratones *knockout* para el RP (PRKO) demuestran que la expresión del RP inducida por LH es esencial para la ovulación y la luteinización

(Lydon y col., 1995), considerándose de esta manera que el proceso de ovulación es dependiente de la P4.

En la figura I.15 podemos observar la localización de los receptores esteroides y de gonadotrofinas en las distintas poblaciones foliculares.

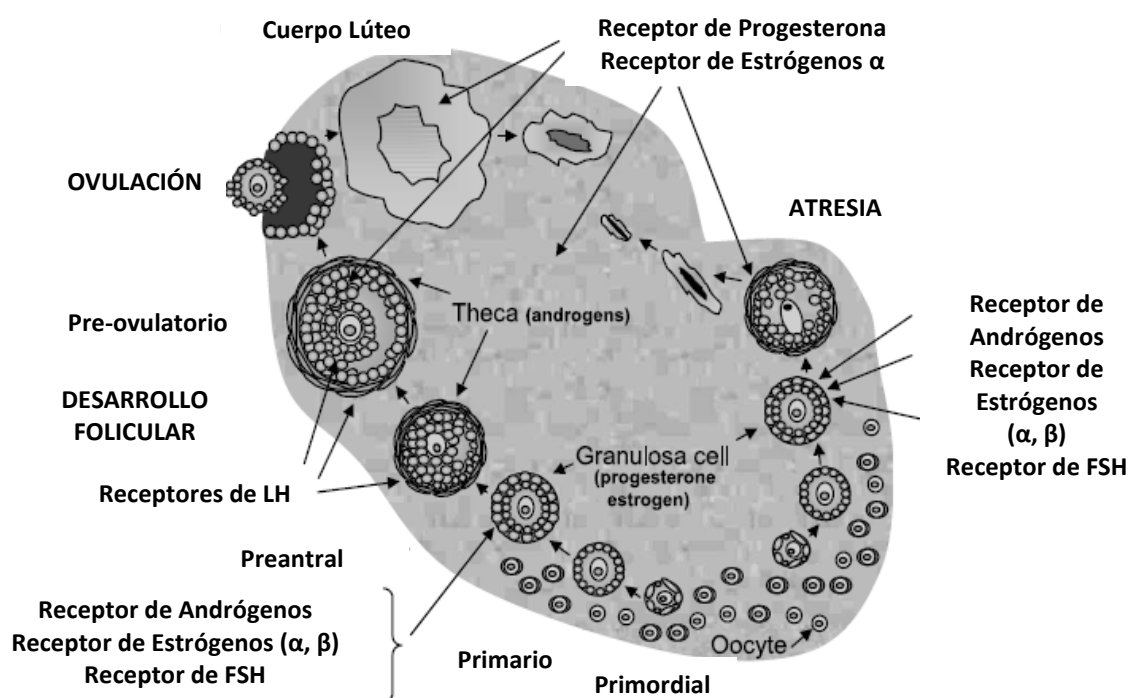


Figura I.15. Representación esquemática simplificada del ovario indicando los sitios de los receptores de hormonas esteroides, los sitios celulares de la producción de hormonas esteroides y las estructuras foliculares pertinentes, que surgen durante el desarrollo y la atresia (Modificado de Drummond AE y col, 2002).

Las hormonas esteroides, a través de los receptores de ligando específico, desempeñan importantes funciones reguladoras en el ovario. El impacto de estas hormonas en la función ovárica está determinada por la disponibilidad de ligando, la expresión del receptor y de la represión o la inducción de genes reguladores pertinentes. En última instancia, son las necesidades de las poblaciones foliculares individuales las que determinan los roles que juegan los esteroides. Es evidente que cada esteroide juega un papel de importancia para la fertilidad. En su ausencia, o en casos de exceso, la función ovárica y, posteriormente, la fertilidad, se ve comprometida (Drummond 2006).

I.5. Ovario y xenoestrógenos

Como mencionáramos anteriormente, el ovario es responsable de la producción de gametos (gametogénesis) y de hormonas esteroideas sexuales (esteroidogénesis) (Hirshfield 1991). Diversos trabajos demuestran que estos dos procesos son sensibles a la acción de los xenoestrógenos.

Una de las modificaciones más frecuentes producidas por los PE es la de interferir en la regularidad del ciclo estral, con ciclos irregulares y finalización prematura de la actividad cíclica (Jefferson y col., 2006; Rubin 2011; Rubin y col., 2006; Suzuki y col., 2002). Estos efectos probablemente sean causados por la alteración de los procesos de ovulación y luteinización regulados por LH (Crain y col., 2008; Rubin y col., 2006). También se ha demostrado que la exposición prenatal a BPA incrementa el peso relativo de los ovarios (Darmani y Al-Hiyasat 2004) y afecta la calidad genética de los ovocitos (Hunt y col., 2003; Richter y col., 2007; Susiarjo y col., 2007). En nuestro grupo, utilizando un modelo de exposición postnatal temprano, previamente demostramos que la exposición a BPA produce una disminución en la reserva de folículos primordiales mediante el incremento de la activación folicular (pasaje de folículo primordial a primario) en ovarios de ratas de 8 días de vida (Rodríguez y col., 2010). Interesantemente, se ha demostrado la asociación del origen de ciertas patologías como la falla ovárica prematura (FOP) y el síndrome de ovario poliquístico (SOP) a alteraciones en la formación de folículos primordiales y su posterior activación (Franks y col., 2008). Esta capacidad de BPA de afectar procesos ováricos no sólo es evidente en mamíferos. En nuestro grupo también hemos demostrado que la exposición *in ovo* a BPA aumenta la incidencia de folículos tipo III y FMO y afecta los niveles séricos de E2 y T en especímenes de *Caiman latirostris* en edad neonatal y/o juvenil (Stoker y col., 2008).

Nuestra hipótesis general de trabajo postula que la exposición a químicos clasificados como xenoestrógenos/estrógenos ambientales en períodos hormono-sensibles del desarrollo prenatal y postnatal temprano induce alteraciones en procesos críticos relacionados con el desarrollo normal de las gónadas y el tracto reproductor femenino, impactando negativamente en la capacidad reproductiva en la vida adulta.

Si bien hay muchos trabajos que demuestran efectos del BPA sobre el desarrollo ovárico, hay aspectos que han sido poco estudiados y que han sido señalados como importantes en el estudio de la perturbación endocrina en relación a la funcionalidad del ovario (Doerge y col., 2010a; Peretz y col., 2014). Fundamentalmente en lo que refieren a la necesidad de:

- estudiar los efectos que una exposición en etapas tempranas de la vida podría tener posteriormente en la vida adulta,
- evaluar la exposición durante un período perinatal, que refleje la exposición durante la etapa fetal y durante la etapa postnatal durante la lactancia,
- investigar la exposición a bajas dosis por vía oral a través de la dieta,
- diferenciar entre los efectos directos sobre el ovario de aquellos considerados indirectos, a través de modificaciones de la secreción de gonadotrofinas por ejemplo.

Por lo tanto, los objetivos y experimentos que vamos a describir pretenden contestar, al menos en parte, estos interrogantes.

II- CAPÍTULO 1

DISFUNCIONES OVÁRICAS EN RATAS ADULTAS NACIDAS DE MADRES TRATADAS CON BAJAS DOSIS DE BPA POR VÍA ORAL

*Si quieres entender a una persona no escuches sus palabras,
observa su comportamiento*
Albert Einstein

1.1 INTRODUCCIÓN

En parte, la fertilidad depende del mantenimiento de un flujo constante de folículos en crecimiento, por lo que la asociación entre disfunciones ováricas y una fertilidad alterada ha podido ser claramente establecida por un desarrollo folicular anormal, y/o por una esteroidogénesis alterada (Borgeest y col., 2002; Hirshfield 1997; McGee y Hsueh 2000; Rajah y col., 1992). Estas disfunciones ováricas han sido asociadas con alteraciones en la expresión de receptores esteroideos y el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1B o p27 (Britt y Findlay 2002; Harris 2007; Hu y col., 2004; Lydon y col., 1995; Rajareddy y col., 2007; Shiina y col., 2006; Walters y col., 2007; Walters y col., 2010). Todos los tipos de ratones knockout para el RE β (BERKO) son subfértiles, evidenciado principalmente por un menor número de CL y/o un incremento de folículos atrésicos (Harris 2007). Los ratones knockout para el RE α (ERKO) desarrollan un cuadro de infertilidad con ovarios hiperémicos desprovistos de CL y con una foliculogénesis detenida en el estadio antral (Britt y Findlay 2002; Couse y col., 2000). La mayoría de los modelos de ratones hembras knockout para el RA (ARKO) padecen subfertilidad, con pocas crías al parto y foliculogénesis alterada (Walters y col., 2010). En las hembras de estos ratones ARKO se ha identificado una ovulación disfuncional como una causa central del cuadro de subfertilidad, con un desarrollo folicular defectuoso durante el estadio antral, provocando una menor tasa de ovulación y una reducción en el número y tamaño de los CL (Hu y col., 2004; Shiina y col., 2006; Walters y col., 2007; Walters y col., 2010). El RP es necesario para la ovulación y el desarrollo del CL, tal como lo demuestra la infertilidad de los ratones PRKO: las hembras PRKO no ovulan incluso en respuesta a superestimulación, lo que se refleja en la presencia de folículos preovulatorios en el ovario y ausencia de ovocitos en el oviducto (Lydon y col., 1995). En los ovarios de ratones knockout para p27 la activación de los folículos primordiales está exacerbada, provocando falla ovárica prematura (Rajareddy y col., 2007).

El BPA es reconocido como un PE con actividad estrogénica, y así catalogado como un estrógeno ambiental. Como vimos previamente, el estudio de los PE representa un desafío, ya que sus efectos dependen tanto del nivel como del momento de la exposición, siendo especialmente críticos cuando la exposición se produce durante el desarrollo (Alwan 2011).

En este sentido, trabajos nuestros y de otros autores han demostrado que el BPA, cuando se administra en períodos tempranos del desarrollo por vía subcutánea, modifica la foliculogénesis neonatal, disminuye la capacidad reproductiva y aumenta la tasa de abortos (Cabaton y col., 2011; Rivera y col., 2011; Rodriguez y col., 2010; Varayoud y col., 2011). Sin embargo, debido a que los alimentos y las bebidas representan la mayor parte de la exposición humana diaria, la fuente principal de exposición a BPA es a través de la vía oral (Shelby 2008; Vandenberg y col., 2007). Además, desde hace unos años se ha prestado mayor atención a las exposiciones durante el período perinatal (es decir, el período comprendido desde la gestación hasta el periodo postnatal temprano), ya que representa una etapa crítica en que las crías están expuestas a través de la madre y porque una alteración en este período organizacional puede conferir una mayor susceptibilidad a las enfermedades en la vida adulta (Doerge y col., 2010b). Si bien algunos estudios han informado anormalidades asociadas con la administración oral de BPA en un período perinatal (Xi y col., 2011; Zhang y col., 2012), incluyendo alteraciones en la fertilidad, las disfunciones ováricas relacionadas con la exposición a BPA por esta vía de administración a hembras preñadas durante el período perinatal y las consecuencias en las crías cuando son adultas prácticamente no han sido abordadas.

Por lo tanto, nuestro primer objetivo fue investigar los efectos sobre la función ovárica adulta en ratas nacidas de madres que fueron tratadas con dosis bajas de BPA por vía oral durante la gestación y la lactancia. Para explorar posibles vías de acción del BPA, nos propusimos investigar diferentes vías de señalización relacionadas con la foliculogénesis y la esteroidogénesis (expresión de $RE\alpha$, $RE\beta$, RA, p27, enzimas esteroidogénicas y receptores de gonadotrofinas).

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Animales

Los protocolos experimentales fueron diseñados de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio emitidos por la Academia Nacional de Ciencias de EE.UU. y aprobados por el comité de ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Los animales fueron tratados con humanidad y con respeto para el alivio del sufrimiento. Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar, sexualmente maduras (90 días de edad) y criadas en el Departamento de

Fisiología Humana (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Santa Fe, Argentina). Los animales se mantuvieron en un ambiente controlado ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; 14 hs de luz, de 06.00 h a 20.00 h) y con libre acceso a la comida del laboratorio (dieta Rata-Ratón 16-014007, Nutrición Animal, Santa Fe, Argentina). La concentración de fitoestrógenos en la dieta no se evaluó; sin embargo, debido a que la ingesta de alimentos fue equivalente entre los animales del grupo control y los expuestos a BPA, consideramos que los animales en todos los grupos estuvieron expuestos a los mismos niveles de fitoestrógenos. Para minimizar la exposición a otras fuentes de PE, las ratas fueron alojadas en jaulas de acero inoxidable con viruta estéril de madera de pino como ropa de cama; para evitar el contacto con los tapones de goma, se utilizaron botellas de vidrio con topes de acero inoxidable para abastecerlas con agua potable y/o con las soluciones correspondientes a cada grupo experimental.

Las hembras en proestro se juntaron durante la noche con machos de fertilidad comprobada. Al otro día se realizaron extendidos vaginales en las hembras y se designó el día 1 de gestación (DG1) como el día en que se encontró esperma en la vagina de la hembra y se observaron espermatozoides y células escamosas en los extendidos vaginales. En DG9, correspondiente al inicio de la organogénesis en el feto, las ratas preñadas (madres F0) se pesaron y se dio inicio al tratamiento oral con las soluciones de BPA o vehículo, como se detalla a continuación.

1.2.2 Dosificación

Las dosis se calcularon en base al promedio del peso corporal de las ratas y al consumo de agua durante el embarazo y la lactancia. Las soluciones madres de BPA (25 mg/ml, 99% de pureza, Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) se prepararon disolviendo BPA en etanol (Merck Química Argentina, Buenos Aires, Argentina). Inmediatamente antes de la administración, se realizaron diluciones seriadas en agua corriente a una concentración final de $2.5 \mu\text{g BPA/l}$ (BPA0.5) y $250 \mu\text{g BPA/l}$ (BPA50) correspondientes a las dosis teóricas de a) $0.5 \mu\text{g BPA/kg}$ de peso corporal/día (BPA0.5) and b) $50 \mu\text{g BPA/kg}$ de peso corporal/día (BPA50), respectivamente. El grupo control se expuso a una solución vehículo de 0,001% de etanol en agua. Las botellas se enjuagaron y se rellenaron dos veces a la semana con soluciones recién preparadas.

1.2.3 Diseño experimental

En DG9, las madres F0 fueron asignadas al azar a uno de los siguientes grupos experimentales: BPA0.5, BPA50 y control (10 ratas se incluyeron en cada grupo). Todos los tratamientos se administraron en el agua de bebida de las madres F0 desde el DG9 hasta el destete de las crías (F1) en día postnatal 21 (DPN21). Cada madre F0 fue alojada de manera individual. Para determinar la dosis efectivamente ingerida por las madres F0, se registraron los pesos corporales individuales y el consumo de agua de cada madre F0 dos veces a la semana durante todo el tratamiento (Tabla 1.1). La dosis superior de BPA utilizada en este experimento es equivalente a la dosis segura (50 µg/kg de peso corporal/día), establecida por la Agencia Estadounidense de Protección Ambiental o EPA (Richter y col., 2007). La dosis inferior es cien veces menor a la dosis segura (BPA0.5). La última dosis fue elegida en conformidad con la ingesta diaria estimada de BPA para la población humana, siendo BPA0.5 una dosis representativa de la ingesta diaria estimada de BPA en la población de lactantes (Shelby 2008).

Después del parto, las crías F1 fueron pesadas y sexadas de acuerdo a la distancia anogenital y se dejaron 8 crías por madre F0 (preferentemente cuatro machos y cuatro hembras) hasta el destete en DPN21; las hembras restantes y todos los machos fueron asignados a otros experimentos. Al destete, las crías hembras F1 (expuestas al xenoestrógeno transplacentariamente y a través de la leche) se transfirieron a un medio ambiente libre de BPA, donde se mantuvieron hasta el momento de la toma de muestras en DPN90 (Figura 1.1).

Tabla 1.1. Ingesta diaria de BPA y vehículo.

	Control	BPA0.5	BPA50
<i>Concentración en el agua de bebida (µg/l)</i>	0	2.5	250
<i>Consumo de agua (ml/día)</i>	68,22±3,23	70,31±4,06	62,91±2,12
<i>Peso corporal (g)</i>	257,2±5,17	252,2±4,33	247,6±5,05
<i>Dosis promedio (µg/kg pc.día)</i>	0	0,7±0,05	63,87±2,84

Los datos del consumo de agua y peso corporal fueron registrados dos veces a la semana durante todo el tratamiento. Los valores fueron expresados como la media ± SEM de 10 hembras preñadas F0/grupo. pc: peso corporal.

1.2.4 Toma de muestras

Cada etapa del ciclo estral (proestro, estro, metaestro o diestro) se determinó diariamente por extendidos vaginales (Montes y Luque 1988) durante al menos 45 días antes de la toma de muestras. En la mañana del estro, a los 90 días de edad (DPN90), los animales fueron sometidos a eutanasia ($n = 10$ ratas F1/grupo), y se obtuvieron los ovarios y muestras de sangre de las hembras F1. Las muestras de suero se almacenaron a -80°C hasta que se realizaron los ensayos hormonales. Uno de los ovarios se destinó para los estudios histológicos, para lo cual se fijó en 10% (v/v) de formalina tamponada y se embebió en parafina. El ovario contralateral se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C , siendo destinados para los estudios de expresión génica de ARNm por transcripción reversa asociada a transcripción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real (Figura 1.1).

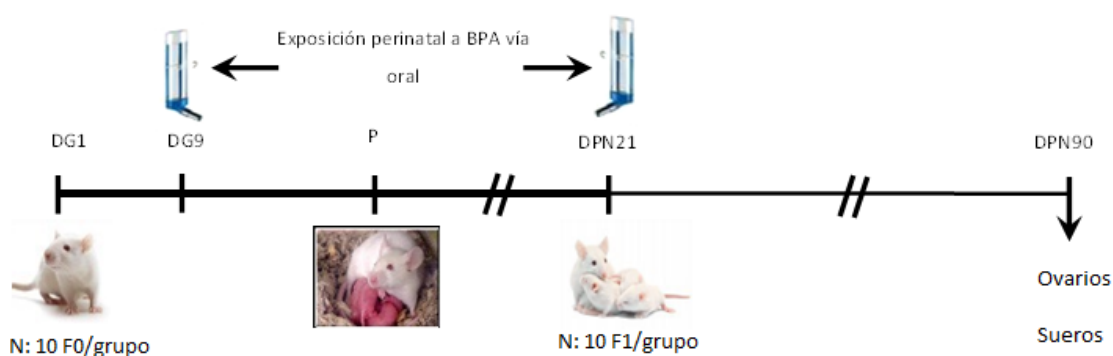


Figura 1.1. Diseño experimental y obtención de muestras. Las madres F0 fueron expuestas por vía oral a BPA o a una solución vehículo de 0,001% de etanol en agua durante la gestación y la lactancia (desde el DG9 hasta el DPN21). Al momento del parto los animales fueron sexados y se dejaron preferentemente 4 hembras y 4 machos por camada. En DPN21 se separaron las crías F1 de la madre y las hembras se mantuvieron en un ambiente libre de BPA hasta el DPN90. En la mañana del estro se obtuvieron las muestras de suero y tejido. DG0: día gestacional 1. DG9: día gestacional 9. P: parto. DPN21: día posnatal 21. DPN90: día posnatal 90.

1.2.5 Dinámica folicular

La dinámica folicular se evaluó siguiendo los protocolos descritos anteriormente por nuestro grupo (Rivera y col., 2011; Rodríguez y col., 2010). Los ovarios fueron fijados en formalina tamponada al 10% durante 24 hs a temperatura ambiente, procesados en

alcohol y xilol para luego embeberlos en parafina. Todo el ovario se seccionó en cortes numerados y seriados de 5 μm de espesor, y un corte de cada diez se tiñó con picrosirius-hematoxilina (P-H) para su observación morfológica (intervalo de 50 micras entre las secciones evaluadas, figura 1.2).

En estos cortes teñidos con P-H se determinaron el número de CL y el número de folículos en cada etapa del desarrollo folicular. Los folículos fueron clasificados como primordial, primario, preantral o antral, siguiendo los criterios morfológicos descritos anteriormente (Rivera y col., 2011; Rodríguez y col., 2010), y sólo se contaron aquellos cuyo núcleo era visible, para evitar el conteo del mismo folículo varias veces.

Los folículos primordiales se caracterizan por un ovocito encapsulado por células escamosas de la pre-granulosa aplanadas. Cuando el folículo primordial es activado e inicia la foliculogénesis, se observan algunas células de la granulosa que cambian de morfología aplanada o escamosa a cúbicas. Los folículos primarios se identifican por una capa completa de células cúbicas de la granulosa rodeando el ovocito. Los folículos preantrales, contienen de dos o más capas completas de células cúbicas de la granulosa, y los folículos antrales, más de cinco capas de células de la granulosa y una cavidad antral completamente formada. Los folículos primarios (incluyendo primarios tempranos), preantrales y antrales fueron considerados como componentes de la población folicular en crecimiento o reclutados.

El número de CL ha sido utilizado como un parámetro representativo de la ovulación (Maffini y col., 2006), tanto de la ovulación natural como la resultante de protocolos de superestimulación (Hu y col., 2004; Shiina y col., 2006; Walters y col., 2007). Para evitar repetir el conteo de los CL que se solapan, medimos el diámetro de los CL en todas las secciones y luego calculamos el promedio. Encontramos que el diámetro promedio fue de 1017,2 μm . Basados en esto, el número de CL por ovario fue cuantificado en tres secciones separadas 1000 μm unas de otras.

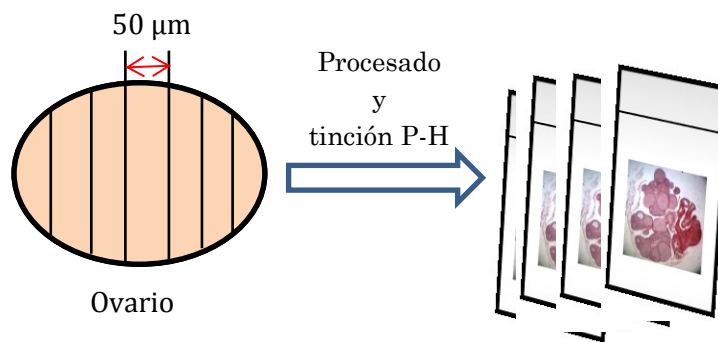


Figura 1.2. Dinámica folicular. Todo el ovario se seccionó en cortes numerados y seriados de 5 μ m de espesor, y un corte de cada diez se tiñó con P-H para su observación morfológica (intervalo de 50 micras entre las secciones evaluadas).

En los recuentos realizados se evaluaron todos los folículos sanos (sin signos de atresia). Los folículos clasificados como sanos mostraron una capa de células de la granulosa compacta y bien organizada, con células estrechamente yuxtapuestas, numerosas figuras mitóticas y células con núcleos picnóticos solamente ocasionales o raras. En contraste, la atresia folicular se caracterizó por la desintegración generalizada de la capa de células de la granulosa y la escasez o ausencia de células mitóticas (Hirshfield y Midgley 1978). Los FMO también fueron evaluados, siendo identificados como aquellos folículos que contenían más de un ovocito encerrado dentro de las capas de células de la granulosa (Figura 1.3). Se contó tanto el número de folículos para cada etapa folicular y FMO en todas las secciones teñidas obtenidas de todo el ovario; finalmente el número de folículos fue normalizado por el número total de secciones analizadas (Chen y col., 2007; Li y col., 2014; Yang y Fortune 2008).

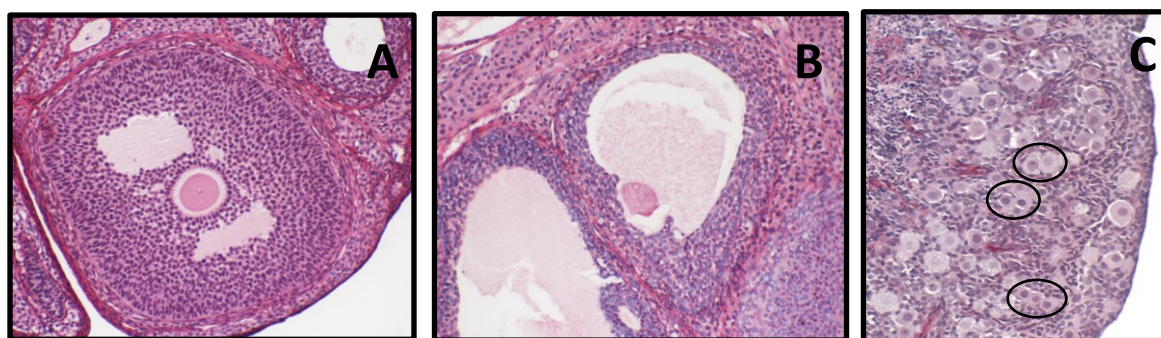


Figura 1.3. A) Folículo antral sano. B) Folículo antral atrésico. C) FMO (círculos).

Magnificación 20X.

La supervivencia de los ovocitos se evaluó como se ha descrito anteriormente (Rodríguez y col., 2010; Tilly 2003) mediante la determinación del número total de ovocitos por ovario. Los ovocitos fueron contados en las secciones teñidas con P-H, representativas de todo el ovario; el número obtenido se multiplicó por un factor de 10 para tener en cuenta el hecho de que nueve quintas partes del ovario no se analizaron.

Además, se midió el tamaño de los folículos preantrales y antrales determinando el diámetro máximo de estos folículos. El análisis se realizó en imágenes digitalizadas tomadas con una cámara de vídeo de color Spot Insight versión 3.5 adjuntada a un microscopio Olympus BH2. La medida del diámetro se realizó utilizando las herramientas básicas en el sistema Image Pro-Plus 4.1.0.1. Los resultados se expresaron en micrómetros (μm). Los parámetros se determinaron en 300 folículos preantrales y 100 antrales, en cada ovario; obteniéndose luego el promedio por animal y luego para cada grupo de tratamiento.

1.2.6 Expresión proteica de los receptores esteroideos y p27 por IHQ

Para evaluar la expresión de las proteínas de RE α , RE β , RP, RA, y p27 se realizaron ensayos de IHQ en al menos tres cortes histológicos o secciones provenientes de diferentes profundidades de cada ovario, tal como describimos en publicaciones anteriores (Rodríguez y col., 2010; Stoker y col., 2008). Luego de la desparafinización, se llevó a cabo el pretratamiento de microondas (recuperación antigénica). Los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4°C con las diluciones que se muestran en la Tabla 1.2. Se utilizaron como anticuerpos secundarios anti-IgG biotinilado de ratón (Sigma-Aldrich Argentina SA, Buenos Aires, Argentina) o anti-IgG biotinilado de conejo (Sigma). Las reacciones se desarrollaron por el método de estreptavidina-biotina peroxidasa, que emplea diaminobencidina (DAB) (Sigma) como sustrato cromógeno. A excepción de la determinación de la densidad óptica integrada (DOI) de los cortes inmunomarcados con RE β y RA, las muestras fueron contracoloradas con hematoxilina de Mayer (Biopur, Rosario, Argentina) y montadas con medio de montaje permanente (PMyR, Buenos Aires, Argentina). Cada ensayo incluyó controles positivos y negativos, reemplazando el anticuerpo primario con suero no inmune de conejo o ratón (Sigma). En los controles positivos se reprodujo el patrón

de inmunomarcación previamente descrito (Drummond 2006; Drummond y col., 2002; Rodríguez y col., 2010).

Tabla 1.2. Anticuerpos usados en los ensayos de IHQ.

Proteína	Proveedor	Anticuerpo	Origen	Dilución
REα	Novocastra	ER-6F11	ratón	1:60
REβ	Zymed	ER-Z8P	conejo	1:200
RP	DAKO-Corp	PR-A0098	conejo	1:500
RA	Santa Cruz Biotechnology	AR(N-20) sc-815	conejo	1:400
p27	Santa Cruz Biotechnology	p27 (C-19) sc528	conejo	1:1200

Tal como hemos descrito previamente, una primera evaluación de la expresión proteica consistió en una exhaustiva observación al microscopio a doble ciego de los cortes inmunomarcados. Como resultado de esta evaluación de las secciones inmunomarcadas de RE α , RP y p27, éstas se mantuvieron sin cambios entre el control y los grupos tratados con BPA. Por lo tanto, los ensayos de IHQ correspondientes a RE α , RP y p27 se evaluaron cualitativamente (Rodríguez y col., 2010), mientras que los niveles de expresión de RE β y RA fueron evaluados cuantitativamente mediante la determinación de la DOI (Ramos y col., 2002; Rodríguez y col., 2010). Para ello, se tomaron imágenes digitales con una cámara de vídeo de color Spot Insight versión 3.5 anexada a un microscopio Olympus BH2. Se obtuvieron imágenes representativas de todos los campos de la sección completa, evaluándose dos secciones por ovario. El microscopio fue configurado correctamente para la iluminación Koehler. La corrección de la iluminación desigual (corrección de sombreado) y la calibración del sistema de medición se realizaron con un portaobjetos de referencia. Se realizó un análisis de imagen utilizando el sistema Pro-Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Las imágenes de las secciones inmunomarcadas fueron convertidas a escala de grises, y se delimitaron las células a evaluar (ovocitos y células de la granulosa). La DOI se calculó como una combinación lineal entre la intensidad de gris promedio y la superficie relativa ocupada por células positivas. Debido a que la DOI es un parámetro adimensional, los resultados quedan expresados como unidades arbitrarias. Los

parámetros se promediaron por rata y finalmente para cada grupo experimental (figura 1.4).

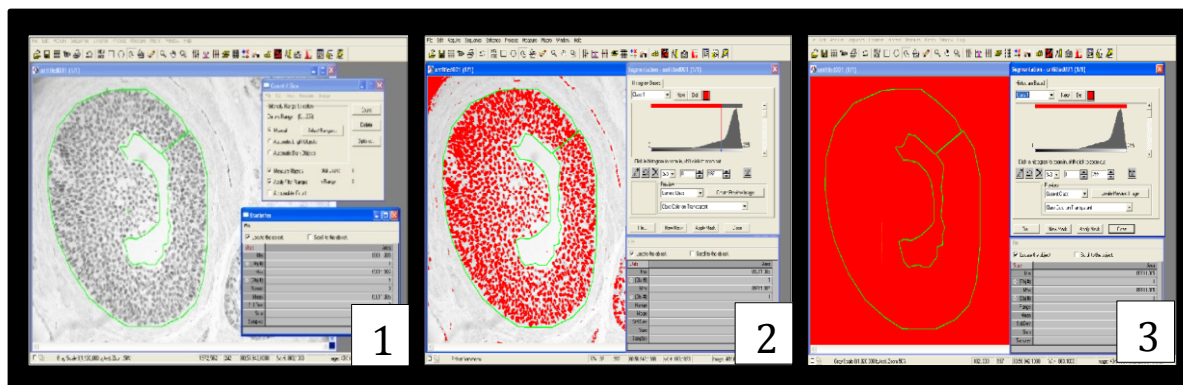


Figura 1.4. Procedimiento para el análisis de la densidad óptica integrada (DOI). Las imágenes representan los pasos seguidos en el cálculo de DOI del compartimiento de las células de granulosa. 1) En primer lugar se delimita el compartimiento de las células de granulosa para cada folículo. 2) Luego, se determina el umbral de detección, que permite definir a la célula como positiva o negativa. 3) Finalmente se establece el área total. Con estos datos, se calcula la DOI como $(\text{área positiva} \times 100 / \text{área total}) \times \text{intensidad promedio}$. Se afecta cada ensayo por un factor de normalización, según la DOI obtenida de un vidrio control que se coloca en todos los ensayos de IHQ. Se utilizó un sistema computarizado de análisis de imágenes, con el software Image Pro Plus con kit de captura Pro-Series 128.

1.2.7 Expresión génica de las enzimas de la esteroidogénesis y de los receptores de gonadotrofinas por RT-PCR en tiempo real

El análisis de los niveles de expresión relativos de ARNm de Cyp11 (P450scc), 3 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa (Hsd3b), Cyp17, Cyp19, el receptor de la hormona foliculo estimulante (FSHR) y el receptor de la hormona luteinizante (LHR) fueron realizados por RT-PCR en tiempo real, siguiendo protocolos descriptos previamente por nuestro grupo (Ramos y col., 2007). Los ovarios de cada grupo experimental (control, BPA0.5 y BPA50) se homogeneizaron individualmente en Trizol (Life Technologies, NY, EE.UU.), y el ARN se extrajo de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de ARN total se evaluó por Absorbancia a 260 nm (A260), y el ARN se almacenó a -80°C. Cantidades iguales (1 μ g) de ARN total fueron transcritas a ADNc. Los pares de cebadores utilizados para amplificar el ADNc de Cyp11, Hsd3b, Cyp17, Cyp19, FSHR, LHR y L19 (como *housekeeping*) se muestran en la Tabla 1.3. Los

niveles de ADNc fueron detectados por RT-PCR utilizando el termociclador Rotor-Gene Q (Instrumentos Qiagen AG, Hombrechtikon, Suiza) y *Hot Fire Pol EvaGreen qPCR Mix Pluss* (Solís Biodyne; Biocientífica, Rosario, Argentina). Después de la desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min, la mezcla de reacción se sometió a ciclos sucesivos de desnaturalización a 95°C durante 15 s, hibridación a 54°C (para Cyp11), 56°C (para Hsd3b), 59°C (para Cyp17), 54°C (por Cyp19), 52°C (para FSHR), 53°C (para LHR) o 60°C (para L19) durante 15 s, y extensión a 72°C durante 15 s. La pureza del producto fue confirmada por curvas de disociación, y las muestras al azar se sometieron a electroforesis en agarosa gel. Todos los productos de PCR fueron clonados usando un kit de clonación TA (Invitrogen) y la especificidad se confirmó por secuenciación de ADN (datos no mostrados). Se incluyeron en todos los ensayos, controles negativos que no contienen ADN molde, no produciendo amplificación consistente. Una muestra sin la transcriptasa inversa se incluyó para detectar la contaminación por ADN genómico. Todos los controles y las muestras de cada experimento independiente se analizaron por triplicado. La eficiencia de las reacciones de PCR se evaluó para cada gen target por amplificación de una serie de diluciones (más de cinco órdenes de magnitud) de fragmentos de ADNc de los transcritos analizados. La cuantificación de los datos de las PCRs en tiempo real se realizó por el método de la Curva Estándar Relativa, donde se determinó la cantidad relativa del gen *target* en las muestras experimentales a partir de una curva estándar del mismo. De igual manera, se realizó una curva estándar para el *housekeeping* (L19) y se determinó la cantidad relativa presente en las muestras. Finalmente se normalizan los valores de las muestras del gen target con el *housekeeping*, y estos datos se compararon entre los distintos grupos mediante test estadísticos detallados más adelante.

Tabla 1.3. Pares de cebadores y productos de PCR en tiempo real.

Gen	Cebadores (5'-3')	Tamaño (bp)	Acceso a Genbank
Cyp11	F:AGGGAGAACGGCACACACAG R:TCGCAGGAGAAGAGAGTCGC	143	NM_017286.2
Hsd3b	F:AGGCCTGTGTCCAAGCTAGTGT R:CTCGGCCATCTTTTGCTGTAT	178	BC086578.1

Cyp17	F: GGTGATAAAGGGTTATGCCA R:GCTTGAATCAGAATGTCCGT	117	NM_012753
Cyp19	F: TGGCAGATTCTTGTGGATGG R: CGAGGACTTGCTGATGATGAGT	118	AC_000076.1
FSHR	F: TTGCTGGATTTGGAGACCTG R: TGGGTAGGTTGGAGAACACA	90	NM_199237.1
LHR	F: ACTATAACCACGCCATAGAC R: GGCAAACACAGTAAAGAAGC	71	NM_012978.1
L19	F:AGCCTGTGACTGTCCATTCC R:TGGCAGTACCCTTCCTCTTC	153	NM_031103

1.2.8 Ensayos hormonales

Los niveles séricos de E2 y P4 se determinaron mediante el uso de kits comerciales de RIA, siguiendo las instrucciones del fabricante (DSL-4800, BeckmanCoulter Ultra-Sensible Estradiol RIA, INMUNOTECH.; IM1188, BeckmanCoulter RIA Pregesterone, INMUNOTECH). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

El ensayo de E2 utiliza antisuero de conejo anti-estradiol y E2 marcado con yodo 125 (¹²⁵I). El antisuero usado cruza un 2,4% con estrona, 0,64% con estriol, un 0,21% con 17β-estradiol, 2,56% con 17β-estradiol-3-glucurónido, 0,17% con estradiol-3-sulfato, y 3,4% con D-equilenina. El suero de cabra anti-gama globulina de conejo con polietilenglicol se utiliza como reactivo precipitante del segundo anticuerpo. La sensibilidad del ensayo fue de 2,2 pg/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron del 8,9% y 12,2%, respectivamente.

El ensayo de P4 utiliza tubos recubiertos con anticuerpos anti-progesterona y progesterona marcada con ¹²⁵I. El antisuero usado cruza un 15,02% con 5α-pregnanediona, 8,12% con 5β- pregnanediona, 5,1% con 6β-hidroxiprogesterona, 4,07% costicosterona, 2,56% con 11-desoxycosticosterona y 1,15% 17α-hidroxyprogesterona. La sensibilidad del ensayo fue de 0,03 ng/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron del 8,15% y 8,66 %, respectivamente.

1.2.9 Ciclo estral

Para determinar si la exposición al BPA produjo alteraciones en la regularidad del ciclo estral, se realizaron frotis vaginales diarios en las hembras controles y tratadas desde DPN45 hasta DPN90 (Montes y Luque 1988). Los datos fueron analizados y expresados como duración del ciclo estral (en días) y porcentaje de estro (% del tiempo en estro en relación con la duración total de ciclo estral).

1.2.10 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como el promedio y el error estándar de la media (SEM). Los valores de los ensayos hormonales no se distribuyeron normalmente y fueron transformados antes del análisis estadístico (Campbell y col., 2009; Walters y col., 2012). Todos los datos se expresan como la media±SEM. Se realizó un análisis ANOVA para obtener el significado estadístico global, y se utilizó la prueba post hoc de Dunnett para comparar cada grupo experimental con el grupo control. En todos los casos, los valores con $p < 0,05$ fueron considerados como significativos.

1.3 RESULTADOS

La exposición directa a BPA o vehículo en el agua de bebida no produjo signos de embriotoxicidad: todas las hembras preñadas tuvieron sus crías con éxito, y el número de crías nacidas vivas por camada fue similar entre los grupos. Tampoco se observaron cambios en la conducta maternal ni lactancia anormal, ni hubo cambios en la ganancia de peso corporal en las crías F0. La duración de la gestación no se vio modificada, y no se observaron malformaciones en las crías F1 en el parto o al destete. Además, el análisis de ciclo estral de las hembras F1 no mostró cambios entre los grupos, como se evidencia por la duración del ciclo estral o la duración de la fase de estro (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Ciclo estral.

	Control	BPA 0.5	BPA 50
<i>Porcentaje en estro</i>	21.01±1.362	18.54±2.362	18.91±1.166
<i>Duración del ciclo estral (días)</i>	5.208±0.150	5.963±0.593	6.339±0.521

Los datos fueron expresados como la media ± SEM.

1.3.1 Los ovarios de los animales expuestos a BPA mostraron un menor peso y una disminución del reclutamiento inicial.

El peso corporal de los animales fue similar entre los grupos. Sin embargo, el peso húmedo de los ovarios fue menor en los animales expuestos a BPA comparados con los controles (Figura 1.5).

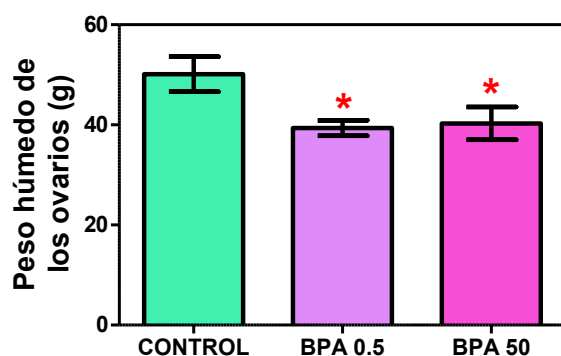


Figura 1.5. Peso húmedo de los ovarios en DPN90 de hembras perinatalmente expuestas a vehículo (control), BPA 0.5 y BPA 50. Los datos fueron expresados como la media \pm SEM.

Significancia estadística: * $p < 0.05$ vs control.

La figura 1.6 muestra el número de folículos primordiales y reclutados o en crecimiento (primarios, preantrales y antrales) en el control y los grupos tratados. Como era de esperar, la mayoría de los folículos observados en los ovarios de las hembras del grupo control fueron primordiales, observándose valores similares en las que fueron expuestas a BPA. En cambio, ambas dosis de BPA provocaron una disminución significativa en los folículos reclutados (Control: $7,634 \pm 0,983$; BPA0.5: $5,013 \pm 0,550^*$; BPA50: $5,101 \pm 0,485^*$). Esta disminución en la población de folículos en crecimiento fue a expensas de una reducción de los folículos primarios.

Tomados en conjunto, estos resultados muestran que el BPA, en las dos dosis ensayadas, inhibe el proceso de reclutamiento inicial mediante la reducción de la transición de folículo primordial a primario.

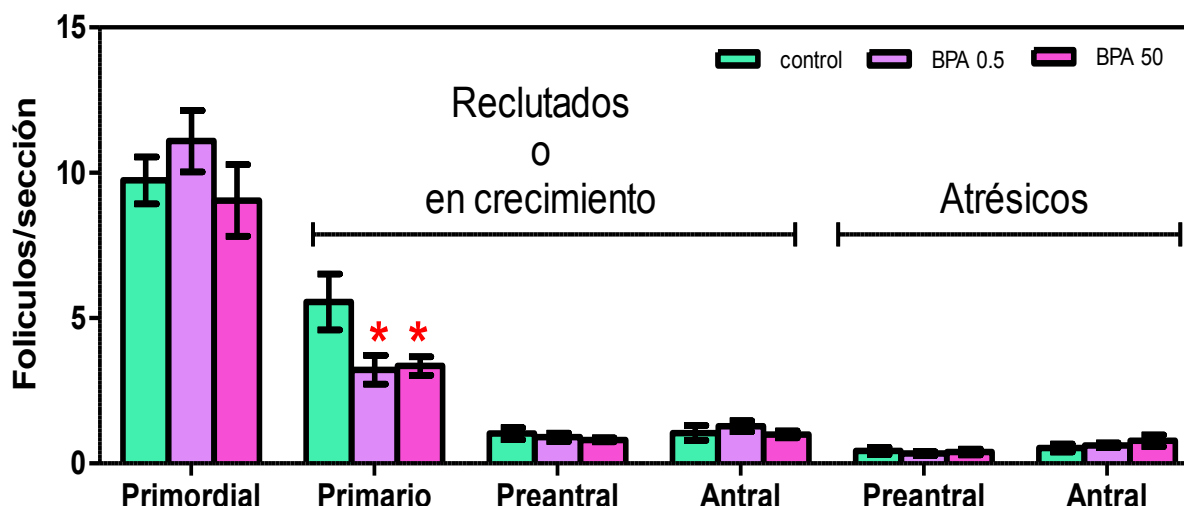


Figura 1.6. Reclutamiento folicular en los ovarios de las ratas expuestas a BPA y Control.

Los ovarios de las hembras de DPN90 fueron embebidos en parafina. El ovario entero se desbastó en secciones de 5µm de espesor, y un corte de cada 10 secciones se tiñó con picosirius-hematoxilina para la posterior observación microscópica (intervalos de 50 µm entre secciones). El número de folículos primordiales, primarios, preantrales y antrales fue calculado como se describe en M&M. Los datos fueron expresados como la media±SEM. Significancia estadística: *: p<0.05 vs control.

Como observamos en la figura 1.6, la disminución de la transición de folículo primordial a primario no tuvo efectos sobre la foliculogénesis ulterior en los estadios preantral y antral. Para investigar si podía ocurrir una posible alteración en el tamaño de los folículos individuales y no en la cantidad de folículos que comprenden estas poblaciones, se midió el tamaño de los folículos antrales y preantrales. La tabla 1.5 resume estos resultados, que muestran que los folículos antrales y preantrales de las hembras expuestas a BPA alcanzaron tamaños similares al control.

Tabla 1.5. Tamaño promedio de los folículos preantrales y antrales.

	Control (µm)	BPA 0.5 (µm)	BPA 50 (µm)
<i>Preantral</i>	3282±85,11	4598±1054	3655±407,0
<i>Antral pequeño</i>	5533±308,3	5453±180,6	5914±367,2
<i>Antral grande</i>	18981±1492	22531±2678	20394±1544

Los datos fueron expresados como la media ± SEM.

También se evaluó la supervivencia de los ovocitos midiendo el número total de ovocitos en el ovario entero. No se observaron cambios en la población total de ovocitos entre el grupo control y los tratados con BPA (Figura 1.7).

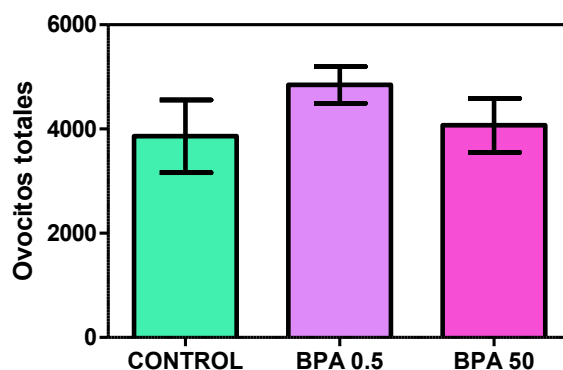


Figura 1.7. Número total de ovocitos en los ovarios de las ratas control y las expuestas al BPA. Los ovarios de las hembras de DPN90 fueron incluidos en parafina. Todo el ovario se seccionó en serie (5 μ m de espesor) y una sección de cada diez secciones se tiñó con P-H para su observación morfológica (intervalo de 50 micras entre las secciones). Se calcularon los ovocitos totales como se describe en M&M. Los datos fueron expresados como la media \pm SEM.

1.3.2 Los animales expuestos a BPA mostraron un aumento en el número de CL y en los niveles de P4.

Se determinó el número de CL en los ovarios de los animales controles y expuestos a BPA. Observamos que la exposición a BPA causó un aumento en el número de CL en BPA50 y BPA0.5 en comparación con el grupo control (Figura 1.8).

Para establecer si el número de CL en los animales tratados se correlaciona con los niveles de P4, se midió la concentración sérica de esta hormona. En los animales tratados con ambas dosis de BPA se observaron mayores niveles de P4 circulantes respecto a los animales no expuestos (Figura 1.8), sin cambios en los niveles de E2 (datos no mostrados).

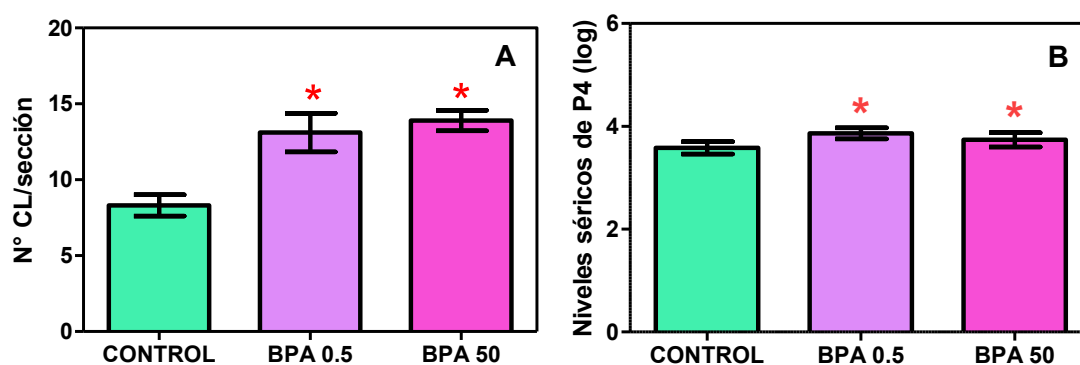


Figura 1.8. Función ovárica por el tratamiento con BPA. A) Número total de CL en los ovarios de las ratas control y las expuestas a BPA. El número de CL por ovario se cuantificó en 3 secciones separadas por 1000 μ m entre cada una. B) Niveles séricos de progesterona en las ratas controles y expuestas a BPA (pg/ml). Los niveles de P4 se calcularon como se describió en M&M. En ambas gráficas los datos fueron expresados como la media \pm SEM. Significancia estadística: *: $p < 0.05$ vs control.

1.3.3 La expresión del ARNm de la enzima *Hsd3b* se incrementó en los ovarios de las hembras expuestas perinatalmente a ambas dosis de BPA

Los niveles de expresión de las enzimas esteroideogénicas en respuesta al tratamiento perinatal con BPA se analizaron por RT-PCR en tiempo real. Como podemos ver en la figura 1.9, la exposición a BPA no causó alteraciones en los niveles de expresión del ARNm de *Cyp11*, *Cyp17* y *Cyp19*. En cambio, pudimos observar un aumento en la expresión de *Hsd3b* en respuesta a la exposición a BPA.

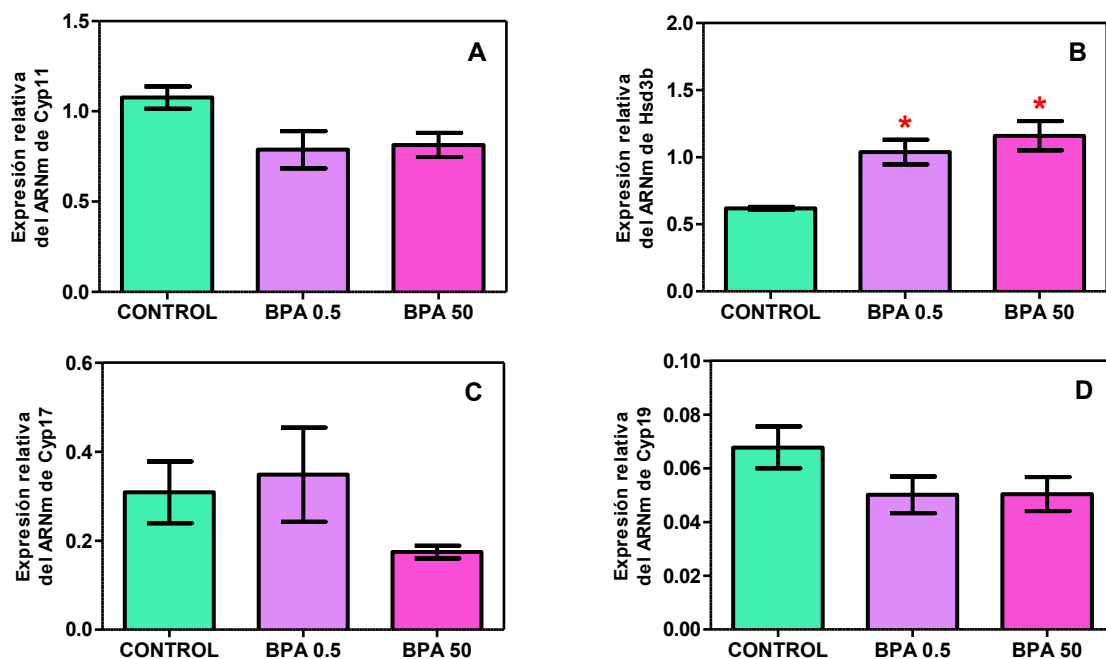


Figura 1.9. Análisis por RT-PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de las enzimas esteroidogénicas en los ovarios de ratas expuestas perinatalmente a BPA. Los niveles relativos de ARNm de Cyp11 (A), Hsd3b (B), Cyp17 (C) y Cyp19 (D) se midieron por PCR en tiempo real y fueron normalizados con la expresión de L19. Los datos fueron expresados como la media \pm SEM. Significancia estadística: *: $p < 0.05$ vs control.

1.3.4 Los folículos reclutados mostraron menores niveles de RA, sin observarse cambios en RE α , RE β y p27

Para evaluar potenciales vías de acción mediante las cuales el BPA podría alterar el desarrollo folicular y/o la ovulación, evaluamos la expresión proteica de p27, RA, RP, RE α y RE β para cada estadio folicular. La proteína p27 se expresa en el núcleo de los ovocitos y de células de la granulosa de los folículos primordiales y reclutados en DPN90 (Figura 1.10A). El RE α se expresó en las células de la teca y de la granulosa de los folículos en crecimiento, así como en las células intersticiales estromales (Figura 1.10C). Tal como pudimos concluir de un análisis cualitativo detallado, la expresión tanto de p27 como de RE α no fue alterada en los folículos de las ratas tratadas con BPA.

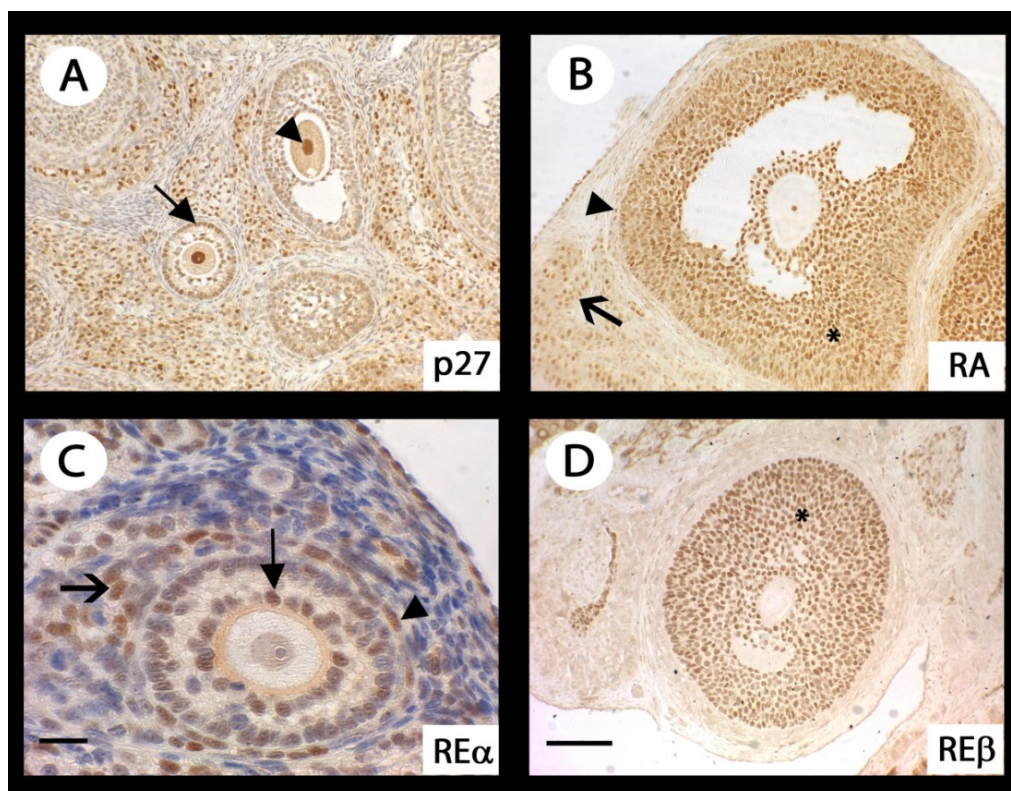


Figura 1.10. Expresión de inhibidor de quinasa (Cdk) dependiente de ciclina 1B (p27), receptor de andrógenos (RA), y receptores de estrógenos alfa (RE α) y beta (RE β) en ovario. Microfotografías representativas de secciones de ovario inmunomarcadas con anticuerpos específicos que se detallan en la Tabla 2. (A) Expresión positiva de p27 en los núcleos de los ovocitos (punta de flechas) y células de la granulosa (flecha rellena) de los folículos reclutados; (B) expresión positiva de RA en las células de la granulosa (asterisco) y de la teca (punta de flecha) de los folículos en crecimiento y en las células del estroma (flecha); (C) expresión positiva de RE α en las células de la teca (punta de flecha), granulosa (flecha rellena) e intersticiales (flecha); (D) expresión positiva de RE β en las células de la granulosa (asterisco). La IHQ fue desarrollada utilizando DAB como sustrato cromógeno y Hematoxilina de Mayer en la contra-tinción. Barra de escala = 25 micras.

Tanto RE β como RA se expresaron predominantemente en las células de la granulosa de los folículos en crecimiento y su expresión aumentó gradualmente, alcanzando los niveles más altos en las células de la granulosa de folículos antrales (Figuras 1.10B y 1.10D). Las células de la teca y del estroma también se marcaron positivamente para RA. La expresión de RE β en las poblaciones de los folículos de los animales tratados con BPA no presentó cambios en comparación con las de ratas no expuestas a BPA (Figura 1.11A). En cambio, la expresión de RA se redujo significativamente en los

folículos primarios, preantrales y antrales de los ovarios de las ratas tratadas con BPA50 y en los folículos primarios de ratas tratadas con BPA0.5. Por el contrario, en los folículos primordiales de los ovarios expuestos a BPA0.5 la expresión de RA se incrementó (Figuras 1.11B y 1.12).

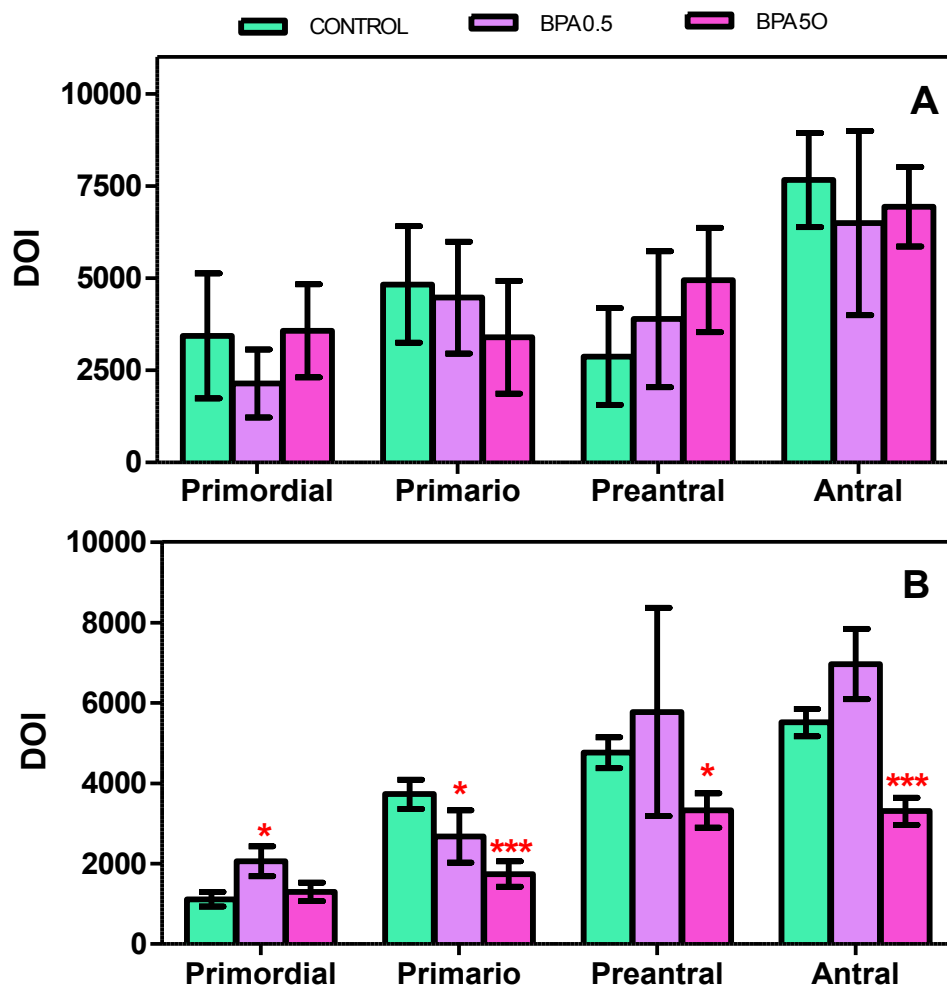


Figura 1.11. Efecto de la exposición a BPA en la expresión del REβ (A) y RA (B) en las células de la granulosa de folículos primordiales y reclutados. La cuantificación de la IHQ se realizó en imágenes digitalizadas de todos los campos para toda la sección del tejido. Las imágenes se convierten a escala de grises y la DOI de las células de la granulosa de los folículos primordiales, primarios, preantrales y antrales fueron calculados y expresados en unidades arbitrarias como se describe en M & M. Los datos se expresan como la media ± SEM.

Significancia estadística: *: $p < 0.05$ vs control; ***: $p < 0,001$ vs control.

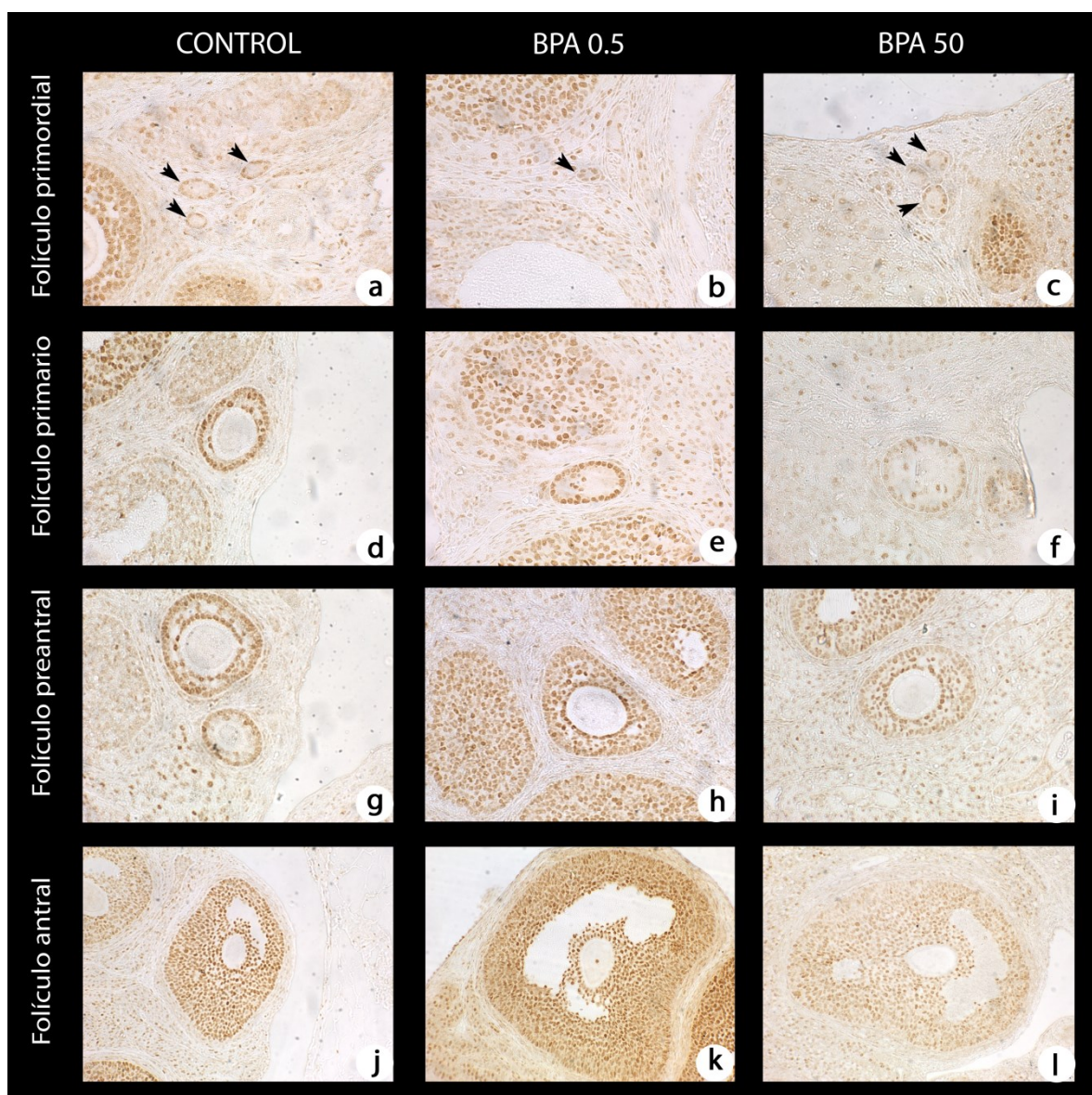


Figura 1.12. Expresión del RA en cada estadio folicular en ovarios de animales expuestos a BPA y vehículo. Fotografías representativas de la expresión del RA en folículos primordiales (a-c), primarios (d-f), preantrales (g-i) y antrales (j-l) en los grupos control, BPA 0.5 y BPA 50. Magnificación: A-I: 40x, y J-L: 20x.

Realizamos ensayos de IHQ para RP, pero la tinción fue inconsistente. Pensamos que esta inconsistencia se debió al momento en el que se obtuvieron los ovarios, ya que se ha informado que RP alcanza su expresión máxima 4-8 horas después de la administración de hCG/pico de LH y luego disminuye a niveles indetectables por 12 horas después de hCG inyección (Park y Mayo 1991; Robker y col., 2000). En nuestro experimento, se obtuvieron los ovarios en estro, aproximadamente 14 a 16 horas

después del pico de LH, por lo tanto, no pudimos obtener una detección IHQ adecuada de RP en el ovario.

1.3.5 La expresión del ARNm de FSHR fue alterada por la exposición a BPA

La figura 1.13 muestra la expresión del ARNm de LHR y FSHR en ovarios de las hembras en DPN90. FSHR mostró un incremento en los ovarios de las hembras expuestas a BPA0.5, mientras que LHR no mostró cambios en respuesta a la exposición a BPA.

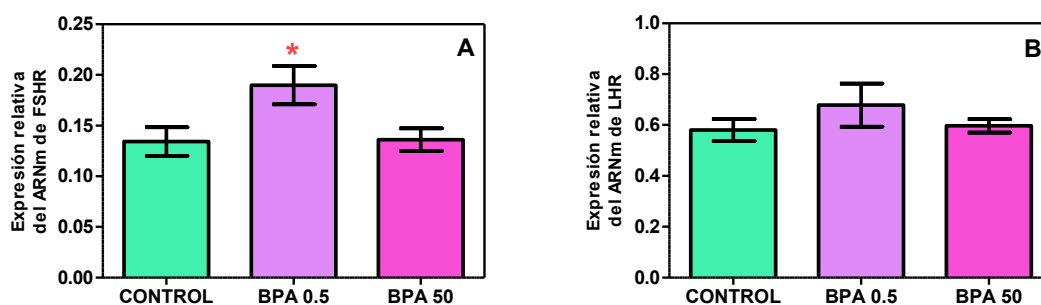


Figura 1.13. Expresión del ARNm de FSHR y LHR en los ovarios de ratas expuestas perinatalmente a BPA. Los niveles relativos de ARNm de FSHR (A) y LHR (B) se midieron por RT-PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizaron con la expresión de L19. Los datos se expresan como media \pm SEM. Significancia estadística: *: $p < 0.05$ vs control.

1.4 DISCUSIÓN

En la literatura relativa a perturbación endocrina hay diversos trabajos que informan efectos del BPA en el desarrollo ovárico. Estos efectos comprenden cambios tan variados como la inducción de folículos poliovulares (Rivera y col., 2011; Stoker y col., 2008; Suzuki y col., 2002), quistes (Fernandez y col., 2010), aneuploidía (Hunt y col., 2003), estro persistente, incremento en la incidencia de sangre en la bursa ovárica y tejido ocupado por folículos antrales (Markey y col., 2003), alteración de la capacidad esteroidogénica (Peretz y col., 2014), del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (Fernandez y col., 2009), y de la foliculogénesis (Li y col., 2014; Rodriguez y col., 2010). Sin embargo, la mayor parte de estos hallazgos son resultados de exposición a BPA por vías diferentes a la oral, que es la vía de ingreso más representativa de las fuentes de exposición de los seres humanos y animales. Además, se ha hecho hincapié

en la necesidad de establecer los efectos que las exposiciones en el período perinatal tienen en la edad adulta (Xi y col., 2011; Zhang y col., 2012; Peretz y col., 2014). Los resultados correspondientes a este capítulo muestran algunas disfunciones ováricas en hembras adultas nacidas de madres tratadas con bajas dosis de BPA por vía oral durante el período perinatal (período que abarca desde el día 9 de gestación hasta el final de la lactancia). Estas disfunciones comprenden, un menor reclutamiento inicial asociado a un desbalance en la expresión de RA entre las poblaciones foliculares primordial/primario y un mayor número de cuerpos lúteos (indicio de incremento en el número de ovocitos ovulados), junto con mayores niveles de progesterona sérica. Nuestros resultados sugieren además que las dos dosis testeadas (BPA50 y BPA0.5) podrían afectar las últimas etapas del desarrollo folicular a través de mecanismos diferentes: por una menor expresión del RA en los ovarios de animales expuestos a BPA50, y un aumento de la sensibilidad a FSH en los animales expuestos a BPA0.5.

Una constante que observamos en nuestro trabajo, así como en publicaciones de otros autores, es la capacidad de BPA de afectar los estadios tempranos de desarrollo folicular. En nuestro grupo, anteriormente hemos demostrado que el BPA, cuando es administrado durante el período postnatal por vía subcutánea, actúa como un estimulador del reclutamiento inicial, provocando una reducción en la reserva de folículos primordiales en ratas y corderas (Rivera y col., 2011; Rodríguez y col., 2010). Usando otra vía de administración, Wang y sus colegas (Wang y col., 2014) observaron que la exposición oral a BPA *in utero* también reduce el tamaño de la reserva de folículos primordiales en los recién nacidos (DPN4), alterando la ruptura de los nidos de células germinales. Cuando BPA es inyectado por vía intraperitoneal durante una semana en el período prepuberal, provoca una disminución en el número de todos los tipos foliculares y de cuerpos lúteos, e incrementa el número de folículos atrésicos en DPN35 (Li y col., 2014). Nuestros resultados del presente capítulo muestran un número reducido de folículos en crecimiento en los ovarios de hembras adultas, que estuvieron expuestas a BPA durante el período perinatal. En base a esto podemos concluir que el desarrollo folicular es un proceso altamente sensible a la acción del BPA, dado los efectos encontrados con diferentes vías de administración, diferentes dosis y momentos del desarrollo, e incluso diferentes especies.

En ambos grupos, BPA50 y BPA0.5, observamos que el menor número de folículos en crecimiento está asociado a una disminución en la transición de folículo primordial a primario. Paralelamente, también pudimos observar una reducción de RA en los folículos primarios de las hembras tratadas con BPA50. Dado el rol estimulador de los andrógenos a través de su receptor en el reclutamiento inicial de folículos (Prizant y col., 2014), esta menor expresión de RA en los folículos primarios de BPA50 podría estar mediando la reducción de la transición de folículo primordial a primario. En contraste, en los animales de BPA0.5 se observó simultáneamente un incremento de RA en los folículos primordiales y una disminución de RA en los folículos primarios. En este caso podría ser este desbalance en la expresión del RA entre los estados primordial/primario lo que podría estar alterando la transición del estadio primordial a primario (Prizant y col., 2014).

En el presente capítulo, las crías nacidas de madres tratadas por vía oral a 50 o 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día de BPA durante el período perinatal mostraron un mayor número de cuerpos lúteos junto con mayores niveles de progesterona sérica a los 3 meses de edad. Estos resultados no concuerdan con los publicados recientemente, en los que no se observan efectos adversos en el ovario por la administración oral y perinatal de bajas dosis de BPA (2,5-8-25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pc/día), y encuentran una menor cantidad de cuerpos lúteos y de folículos antrales junto con la aparición de quistes ováricos sólo en las dos dosis más altas ensayadas (100.000 y 300.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pc/día). Sin embargo, existen diferencias en el esquema de administración del BPA que fue utilizado en este trabajo: desde el día 6 de gestación hasta el inicio del trabajo de parto, y luego sus crías fueron expuestas directamente por sonda desde el día 1 después del nacimiento hasta el DPN90 (Delclos y col., 2014). Si bien estas diferencias pueden explicar las divergencias observadas, en nuestro trabajo hemos tratado de diseñar y utilizar un esquema de administración más cercano a la exposición que una cría recibe en períodos críticos de su desarrollo como lo son la etapa prenatal y de lactancia.

El incremento observado en el número total de cuerpos lúteos es indicio de un aumento de la tasa de ovulación (Hu y col., 2004; Shiina y col., 2006; Walters y col., 2007). Para identificar posibles vías de acción, evaluamos la expresión de los receptores de esteroides sexuales y p27 por IHQ. La expresión ovárica de $\text{RE}\alpha$, $\text{RE}\beta$ y p27 se mantuvo sin cambios. En cambio, la expresión de RA se redujo significativamente en

los folículos preantrales y antrales de los ovarios de BPA50. Existe un consenso creciente sobre la necesidad de un equilibrio en la acción de los andrógenos para que la tasa de ovulación se mantenga en niveles fisiológicos (Prizant y col., 2014; Slomczynska y col., 2006). En este sentido, Ware y sus colegas mostraron que una dosis elevada de un antiandrógeno disminuye el número de ovulaciones, mientras que una dosis baja potencia significativamente la respuesta ovulatoria (Ware 1982). Teniendo en cuenta nuestros resultados, la disminución de RA que observamos principalmente en los folículos preantrales y antrales podría contribuir a un aumento de la tasa de ovulación de las hembras tratadas con BPA50. También observamos un aumento en el número de cuerpos lúteos en las hembras tratadas con BPA0.5, pero sin cambios en la expresión del RA en este caso. Sin embargo, encontramos una mayor expresión del receptor de FSH en los ovarios de las hembras del grupo BPA0.5. Esta alta expresión de FSHR podría traducirse en folículos con una mayor sensibilidad a FSH, conduciendo a un avance en la maduración folicular y poliovulación (Fabre y col., 2006). Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que el BPA puede afectar la ovulación a través de diferentes mecanismos de acuerdo con la dosis ensayada.

Otro de los resultados correspondientes a este capítulo fue un incremento de los niveles de progesterona sérica en respuesta a ambas dosis de BPA. También en este caso, se encuentran varios trabajos previos que demuestran que BPA es capaz de afectar la síntesis de esteroides. Sin embargo, tal como se desprende del análisis de la literatura, los efectos del BPA en la esteroidogénesis gonadal son variables y dependen del período de exposición y las dosis ensayadas (Mlynarcikova y col., 2014). Varios estudios que utilizaron ratas expuestas *in útero* (Kobayashi y col., 2012), o ratas y corderas expuestas en período neonatal (Rivera y col., 2011; Varayoud y col., 2011) no demostraron efectos de BPA en la esteroidogénesis. Por el contrario, BPA disminuyó los niveles de progesterona en ratones durante la preñez temprana (Berger y col., 2008) e inhibió la disminución fisiológica de progesterona en el día 21 de gestación en comparación con el día 18 de gestación (Kass y col., 2012). En un estudio *in vitro* con células porcinas de la granulosa, BPA causó tanto un aumento como una disminución en la producción de progesterona basal inducida por FSH dependiendo de la dosis dada (Mlynarcikova y col., 2005). Por otra parte, la exposición a BPA resultó en un mayor nivel de expresión de la aromataasa (Cyp19) y de la síntesis de estrógeno en crías hembras (Xi y col., 2011). Nuestros resultados en este capítulo muestran que los

cambios en los niveles séricos de progesterona estuvieron acompañados por cambios en los niveles de ARNm de la enzima Hsd3b, sin cambios significativos para las enzimas Cyp19, Cyp11 y Cyp17. Este incremento de Hsd3b, junto con el mayor número de CL que observamos simultáneamente en los ovarios de DPN90, podría explicar el incremento de los niveles séricos de progesterona observados en las ratas tratadas con BPA.

En concordancia con Nah y colegas, encontramos una reducción en el peso de los ovarios en los animales expuestos a ambas dosis de BPA. Sin embargo, a diferencia de estos autores, no observamos cambios en la regularidad del ciclo estral. Esta discrepancia puede deberse a varias diferencias en el diseño experimental (Nah y col., 2011). Además, como se ha subrayado anteriormente, la ciclicidad ovárica y la fertilidad no están siempre comprometidas por las acciones de los perturbadores, lo que apunta a una notable capacidad de recuperación del eje reproductivo cuando éste es afectado por compuestos estrogénicos exógenos (Malcolm y col., 2006).

En resumen, ratas hembras nacidas de madres tratadas perinatalmente con BPA por vía oral exhiben un mayor número de CL con foliculogénesis defectuosa, incremento en los niveles de progesterona y expresión alterada de RA y FSHR. En conjunto, nuestros resultados son una nueva evidencia de que BPA es capaz de afectar los estadios tempranos del desarrollo ovárico con consecuencias funcionales en la edad adulta.

III- CAPÍTULO 2

EFFECTOS DEL BPA SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA AL TRATAMIENTO CON GONADOTROFINAS EXÓGENAS EN RATAS

*La primera y la mejor de las victorias es la conquista
de uno mismo.*

Platón

2.1 INTRODUCCIÓN

Como hemos detallado en los capítulos anteriores, el estudio de la exposición oral al BPA en el período perinatal y sus efectos en la funcionalidad del ovario en la edad adulta ha ganado un especial interés en los últimos años. Con los resultados obtenidos en la primera etapa de esta tesis y detallados en el capítulo 1 pudimos observar que las hembras nacidas de madres tratadas con BPA por vía oral en un período perinatal, presentan alteraciones en diversos parámetros en la foliculogénesis y la esteroidogénesis en su vida adulta. A la luz de estos resultados, decidimos profundizar el estudio de los efectos provocados por la exposición al BPA durante el período perinatal en la funcionalidad ovárica, utilizando otro modelo reconocido para el estudio de la perturbación endocrina.

Varios modelos han sido utilizados para estudiar la perturbación endocrina de la función ovárica en roedores, primates y otras especies. El modelo más utilizado es la exposición aguda o crónica a un PE acoplada al análisis del ciclo estral mediante extendidos vaginales en ratas (Crisp y col., 1998). Los extendidos vaginales son realizados diariamente en ratas o ratones durante un período de 14-21 días para determinar la regularidad del ciclo estral. Luego de establecer tres o más ciclos regulares de 4-5 días, el PE en estudio es administrado al animal por la vía seleccionada y se continúa con la evaluación de la regularidad del ciclo estral. Una perturbación en el ciclo es detectada mediante el análisis del número de ciclos antes y después del tratamiento, junto con otros parámetros útiles tales como el número de días en proestro, estro y diestro (Terranova P 2005).

Otro modelo ampliamente utilizado es el animal prepuberal tratado con gonadotrofinas exógenas (Petroff y col., 2000; Petroff y col., 2001; Sekiguchi y col., 2003). La rata inmadura de 25 días de edad exhibe una gran población de folículos pequeños en su ovario, pero está desprovisto de cuerpos lúteos. La primera ovulación espontánea no se produce hasta los 35 días de edad aproximadamente. En el día 25-30 de edad, a los animales se les administra gonadotropina coriónica equina (eCG), conocida más comúnmente como PMSG (pregnantmare's serum gonadotropin). PMSG es una glicoproteína con predominante actividad folículo estimulante (símil FSH), para inducir el desarrollo sincronizado de un grupo de folículos en crecimiento que alcanzarán la

etapa preovulatoria aproximadamente 48 horas más tarde. A las 52 horas después de la administración de PMSG, se administra gonadotropina coriónica humana (hCG) para simular un aumento de LH e inducir la ruptura folicular (ovulación) aproximadamente 12 horas después de la inyección. A la mañana siguiente de la ovulación (72 horas después de PMSG/20hs después de hCG), se evalúa el número de cuerpos lúteos y de ovocitos presentes en ovarios y oviductos, respectivamente. Además, se miden las hormonas ováricas pertinentes, tales como la P4, E2, LH y FSH. Por lo general, los niveles de hormonas en suero exhiben respuestas dependientes de la dosis de exposición cuando se administran los PE (Gao y col., 2002; Gao y col., 2000). De esta manera, este modelo animal permite la detección de disfunciones en el desarrollo de los folículos en crecimiento que llegarán a la etapa pre-ovulatoria, en el número de cuerpos lúteos y en los niveles de las hormonas ováricas. Además, el uso de este procedimiento sin duda simplifica y reduce el tiempo que consumen los experimentos de rutina diseñados para investigar la toxicidad reproductiva femenina (como la evaluación del ciclo estral, ovocitos espontáneamente ovulados, etc) y permite dilucidar los mecanismos de las sustancias tóxicas que perjudican el sistema reproductor femenino (Sekiguchi y col., 2003).

Otros tratamientos incluyen (1) el tratamiento de hembras preñadas con PE durante la última mitad de la preñez (Theobald y Peterson 1997), (2) tratamiento agudo o crónico de crías de roedores neonatales (Hendry y col., 2002) y (3) tratamiento crónico de ratones y ratas adultas (Hoyer y col., 2001).

Teniendo en cuenta los modelos detallados arriba, y nuestros resultados del capítulo 1, nos propusimos estudiar la respuesta ovárica a un tratamiento con gonadotropinas exógenas, en ratas inmaduras, nacidas de madres tratadas con BPA por vía oral durante el período perinatal.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Diseño experimental

La exposición a BPA se realizó de la misma manera en que se describió en el capítulo 1 sección 1.2.3, y que se esquematiza en la Figura 2.1. En base al resultado de dinámica

folicular, en esta etapa utilizamos sólo la dosis correspondiente a la dosis segura de BPA, es decir BPA50 (Ver Anexo). Hembras de 90 días de edad preñadas (F0), fueron expuestas a BPA50 y al vehículo en el agua de bebida, desde el DG9 hasta el destete de las crías en DPN21. Entre 5-6 madres F0 fueron incluidas en cada grupo. Después del parto, las crías F1 se pesaron y sexaron de acuerdo a la distancia anogenital y ocho crías por camada (preferiblemente se dejaron 5 hembras y 3 machos manteniendo un número de 8 crías totales por camada) se quedaron con las madres lactantes F0 hasta el DPN21. Al destete, las crías hembras F1 se transfirieron a un ambiente libre de BPA hasta el DPN30.

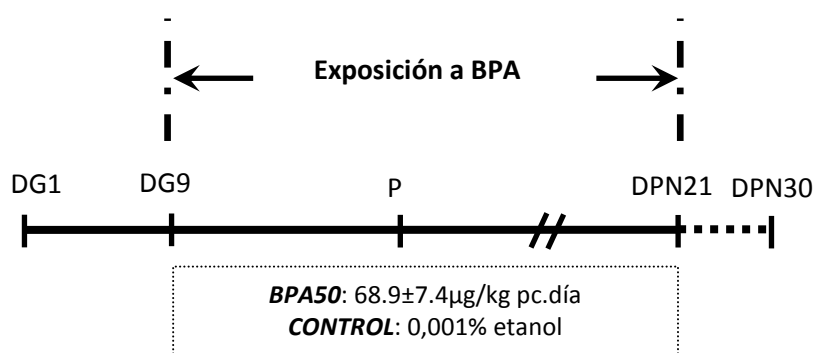


Figura 2.1. Exposición perinatal a BPA y vehículo. En el momento del parto dejaron 8 crías F0 por cada madre F1, priorizando las hembras sobre los machos. DG1-DG9, día 1-9 de gestación. P, parto. DPN21-30, día post natal 21-30. pc: peso corporal.

En DPN30 los machos se destinaron a otros experimentos y las hembras F1 fueron asignadas al estudio del estado ovárico basal (grupo de hembras de DPN30 que no recibió tratamiento con gonadotropinas) o al tratamiento con gonadotropinas exógenas. La distribución de las hembras se realizó de tal manera de no utilizar hermanas en un mismo grupo.

El tratamiento con gonadotropinas consistió en inyecciones sucesivas de PMSG seguida de una única inyección de hCG: las hembras F1 recibieron una inyección subcutánea (s.c.) de 10 UI de PMSG (Ecegon®. Biogénesis Bagó SA Buenos Aires. Argentina) cada 24 hs, durante 3 días consecutivos (DPN30, 31 y 32). Luego de la dosificación con PMSG, se les administró una inyección intraperitoneal (i.p.) con 25 UI/ml de hCG

(Ovusyn, Syntex. Buenos Aires. Argentina), 24 horas después de la última inyección de PMSG (DPN33) (Figura 2.2).

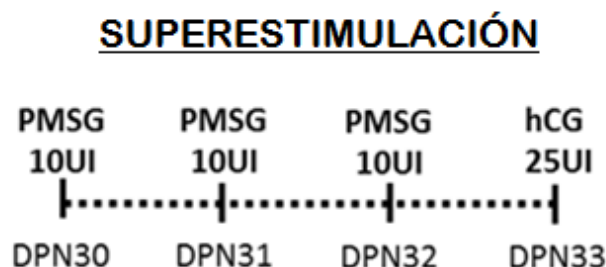


Figura 2.2. Tratamiento con gonadotrofinas o tratamiento superovulatorio en las crías hembras nacidas de madres expuestas a BPA y vehículo. Se realizaron 3 inyecciones sucesivas de PMSG seguida de una única inyección de hCG. DPN30, 31,32 y 33: día post natal 30, 31, 32 y 33.

2.2.2 Toma de muestras

Las muestras fueron obtenidas de tal manera de evaluar la respuesta ovárica a PMSG y a hCG por separado, siguiendo el esquema en la Figura 2.3.

- **PMSG:** para evaluar el estado ovárico luego del tratamiento con PMSG, a un grupo de hembras se le extrajeron los ovarios en DPN33, 24 horas después de la última inyección con PMSG. Un ovario fue destinado para estudios histológicos, y el otro fue almacenado a -80°C para la extracción de ARN y posteriores estudios de expresión génica por RT-PCR. En el mismo momento también se extrajo sangre y el suero se almacenó a -20°C (Figura 2.3).
- **PMSG+hCG 7, 14 y 22hs:** para evaluar la respuesta ovárica a la hCG, a otro grupo de hembras se le extrajeron los ovarios a las 7, 14 y 22 horas posteriores a la inyección de hCG. Un ovario fue asignado para histología y el otro se almacenó a -80°C para la extracción de ARN y posteriores estudios de expresión génica por RT-PCR. En paralelo también se obtuvo sangre en los mismos momentos, se separó el suero y se almacenó a -20°C hasta el momento en que se realizó la determinación de los niveles de hormonas esteroideas sexuales (Figura 2.3).

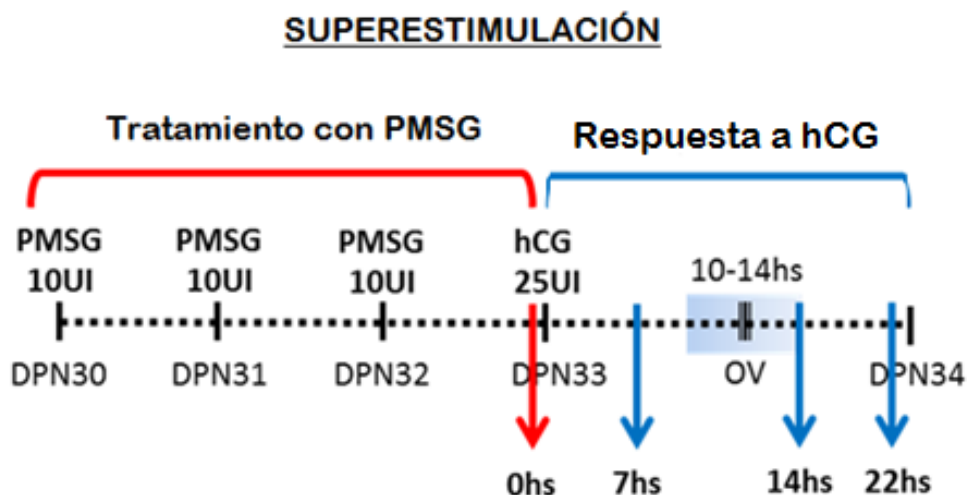


Figura 2.3. Tratamiento de superestimulación con PMSG y hCG. El tratamiento con PMSG consistió en 3 inyecciones s.c. consecutivas desde el DPN30 al DPN32, obteniéndose las muestras en DPN33 (0hs). La respuesta a hCG se evaluó luego del tratamiento con PMSG y hCG, el cual consistió en 3 inyecciones subcutáneas de PMSG y una inyección i.p. de hCG en DPN33, las muestras se obtuvieron a las 7, 14 y 22 hs luego de la inyección con hCG. OV, ovulación.

2.2.3 Análisis histológico

La dinámica folicular se evaluó siguiendo los protocolos descritos anteriormente en el capítulo 1. Los ovarios se fijaron en 10% de formol buffer durante 24 hs a temperatura ambiente. Se le realizaron dos lavados con PBS durante 10 minutos y se almacenaron en alcohol 70% hasta el procesado histológico. El procesado de los tejidos se realizó por deshidratación con distintas graduaciones de alcoholes (96° y 100°) y pasajes por xilol, luego se embebieron en parafina. Todo el ovario se seccionó en cortes numerados y seriados de 5 µm de espesor, y un corte de cada diez se tiñó con P-H para su observación morfológica (intervalo de 50 µm entre las secciones evaluadas, ver figura 1.2, capítulo 1).

Después de un estudio piloto llegamos a la conclusión de que el número de folículos en cada estadio folicular obtenido a partir de la evaluación de dos o tres cortes transversales grandes fueron similares a los valores recogidos en todos los cortes del ovario completo comparado con la metodología utilizada en el capítulo 1. Esta conclusión concuerda con los análisis de otros autores (Kezele y Skinner 2003; Parrott y Skinner 1999). Por lo tanto, el número de folículos en cada estadio folicular fue

evaluado en al menos tres cortes transversales de mayor diámetro. Para evitar contar el mismo folículo varias veces se tomó como referencia el núcleo del ovocito, y se contaron aquellos folículos en los cuales se podía ver el núcleo. Los folículos fueron clasificados como primordiales, primarios (incluyendo primarios tempranos), de transición o preantrales, antrales pequeños y antrales grandes, siguiendo los criterios morfológicos descritos anteriormente (Kezele y Skinner 2003; Oktay y col., 1995). La atresia folicular se evaluó como se describió anteriormente en el capítulo 1 sección 1.2.5 (Hirshfield y Midgley 1978).

Los CL se contaron de igual manera que en el capítulo 1, se evaluaron 3 cortes (secciones) separados por 1000 μm entre sí, y los resultados se expresaron como número de CL/sección. También se midió el diámetro mayor de los CL en esos 3 cortes y los resultados se expresaron como el tamaño promedio de CL/sección.

2.2.4 Conteo de ovocitos ovulados

2.2.4.1 Elección del momento óptimo para el conteo de ovocitos ovulados

Se realizó la superovulación de animales prepuberales de DPN30, tal como se describió en la figura 2.3. En el momento en que se realizó la extracción de los ovarios a las 14 y 22 hs post hCG, también se separó la ampolla oviductal para extraer la masa del cúmulo de ovocitos (Figura 2.4A). El cumulo se incubó en DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium)/F12 (Invitrogen), con 0,3% de hialuronidasa (Sigma) durante 30 minutos a 37°C (Figura 2.4B), y luego se contaron los ovocitos en microscopio invertido (Figura 2.4C).

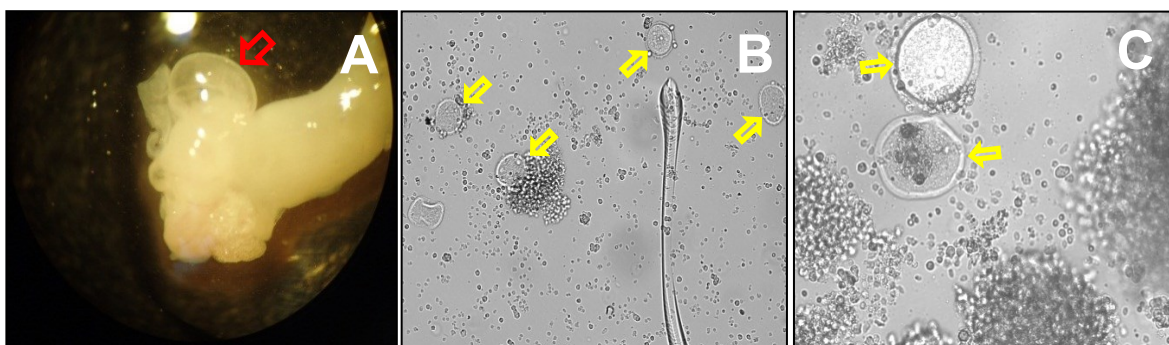


Figura 2.4. Número de ovocitos ovulados. A) Ampolla oviductal luego de la disección del ovario a las 22 hs post-hCG (Flecha roja. Lupa 2X). B) Luego de la ruptura de la ampolla la masa de ovocitos se incubó con hialuronidasa 30 min a 37°C (flechas amarillas, 20X). C) Ovocito desnudo (flechas amarillas, 40x).

En primer lugar, nos propusimos determinar el momento óptimo para medir la tasa de ovulación por superestimulación. Sabiendo que la ovulación en roedores ocurre entre las 10 y las 14 hs luego del pico de LH (Robker y col., 2000; Terranova P 2005), en el experimento de superestimulación se contaron los ovocitos a las 14 y a las 22 hs posteriores a la inyección de hCG en animales controles (aquellos expuestos a vehículo). Pudimos observar un mayor número de ovocitos ovulados junto con una menor dispersión de los datos a las 22 hs posteriores a la inyección de hCG, con respecto a 14 hs. Por lo tanto, se eligió 22 hs post-hCG como el momento óptimo para evaluar la tasa de ovulación (Figura 2.11).

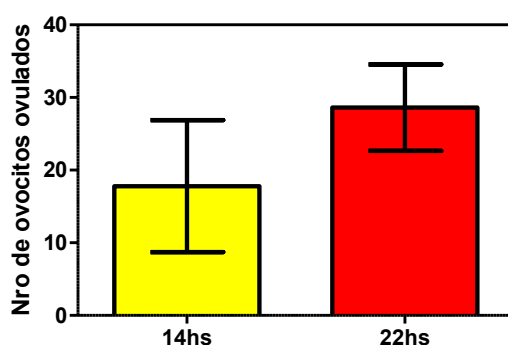


Figura 2.11. Evaluación del momento óptimo para el conteo de los ovocitos ovulados. El mayor número de ovocitos ovulados se obtiene a las 22 hs post hCG, mientras que a las 14 hs el número es menor y con mayor dispersión. Los datos fueron expresados como la media±SEM.

2.2.5 Ensayos hormonales

Los niveles séricos de E2, P4 y T se determinaron mediante el uso de kits comerciales de RIA, siguiendo las instrucciones del fabricante (DSL-4800, BeckmanCoulter Ultra-Sensible Estradiol RIA, INMUNOTECH.; IM1188, BeckmanCoulter RIA Pregesterone, INMUNOTECH; IM1119, BeckmanCoulter RIA Testosterone, direct, INMUNOTECH). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

El ensayo de E2 utiliza antisuero de conejo anti-estradiol y E2 marcado con yodo 125 (^{125}I). El antisuero usado cruza un 2,3% con estrona, 0,62% con estriol, un 0,22% con 17β -estradiol, 2,58% con 17β -estradiol-3-glucurónido, 0,15% con estradiol-3-sulfato, y 3,2% con D-equilenina. El suero de cabra anti-gama globulina de conejo con polietilenglicol se utiliza como reactivo precipitante del segundo anticuerpo. La

sensibilidad del ensayo fue de 2,2 pg/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron del 8,5% y 12,7%, respectivamente.

El ensayo de P4 utiliza tubos recubiertos con anticuerpos anti-progesterona y progesterona marcada con ^{125}I . El antisuero usado cruza un 15,01% con 5 α -pregnanediona, 8,13% con 5 β -pregnanediona, 5,1% con 6 β -hidroxiprogesterona, 4,05% costicosterona, 2,53% con 11-desoxycosticosterona y 1,14% 17 α -hidroxiprogesterona. La sensibilidad del ensayo fue de 0,03 ng/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron del 8,14% y 8,66 %, respectivamente.

Para Testosterona se utilizaron tubos recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-testosterona y trazador de testosterona marcada con ^{125}I . El anticuerpo utilizado cruza en un 10% con 5 α -dihydrotestosterona, 2% con 11 β -hydroxytestosterona, 5% 19-nortestosterona y 2% con methyltestosterona. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron del 5,6 %y 15%, respectivamente.

Los niveles séricos de FSH y LH fueron determinados por el instituto IBYME-CONICET (Instituto de Biología y Medicina Experimental).

2.2.6 Expresión proteica de los receptores esteroideos por IHQ

Se evaluó por IHQ la expresión del RE β , RA y RP en las células de la granulosa de los folículos antrales. La expresión de RE β y de RA se cuantificó por medición de DOI, tal como se describió en el capítulo 1 sección 1.2.6, y los valores se promediaron por cada animal y por grupo experimental. El pico de expresión del RP ocurre entre las 4-8 hs después del pico de LH y luego declina hasta valores indetectables, los cuales se mantienen a través del resto del período ovulatorio (Robker y col., 2000). Por ello, la expresión del RP se evaluó en los ovarios obtenidos a las 7 hs luego del tratamiento superovulatorio con PMSG+hCG, identificándose 3 categorías de folículos: folículos antrales con baja, intermedia y alta expresión de la proteína del RP, y se contó el número de folículos para cada categoría. Las diluciones utilizadas para cada ensayo se muestran en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Anticuerpos usados en los ensayos de IHQ.

Proteína	Proveedor	Anticuerpo	Origen	Dilución
RE β	Zymed	ER-Z8P	Conejo	1:200
RA	Santa Cruz Biotechnology	AR(N-20)sc-815	Conejo	1:200
RP	DAKO-Corp	PR-A0098	Conejo	1:500

2.2.7 Expresión génica de las enzimas de la esteroidogénesis y de los receptores de gonadotrofinas por RT-PCR en tiempo real

Se evaluaron las enzimas de la esteroidogénesis Cyp11, Cyp17, Cyp19, y los receptores de gonadotrofinas FSHR y LHR, tal como se describió anteriormente en el capítulo 1 sección 1.2.7.

2.2.8 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Se realizó un Test *t* de Student No Pareado de dos colas para comparar cada grupo experimental con el grupo control. El número de animales por grupo fue de al menos 5. En todos los casos, los valores con $p < 0,05$ fueron aceptados como significativos. Los valores atípicos se identificaron y se analizaron mediante un programa online, GraphPadsoftware (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). Este programa realiza la prueba de Grubbs, , para determinar si uno de los valores de la lista de entrada es un valor atípico significativo del resto (Terranova P 2005).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Estado gonadotrófico basal

Con el fin de conocer el estado hormonal previo al tratamiento con gonadotrofinas exógenas, se midieron los niveles séricos de LH y FSH en DPN30. Los niveles de LH y FSH no fueron diferentes entre el control y los animales tratados (Figura 2.5), previo al tratamiento de superestimulación con PMSG y hCG.

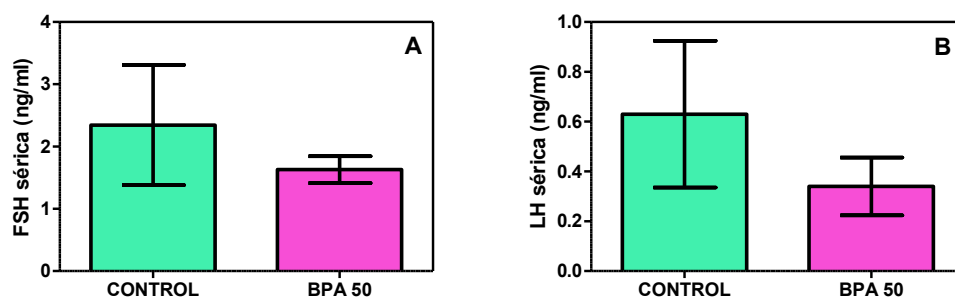


Figura 2.5. Niveles de gonadotropinas séricas de ratas hembras prepuberales nacidas de madres expuestas a vehículo y a BPA. Se calcularon los niveles de FSH (A) y LH (B) como se describe en M & M. Los datos se expresaron como la media \pm SEM.

2.3.2 Estado ovárico luego del tratamiento exógeno con PMSG

Se evaluó la respuesta ovárica a PMSG mediante el análisis de: **a)** la dinámica folicular, **b)** la expresión de RE β y RA, **c)** la expresión de las enzimas esteroidogénicas y de receptores de gonadotropinas, y **d)** los niveles hormonales circulantes.

2.3.2.a *La exposición perinatal a BPA condiciona la respuesta folicular ovárica a PMSG*

La Figura 2.6 muestra el número de folículos primordiales y en crecimiento (primarios, preantrales y antrales) en el grupo control o tratado con BPA. Se observó un aumento en la población de folículos en crecimiento en BPA50, específicamente en la población de folículos antrales (Figura 2.6A). Este aumento en el número de folículos antrales fue a expensas de un aumento significativo en la subpoblación de folículos antrales chicos, sin observarse cambios en los antrales grandes (Figura 2.6B). Tampoco encontramos diferencia estadísticamente significativa en el número de folículos atrésicos (Figura 2.6B). Tomados en conjunto, observamos que aquellas hembras que estuvieron expuestas a BPA en su etapa perinatal, exhiben mayor desarrollo folicular en estadio antral al finalizar el tratamiento con PMSG.

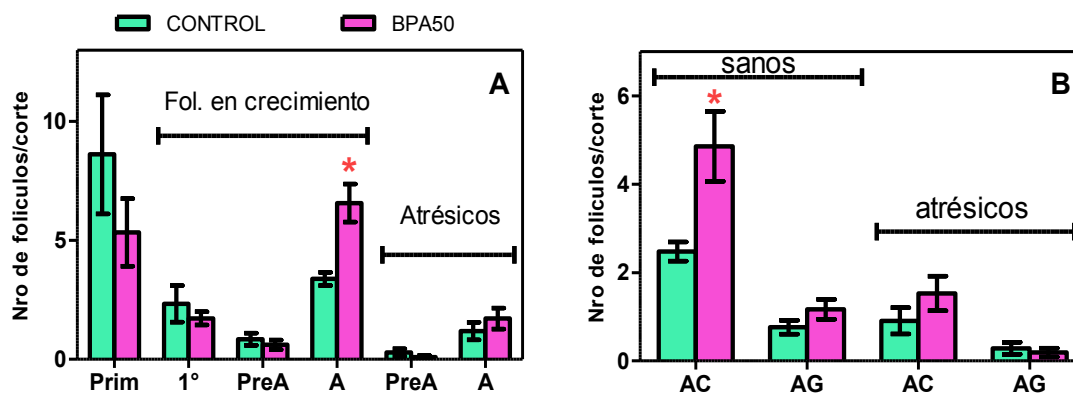


Figura 2.6. La exposición a BPA altera la respuesta folicular ovárica a PMSG. El análisis estadístico de los folículos en crecimiento muestra un incremento en el número de folículos antrales (A), y este incremento es promovido por un incremento en el número de folículos antrales chicos (B). Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. Significancia estadística: * $p < 0.05$ vs control. Prim, folículo primordial; 1°, folículo primario; PreA, folículo preantral; A, folículo antral; AC, folículo antral chico; AG, folículo antral grande.

2.3.2.b Expresión de receptores hormonales: RE β y RA

Para evaluar las posibles vías de acción del BPA, se evaluó la expresión de las proteínas RA y RE β en la población de folículos antrales por IHQ. Normalmente, RE β y RA se encuentran predominantemente en las células de la granulosa de folículos en crecimiento y su expresión aumenta gradualmente, alcanzando los niveles más altos en folículos antrales. Este patrón de distribución no fue alterado por la exposición a BPA, siendo similar al del grupo control. En cambio, observamos que los folículos antrales de aquellas hembras que estuvieron expuestas a BPA en su etapa perinatal expresaron mayores niveles de RA y RE β en respuesta al estímulo con PMSG (Figura 2.7).

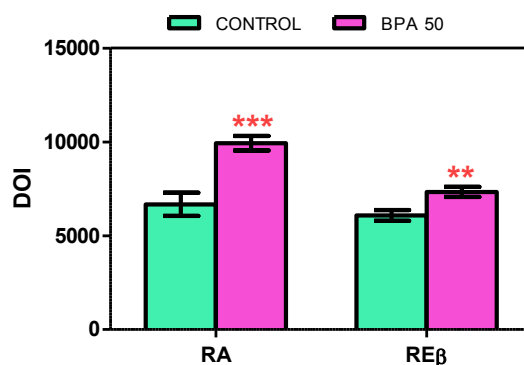


Figura 2.7. Expresión de la proteína de los receptores RE β y RA en la población de folículos antrales luego del tratamiento con PMSG. Cuantificación por IHQ realizada en

imágenes digitalizadas de todos los campos del tejido en cada sección. Las imágenes fueron convertidas a escala de grises y se calculó la DOI, expresada en unidades arbitrarias, en las células de la granulosa de los folículos antrales. Los resultados se expresan como la media±SEM. Significancia estadística: **p<0,001 ***p<0,0001 vs control.

2.3.2.c Expresión de las enzimas de la esteroidogénesis y los receptores de gonadotrofinas

Mediante RT-PCR en tiempo real, se cuantificaron los niveles de expresión de las enzimas esteroidogénicas y de los receptores de gonadotrofinas ováricos. Luego del estímulo con PMSG, los ovarios de aquellas hembras que estuvieron expuestas a BPA50 en su etapa perinatal mostraron niveles de ARNm de Cyp17, Cyp19, FSHR y LHR notablemente mayores que los del control (Figura 2.8).

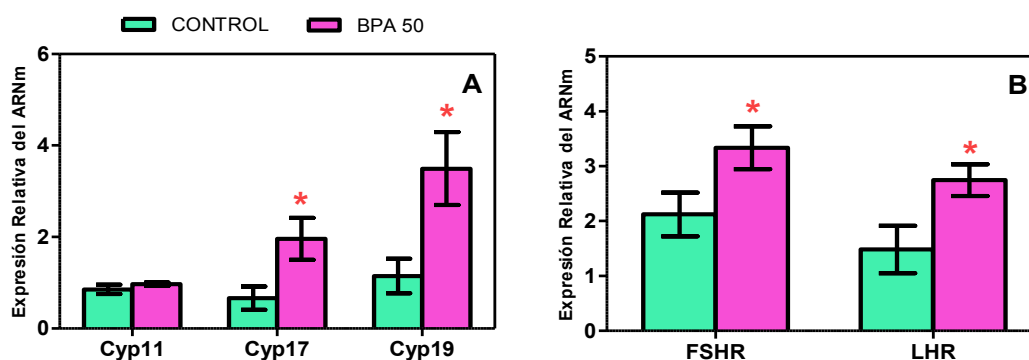


Figura 2.8. Niveles de ARNm de las enzimas esteroidogénicas y los receptores de gonadotrofinas luego del tratamiento con PMSG. Los valores se determinaron por el método de la Curva Estándar Relativa, tal como se detalla en M&M, utilizándose L19 como *housekeeping* (L19). Los resultados se expresaron como la media±SEM. Significancia estadística: *p<0.05 vs control. Cyp11, citocromo P450scc; Cyp17, 17a-hidroxilasa; Cyp19, aromatasas; FSHR, receptor de la hormona folículo estimulante; LHR, receptor de la hormona luteinizante.

2.3.2.d Niveles de hormonas esteroides circulantes

Para establecer si los cambios encontrados en la foliculogénesis y en la expresión del ARNm de las enzimas esteroidogénicas se correlacionan con los niveles circulantes de hormonas esteroides sexuales, se midió la concentración sérica de E2, P4 y T. Los

niveles de E2, P4 y T no mostraron diferencia en ningún caso entre el control y los animales tratados con BPA, al finalizar el tratamiento con PMSG (Figura 2.9).

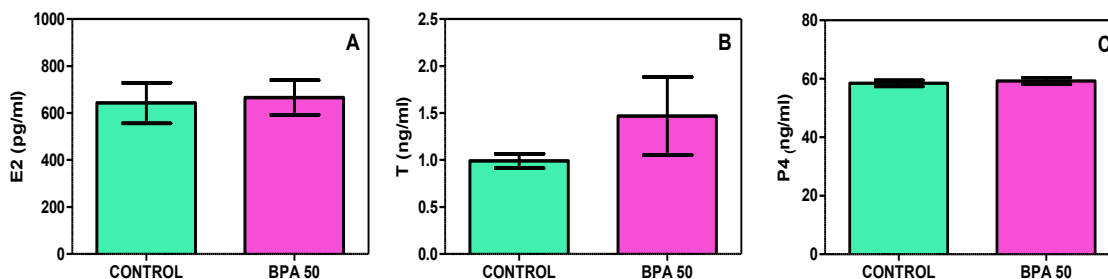


Figura 2.9. Niveles séricos de E2, P4 y T después del tratamiento con PMSG. Se determinaron los niveles de esteroides sexuales de E2 (A), T (B) y P4 (C) como se describe en M&M. Los resultados se expresan como la media±SEM.

2.3.3 Respuesta ovárica al tratamiento exógeno con PMSG+hCG

Se evaluó la respuesta a PMSG+hCG mediante el estudio de: **a)** la dinámica folicular en estadios preantral y antral, **b)** la tasa de ovulación, **c)** la expresión de las enzimas de la esteroidogénesis y los receptores de gonadotropina, **d)** los niveles hormonales circulantes, y **e)** la expresión del RP. La evaluación de estas respuestas se realizó en distintos momentos, como se explica más adelante en cada caso. Excepto cuando se aclara específicamente, todas estas variables fueron analizadas a las 22 hs posteriores a la inyección de hCG.

2.3.3.a Dinámica folicular

La figura 2.10 muestra el número de folículos preantrales y antrales en el grupo control y BPA50, observándose un aumento en el número de folículos antrales chicos atrésicos en BPA50 (Figura 2.10B). Tomados en conjunto, observamos que en aquellas hembras que estuvieron expuestas a BPA50 en su etapa perinatal, la inyección de hCG desencadena la atresia de un mayor número de folículos antrales chicos.

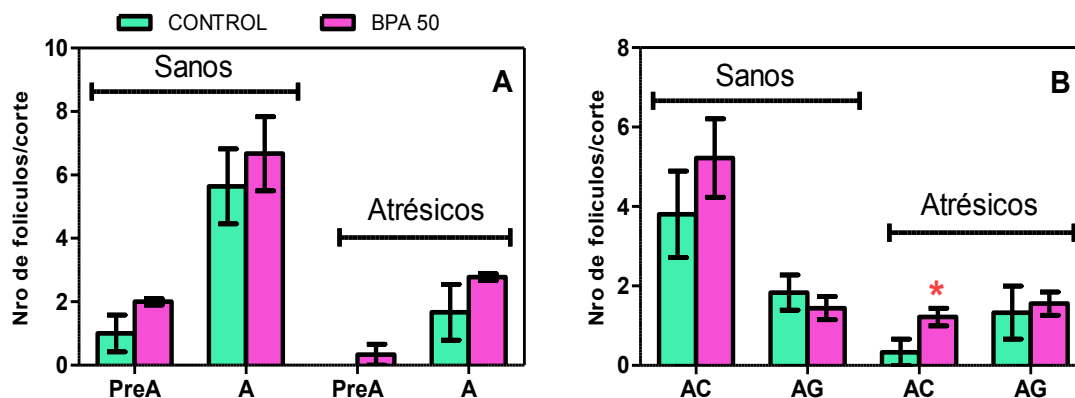


Figura 2.10. Dinámica folicular de los estadios preantral y antral después del tratamiento con PMSG+hCG. La foliculogénesis se evaluó en las etapas preantral y antral (A) distinguiéndolos en grandes y chicos para el estadio antral, y a su vez en sanos y atrésicos en ambos casos (B). Se calcularon los números de folículos preantrales (PreA), antrales (A), antrales chicos (AC) y antrales grandes (AG) como se describe en M&M. Los resultados se expresaron como la media±SEM. Significancia estadística: *p<0.05 vs control.

2.3.3.b Tasa de ovulación

El número de ovocitos ovulados y de CL en respuesta a hCG no mostró cambios entre los animales controles y aquellos expuestos a BPA50 (Figura 2.12A y B, respectivamente). Por otro lado, los ovarios de BPA50 exhibieron CL más pequeños en comparación con los del grupo control (Figura 2.12C).

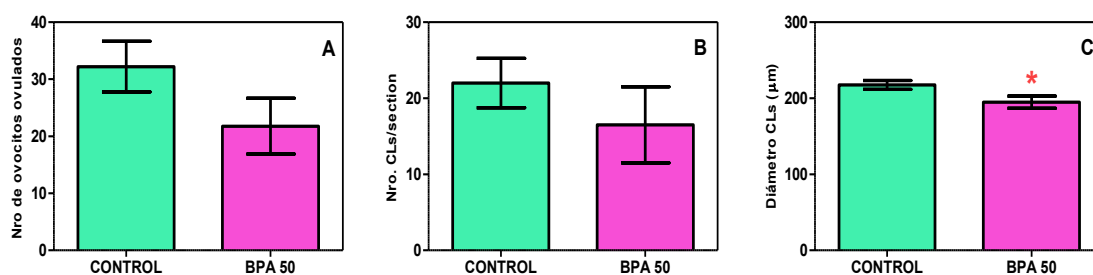


Figura 2.12. Tasa de ovulación y número de CL a las 22 hs luego del tratamiento con hCG.

Para estudiar la respuesta ovárica a las gonadotrofinas, ratas hembras expuestas a BPA o vehículo, fueron inyectados con PMSG y luego con hCG, extrayéndose los ovarios a las 22hs post-hCG. Se evaluó el número de ovocitos ovulados (A), número de CL (B) y tamaño de CL (C). Los resultados se expresan como la media±SEM. Significancia estadística: * p <0,05 vs control.

Para evaluar si la ovulación ocurre en un momento previo al evaluado debido al tratamiento con BPA se contaron los ovocitos ovulados a las 14 y a las 22 hs post hCG (Figura 2.13)

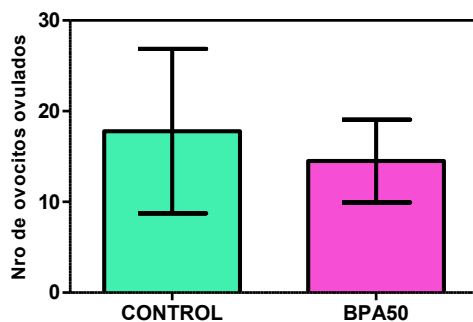


Figura 2.13. Número de ovocitos ovulados a las 14 hs post hCG. Como podemos observar en la gráfica el tratamiento con BPA no alteró la ovulación en respuesta a hCG. Los resultados se expresan como la media±SEM.

2.3.3.c Expresión de las enzimas de la esteroidogénesis y los receptores de gonadotrofinas

Mediante RT-PCR se realizó la cuantificación de los niveles de ARNm de las enzimas Cyp11, Cyp17 y Cyp19, y de los receptores de FSH y LH (FSHR y LHR).

Como muestra la Figura 2.14, los niveles de ARNm evaluados no mostraron cambios en ningún caso.

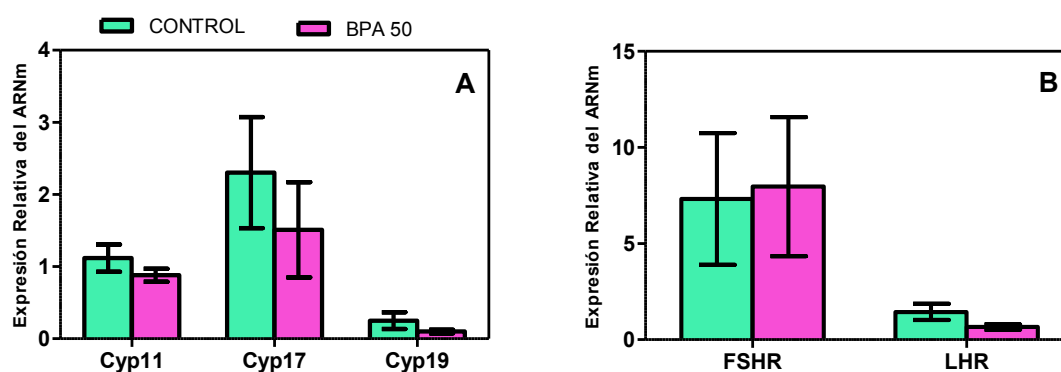


Figura 2.14. Niveles de ARNm de las enzimas esteroidogénicas y los receptores de gonadotrofinas en respuesta a PMSG+hCG. Los niveles de expresión fueron cuantificados mediante el uso de RT-PCR en tiempo real. Las muestras se normalizaron con la expresión de L19 y con los animales controles. Se calculó la expresión para cada gen target por el método de

curva estándar relativa. Los resultados se expresaron como la media±SEM. Cyp11, citocromo P450_{scc}; Cyp17, 17α-hidroxilasa; Cyp19, P450 aromatasas; FSHR, receptor de la hormona foliculo estimulante; LHR, receptor de la hormona luteinizante.

Al comparar los resultados de la expresión génica obtenidos al finalizar el tratamiento con PMSG (Figura 2.8) con los registrados a las 22 hs posteriores a la administración de hCG (Figura 2.14), nos preguntamos si los cambios observados luego del tratamiento con PMSG persistían en una etapa intermedia. Por ello, cuantificamos la expresión de los genes a las 7 hs después de la administración de hCG.

Pudimos observar que todos los genes ya habían normalizado su expresión en este momento a excepción de FSHR, que persistió elevada, al menos hasta este momento, en BPA 50 (Figura 2.15).

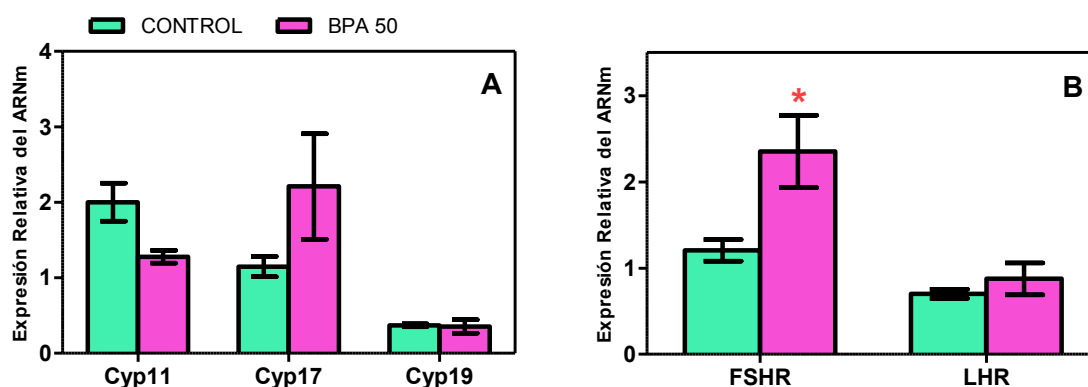


Figura 2.15. Niveles de ARNm de enzimas esteroidogénicas y receptores de gonadotrofinas a las 7 hs después de la inyección con hCG. Los niveles de expresión fueron cuantificados mediante el uso de RT-PCR en tiempo real. Las muestras se normalizaron con la expresión de L19 y con los animales controles. Se calculó la expresión para cada gen por el método de curva estándar relativa. Los resultados se expresaron como la media±SEM. Significancia estadística: * $p < 0,05$ vs control. Cyp11: citocromo P450_{scc}; Cyp17: 17α-hidroxilasa; Cyp19: P450 aromatasas; FSHR, receptor de la hormona foliculo estimulante; LHR, receptor de la hormona luteinizante.

2.3.3.d Niveles de hormonas esteroides circulantes

En cuanto a los niveles circulantes de hormonas esteroides sexuales, pudimos determinar un aumento en los niveles de E2 en BPA50 (C: $422,4 \pm 102,0$; BPA50:

599,8±8,237*), sin registrarse cambios de P4 y T (C: 0,5900±0,09198; BPA50:1,004±0,06577*. Figura 2.16).

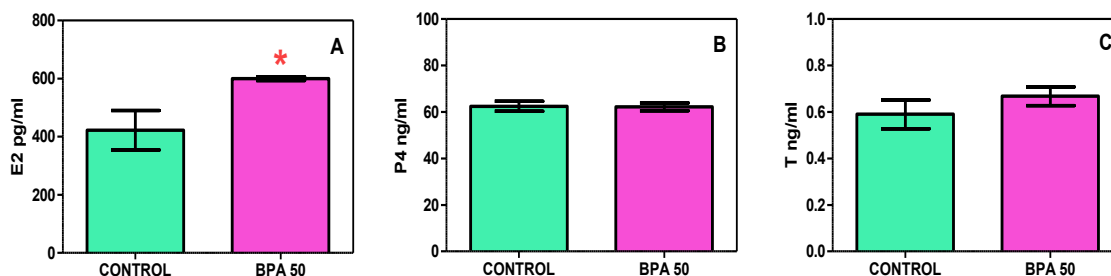


Figura 2.16. Concentración sérica de E2, P4 y T de ratas expuestas perinatalmente a BPA y tratadas con PMSG+hCG 22hs. Los resultados se expresan como la media±SEM.

Significancia estadística. *p<0,05 vs control.

2.3.3.e Expresión del RP

La expresión del RP se evaluó por IHQ en los ovarios obtenidos a las 7 hs luego del tratamiento superovulatorio con PMSG+hCG. Se identificaron y cuantificaron 3 categorías foliculares: folículos antrales con baja, intermedia y alta expresión de la proteína del RP. En respuesta a la inyección de hCG, encontramos un número menor de folículos con alta expresión de RP en BPA50 (Figura 2.17).

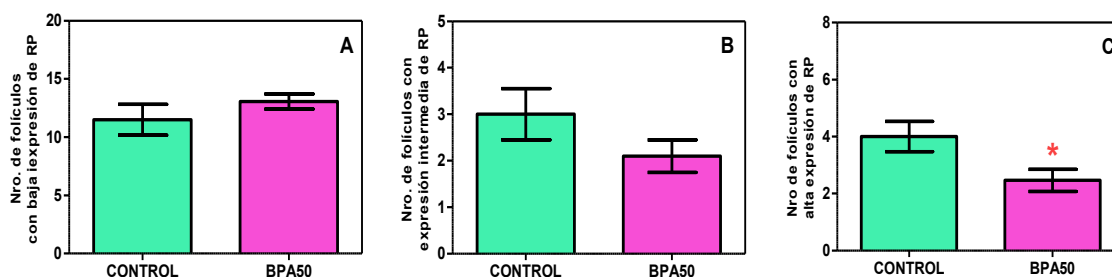


Figura 2.17. Expresión del RP en los folículos antrales en respuesta a PMSG+hCG. A)

Número de folículos con baja expresión de RP. B) Número de folículos con expresión intermedia de RP. C) Número de folículos con alta expresión de RP. Los resultados se expresan como la media±SEM. Significancia estadística: *p<0,05 vs control.

2.4 DISCUSIÓN

Para simplificar el análisis de los resultados discutiremos los mismos de forma separada, agrupándolos como estados ováricos posteriores al tratamiento con PMSG por un lado, y a hCG por el otro.

Los niveles séricos basales de FSH y LH, previos al tratamiento con PMSG, son similares a los hallados en el grupo control. Por lo tanto, consideramos que la exposición perinatal a BPA no afectó la secreción hipofisaria de las gonadotrofinas y partimos de valores normales previos al tratamiento con PMSG.

2.4.1 Tratamiento con PMSG

En roedores, desde el nacimiento, los folículos primordiales latentes son activados y reclutados dentro del pool de folículos en crecimiento de manera continua (reclutamiento inicial); luego progresan por los distintos estadios de maduración folicular con dos destinos posibles, la atresia folicular o el rescate de la misma por acción de la FSH (reclutamiento cíclico luego de la pubertad), para continuar creciendo hasta folículo pre-ovulatorio y su eventual ovulación. Esta acción pro-supervivencia de la FSH se hace manifiesta, por ejemplo en ratas, cuando se administra un antagonista de GnRH y reduce el número de folículos ováricos en crecimiento en la pubertad (Meijs-Roelofs y col., 1990), o también en ratones, cuando mediante el tratamiento con FSH se potencia la formación de folículos antrales (Boland y col., 1993). En nuestro caso, pudimos observar que el desarrollo folicular luego del tratamiento con PMSG fue mayor en los ovarios de las hembras que estuvieron expuestas a BPA50 durante el período perinatal. Este estímulo en la foliculogénesis se evidencia por un tamaño mayor de la población de folículos en crecimiento, compuesto principalmente por un incremento de la subpoblación de folículos antrales chicos.

Pensamos que este mayor desarrollo folicular podría explicarse por una mayor susceptibilidad a FSH de los folículos, promovida por la exposición previa a BPA. En este sentido, varios de los resultados hallados son indicios a favor de esta idea de una mayor susceptibilidad folicular a FSH. En primer lugar, uno de ellos es el mayor nivel de expresión del ARNm del receptor de FSH en los ovarios de BPA50. La expresión de FSHR ha sido señalada como indicador de mayor susceptibilidad a FSH (Fabre y col.,

2006). En segundo lugar, también ha sido establecido que una de las acciones de FSH mediada por su receptor es estimular la expresión de las enzimas de la esteroidogénesis para aumentar la síntesis de estradiol, así como también inducir la expresión de LHR en las células de la granulosa de los folículos antrales (Couse y col., 2005). Así, la expresión de las enzimas esteroidogénicas y de LHR son consideradas marcadores de diferenciación dependiente de FSH (Fabre y col., 2006). Tanto los niveles de ARNm de Cyp17 y Cyp19, como también de LHR, están aumentados en los ovarios de las hembras que estuvieron expuestas a BPA perinatalmente. Es necesario notar que, a pesar de que las expresiones de los niveles de ARNm de Cyp17 y Cyp19 están aumentadas, los niveles séricos de E2, P4 y T no se modificaron luego del tratamiento con PMSG.

Por último, otro indicio proviene de analizar la expresión de los receptores RA y RE β . Ambos muestran una mayor expresión luego del tratamiento con PMSG en los ovarios de aquellas hembras que estuvieron expuestas perinatalmente a BPA 50. Tanto RA como RE β modulan la respuesta de diferenciación de los folículos a la FSH. En cuanto a RA, diferentes autores han demostrado que los andrógenos a través de sus receptores incrementan la sensibilidad folicular a la acción de la FSH aumentando los niveles de FSHR, y contribuyendo con las acciones fisiológicas de FSH durante el desarrollo folicular temprano a través de la amplificación del cAMP intracelular (Hillier y Tetsuka 1997; Prizant y col., 2014). En cuanto a RE β , del estudio con ratones BERKO se pudo establecer que uno de los roles de RE β es amplificar y modular la respuesta de las células de la granulosa a la FSH (Couse y col., 2005).

Teniendo en cuenta los incrementos observados en el desarrollo folicular y la expresión de FSHR y LHR, de las enzimas esteroidogénicas Cyp17 y Cyp19, así como también de RA y RE β , pensamos que la exposición a BPA en etapas tempranas de la vida prenatal y postnatal causa una mayor susceptibilidad de los folículos ováricos a la acción de la FSH.

2.4.2 Tratamiento con PMSG+hCG

Tal como detallamos en el punto anterior, luego del tratamiento con PMSG el ovario de aquellas hembras que estuvieron expuestas a BPA en su etapa perinatal, exhibe un

mayor número de folículos antrales y una mayor expresión de LHR. Frente a este panorama, esperábamos encontrar un mayor número de ovocitos ovulados en respuesta a hCG a las 22 hs. Sin embargo la tasa de ovulación no presenta alteraciones, tal como se evidencia por los valores similares del número de ovocitos ovulados así como en el número de CL al comparar el grupo BPA 50 con el control.

Al observar que el tamaño de los CL fue menor en BPA 50, nos preguntamos si la ovulación en respuesta a la inyección de hCG podría estar ocurriendo anticipadamente. Sin embargo, cuando determinamos el número de ovocitos ovulados a las 14 hs post-hCG, encontramos un valor similar al del grupo control, por lo que la ovulación no estaría ocurriendo anticipadamente en las hembras de BPA50 con respecto al control.

Uno de los cambios más llamativos que encontramos fue un incremento significativo en el número de folículos antrales chicos atrésicos en respuesta a hCG. Es interesante notar que, previamente, luego del tratamiento con PMSG, ya se podía observar una tendencia a un aumento de la cantidad de folículos antrales chicos con signos de atresia (Figura 2.6). En el mismo sentido, recientemente se ha demostrado que la exposición perinatal a dosis bajas de BPA genera valores elevados de LH y mayor cantidad de folículos atrésicos en la etapa prepuberal (Gamez y col., 2015). Al comparar las gráficas de dinámica folicular obtenidas, podemos concluir que un porcentaje de la mayor población de folículos antrales chicos que encontramos luego del tratamiento con PMSG, ingresó en un proceso de atresia folicular en respuesta a hCG, reduciéndose de esta manera el número de ovocitos con posibilidad de ser ovulados.

Uno de los mecanismos por los cuales se induce la entrada de los folículos a la atresia son los altos niveles intracelulares de AMPc (Hillier y Tetsuka 1997). El AMPc intracelular es el mediador de las acciones de FSHR y LHR (Hillier 2001). Un efecto mediado por RA en las células de la granulosa es el estímulo de la formación de AMPc, posiblemente a través de la inhibición del catabolismo del AMPc (Hillier y de Zwart 1982). La expresión del RA en las células de la granulosa normalmente disminuye durante la maduración del folículo pre-ovulatorio. Ésta pérdida del RA en los estadios tardíos de desarrollo folicular forma parte de los mecanismos parácrinos que brindan

protección contra la luteinización prematura y la atresia (Hillier y Tetsuka 1997; Prizant y col., 2014).

Teniendo en cuenta la mayor expresión de RA, FSHR y LHR al momento de la inyección de hCG, y la persistencia de niveles elevados de FSHR incluso a las 7 hs post-hCG, podemos sugerir que el incremento de folículos atrésicos en respuesta a hCG podría estar mediado por altas concentraciones de AMPc.

Otra posible explicación para una menor respuesta ovulatoria a hCG en los animales previamente expuestos a BPA podría estar en los niveles de expresión de RP. En el ovario de rata, el ARNm del RP se induce rápida y brevemente por el pico de LH; esta inducción se produce selectivamente en células de la granulosa de los folículos pre-ovulatorios destinados a ovular (Park y Mayo 1991). La señalización del RP es necesaria para que la ovulación ocurra normalmente, ya que un antagonista del RP (RU486) bloquea la ovulación en ratas (van der Schoot y col., 1987) y ratones (Loutradis y col., 1991). En nuestro experimento encontramos un menor número de folículos con alta expresión de RP en respuesta a hCG, en los ovarios de BPA 50. Esta menor inducción de expresión de RP en respuesta a hCG en los animales previamente expuestos a BPA, podría contribuir también a una ovulación deficitaria.

Por último, observamos mayores niveles de estradiol en respuesta a hCG, sin modificaciones en las expresiones de las enzimas de la esteroidogénesis en el mismo momento. Sin embargo, teniendo en cuenta que los niveles hormonales se midieron en circulación periférica y no en el ovario, este aumento de E2 en respuesta a hCG podría ser consecuencia de los niveles aumentados de Cyp17 y Cyp19 que observamos al finalizar el tratamiento con PMSG.

El riesgo de infertilidad y una pobre respuesta ovárica a los tratamientos FIV (Fertilización *in vitro*) descritos en mujeres con altas concentraciones de BPA sugieren efectos en la calidad de los ovocitos y en la función ovárica (Caserta, 2011; Ehrlich, 2012; Rochester, 2013; Bloom, 2011; Caserta, 2013). Nuestros resultados muestran que la exposición perinatal a una dosis de BPA considerada como segura, condiciona la capacidad de respuesta del ovario a un tratamiento con gonadotrofinas exógenas.

IV- CAPÍTULO 3

ACCIÓN DEL BPA EN EL ENSAMBLADO FOLICULAR EN CULTIVOS DE OVARIOS ENTEROS

*Todos somos muy ignorantes.
Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas.*
Albert Einstein

3.1 INTRODUCCIÓN

Previamente, en la introducción, describimos el proceso de formación de la reserva de folículos primordiales (ver Introducción, sección I.4.1). Inmediatamente después del parto ocurre el ensamblado folicular, el cual comienza con la ruptura de los nidos de células germinales (*nest-breakdown*): un grupo de ovocitos mueren por apoptosis y los que sobreviven se rodean de células inmaduras de la granulosa formando los folículos primordiales (Kezele y Skinner 2003; Pepling 2006). En roedores, este proceso se completa en los primeros 4-5 días postnatales (Rajah y col., 1992). Debido a que los folículos primordiales no proliferan, esta población folicular representa el potencial reproductivo total de toda hembra.

Varias moléculas son capaces de afectar el proceso de *nest-breakdown*. La proteína del complejo sinaptonémico 1 (SCP-1) se expresa en los ovocitos. La expresión de SCP-1 disminuye drásticamente dentro de las 24 horas posteriores al parto. Cuando la expresión de SCP-1 es anulada, los ovocitos alcanzan el estadio de diploteno prematuramente y los nidos de células germinales adelantan su proceso de ruptura (Paredes y col., 2005). Otras proteínas como Foxl2 (Forkhead box L2), Nobox (Newborn oogenesis Homeobox) y miembros de la vía Notch también pueden afectar el patrón temporal del *nest-breakdown* (Trombly y col., 2009). Una mutación del gen Foxl2, que codifica un factor de transcripción expresado normalmente en las células de pre-granulosa, altera la formación de la membrana basal que rodea los folículos en formación y produce falla ovárica prematura en ratones y humanos (Crisponi y col., 2001; Uda y col., 2004). Nobox es un gen presente en los nidos de células germinales y en los ovocitos de los folículos primordiales y activados (Suzumori y col., 2002). En ratones *knockout* para Nobox, el proceso de *nest-breakdown* no se lleva a cabo y las células germinales quedan atrapadas en los nidos, los ovocitos se degeneran y no forman los folículos (Rajkovic y col., 2004). Varios componentes de la vía de señalización de Notch son expresados por las células germinales y las células de la pre-granulosa en los nidos. Cuando esta vía es suprimida en un sistema de cultivo de ovarios enteros, el *nest-breakdown* es atenuado o demorado y un número elevado de células germinales permanece dentro de los nidos (Trombly y col., 2009). También este sistema ha sido asociado a vías de señalización en cáncer de ovario (Irusta y col., 2013).

Las hormonas esteroides juegan un rol importante en todo este proceso de formación de la reserva de folículos primordiales. Los altos niveles de E2 circulantes en el feto mantienen a los ovocitos en los nidos, y la caída de los niveles de E2 que se produce en el momento del parto permite la ruptura de los mismos (Kezele y Skinner 2003). De acuerdo a este modelo de regulación endocrina del ensamblado folicular, la persistencia de niveles elevados de estrógenos en los primeros días posteriores al parto impediría la ruptura de los nidos de células germinales, conduciendo a la aparición de FMO en el ovario. En concordancia con esta hipótesis, los ovarios de ratones hembras adultas tratadas perinatalmente con E2, DES (Iguchi y col., 1990; Iguchi y Takasugi 1986; Suzuki y col., 2002), BPA (Suzuki y col., 2002) y genisteína (Jefferson y col., 2002), tienen una mayor incidencia de FMO. Aunque los efectos de los compuestos estrogénicos se han conocido durante muchos años, el mecanismo por el cual se altera el proceso de ensamblado folicular dando origen a los FMO prácticamente es desconocido, y sólo ha recibido atención en estos últimos años (Iguchi y Takasugi 1986).

Uno de los desafíos para el estudio del ensamblado folicular, y en general del estudio toxicológico en ovario, es que los mecanismos de acción de un contaminante pueden ser de forma directa y/o indirecta (Figura 3.1). De esta manera, un PE puede actuar directamente sobre el ovario al alterar los receptores de hormonas ováricas y/o la transducción de señales de numerosos reguladores tales como gonadotrofinas, esteroides y factores de crecimiento; pero también puede actuar de manera indirecta, alterando la secreción de gonadotrofinas y factores de crecimiento relacionados con el ovario que emanan de otros órganos, perturbando las redes neuronales y/o modificando el suministro vascular al ovario (Terranova P 2005).

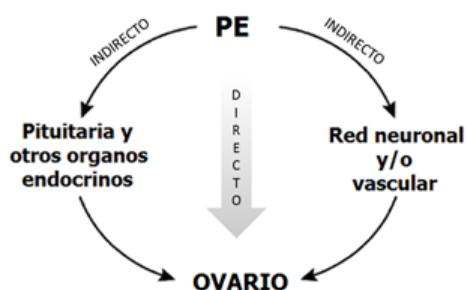


Figura 3.1. Acciones directas e indirectas de los PE sobre el ovario. Los PE pueden actuar directamente sobre el ovario alterando, por ejemplo la expresión de receptores hormonales en los folículos ováricos; o de manera indirecta, por ejemplo alterando la secreción de

gonadotropinas hipofisarias y perturbar el eje hipotálamo-hipofisis-gonadal (Modificado de Terranova 2005).

Los métodos *in vitro*, que utilizan tejido ovárico intacto (fragmentos o folículos aislados) o el órgano completo, ofrecen una manera de evaluar los efectos directos de un contaminante sobre el ovario (Figura 3.2).

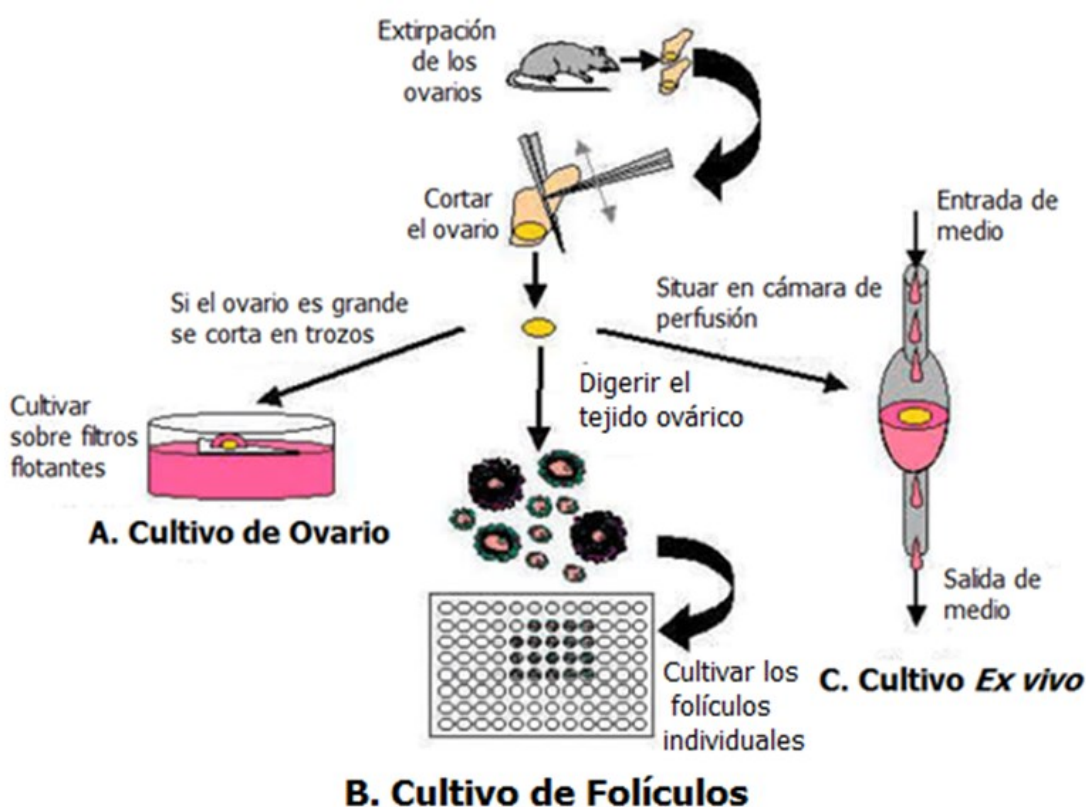


Figura 3.2. Diagrama de las tres técnicas que involucran cultivo *in vitro* de tejido ovárico. Las técnicas incluyen A) cultivo de ovario entero o cultivo de fragmentos ováricos en sistemas de cultivo de órgano flotante, B) cultivo de folículos individuales por digestión enzimática o separados mecánicamente en pocillos individuales en una placa de cultivo, y C) perfusión de un ovario intacto por sistema deflujo continuo (Modificado de Devine y col., 2002).

El cultivo de órgano entero consiste básicamente en colocar el tejido sobre un soporte físico, apto para cultivo celular y mínimamente sumergido en el medio que se encuentra debajo del soporte. Este tipo de cultivo ha cobrado interés en el estudio del ovario, dado

que el desarrollo folicular y las interacciones entre las poblaciones foliculares y otros tipos celulares presentes en el ovario son preservadas, permitiendo la identificación y caracterización de diversas moléculas que intervienen en la regulación de estos procesos de forma directa (Devine y col., 2002; Kezele y Skinner 2003). Particularmente ha generado atención en los últimos años el estudio de los potenciales efectos de agentes ambientales sobre el ensamblado folicular y la transición de folículo primordial a primario, por sus implicancias en diversas patologías como FOP y SOP, así como también sobre el éxito de protocolos para tratamientos de fertilización in vitro (Uda y col., 2004).

Como mencionamos en el desarrollo de esta tesis, el BPA es un contaminante ambiental con actividad estrogénica. Estudios recientes han demostrado que la exposición temprana a dosis bajas de BPA interfiere con el desarrollo ovárico temprano y reduce la fertilidad con la edad (Rodríguez y col., 2010; Wang y col., 2014). Otros autores indican que la exposición *in vitro* a BPA inhibe la ruptura de los nidos mediante alteración en la expresión de genes apoptóticos (Zhang y col., 2014; Zhou y col., 2015).

En base a todo lo expuesto, nuestro objetivo fue profundizar el estudio de los efectos del BPA sobre la formación de folículos primordiales, estudiando las acciones que el BPA puede ejercer de manera directa sobre la ruptura de los nidos y el posterior ensamblado folicular en cultivos de ovarios enteros.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La mayoría de los trabajos referidos a la metodología de cultivo de ovarios enteros han sido realizados en ratones o en líneas de ratas distintas a la utilizada por nosotros en esta tesis doctoral (Chen y col., 2009; Paredes y col., 2005; Zhang y col., 2014; Zhou y col., 2015). Por ello, en una primera etapa nos abocamos a la optimización de la técnica de cultivo de órgano entero aplicado a ovarios obtenidos en el día del parto provenientes de ratas Wistar.

3.2.1 Optimización de la técnica de cultivo de órgano entero

Como primer paso, nos propusimos reproducir el proceso de ruptura de los nidos de células germinales y ensamblado folicular en cultivo de ovario de ratas Wistar recién nacidas.

3.2.1.1 Animales

Ratas de la cepa Wistar de 90 días de edad (F0), fueron puestas a preñar con machos de fertilidad comprobada. El día 1 de gestación (DG1) se lo consideró aquel en el que el extendido vaginal presentaba espermatozoides y células de tipo escamosas. Las hembras preñadas se dejaron con agua y comida *ad libitum* hasta el día del parto. En el día del parto las crías hembras F1 (DPN0), se apartaron de la madre a las 4 p.m. y se extrajeron los ovarios.

3.2.1.2 Diseño experimental

Los ovarios extraídos en DPN0 se cultivaron durante 7 días sobre filtros flotantes (Millicell®-CM LowHeight Culture PlateInserts) en medio base constituido por: 1,1 ml de medio DMEN-F12 (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium: F12 1:1 vol/vol) conteniendo 1 mg/ml de BSA (albúmina de suero bobino, Sigma), 1 mg/ml Albumax (albúmina, Gibco™ Invitrogen Coop), ITS-X 100X (suplemento conteniendo insulina, transferrina, selenito de sodio y etanolamina, Gibco™ Invitrogen Coop.) y ácido ascórbico 100X (Sigma). El medio fue suplementado con penicilina, estreptomicina y gentamicina (100X) para prevenir contaminación bacteriana (Invitrogen). El cultivo se desarrolló en placas de 6 pocillos a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

El medio se renovó periódicamente y en el día 7 se cosecharon los ovarios para la realización de estudios histológicos (Figura 3.3). Durante este proceso de optimización también se analizaron distintos esquemas de recambio de medio, estableciéndose el período óptimo de renovación total de medio de cultivo en 48 hs.

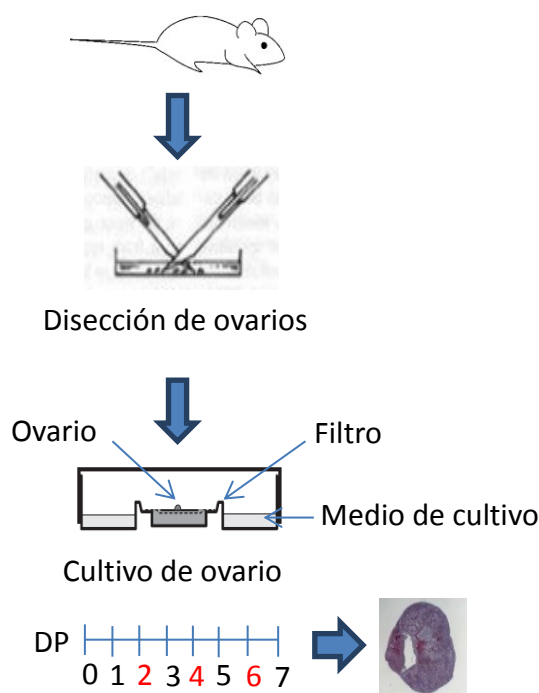


Figura 3.3. Cultivo de ovario entero. Los ovarios se disecaron bajo la lupa, se separaron de la grasa, del útero y el oviducto, y se cultivaron sobre filtros flotantes en placas de 6 pocillos. El cambio de medio se realizó cada 48hs. Al 7mo día los ovarios fueron retirados del cultivo y procesados para estudios histológicos.

3.2.1.3 Ensamblado folicular *in vivo* vs *in vitro*

Los ovarios cultivados durante 7 días según el diseño experimental en el punto 3.1.1.2 se fijaron en formol buffer 6 hs a temperatura ambiente. Al otro día se lavaron con PBS, se procesaron hasta su inclusión en parafina, se obtuvieron cortes de 5 μm de espesor y se colorearon con P-H, tal como hemos detallado en capítulos anteriores de esta tesis. Para comparar el proceso de ensamblado folicular *in vitro* versus *in vivo*, se extrajeron los ovarios de hembras de 7 días de vida, y se procesaron de la misma manera que los ovarios cultivados para su observación morfológica.

3.2.1.4 Efecto inhibitorio de E2 sobre el ensamblado folicular *in vitro*

Para completar la optimización de esta metodología de cultivo, evaluamos distintas concentraciones de E2 para determinar aquella que muestre un efecto inhibitorio de estradiol sobre el ensamblado folicular *in vitro*. Para este experimento, los ovarios de crías de DPN0 se cultivaron por 7 días en presencia de medio base más estradiol 10^{-4}M

(E4), estradiol 10^{-6} M (E6) o estradiol 10^{-8} M (E8), o DMSO (dimetilsulfóxido) 0,001% (vehículo). El medio se renovó cada 48 hs y en el día 7 se cosecharon los ovarios: uno fue asignado para estudios histológicos, mientras que el otro ovario se conservó a -80°C para estudios de biología molecular (Figura 3.4).

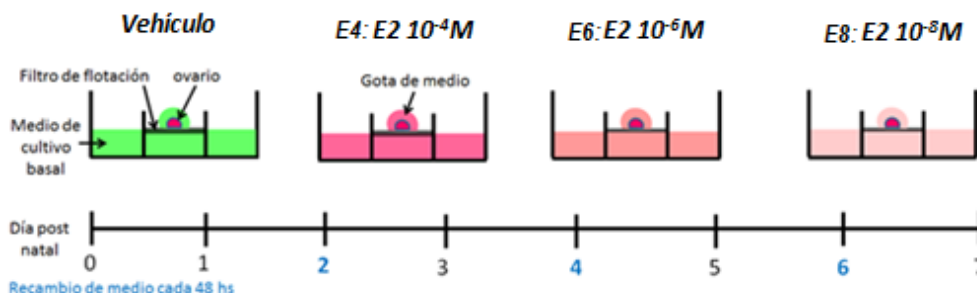


Figura 3.4. Esquema de exposición de los ovarios a distintas concentraciones de estradiol (E4, E6 y E8), o vehículo. Los ovarios se distribuyeron al azar y de a dos por pocillo. Las concentraciones de E2 fueron elegidas de acuerdo a Chen y col. (2007), para reproducir el efecto inhibitorio del E2 sobre el ensamblado folicular *in vitro*.

3.2.1.5 Optimización de la extracción de ARN del cultivo de ovario entero

Por último, se optimizó la metodología de extracción de ARN para los ovarios de cultivo. De acuerdo con las técnicas puestas a punto en nuestro laboratorio, para la transcripción reversa es necesaria una masa de ARN total de $1\ \mu\text{g}$ extraído de los tejidos. Como los ovarios posnatales son muy pequeños, fue imprescindible establecer cuántos ovarios eran necesarios para obtener al menos $1\ \mu\text{g}$ de ARN. Para ello se cultivaron 6 ovarios durante 7 días como se describió en el punto 3.2.1.2. Al finalizar el cultivo los ovarios se homogeneizaron en Trizol (Life Technologies, NY, EE.UU.) con la ayuda de aguja y jeringa, y el ARN se extrajo de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de ARN total se evaluó por Absorbancia a $260\ \text{nm}$ (A_{260}) en espectrofotómetro y se obtuvo una masa de $3,9369\ \mu\text{g}$. La cantidad de $1\ \mu\text{g}$ de ARN total fue transcrita en ADNc según Ramos y col. (2007). Luego se utilizó un protocolo de PCR en tiempo real optimizado para analizar los niveles de expresión relativos de L19 (proteína ribosomal L19) con el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen Instrumentos AG, Hombrechtikon, Suiza) y Hot Fire Pol EvaGreenqPCRMixPluss (Solís Biodyne; Biocientífica, Rosario, Argentina). Después de la desnaturalización inicial a 95°C durante $15\ \text{min}$, la mezcla de reacción se sometió a ciclos sucesivos de

desnaturalización a 95°C durante 15 s, hibridación a 60°C durante 15 s, y extensión a 72°C durante 15 s. La pureza del producto fue confirmada por curvas de disociación, y las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Se incluyeron controles negativos (sin ADN molde) en todos los ensayos, no produciendo amplificación consistente. Todos los controles y las muestras se analizaron por duplicado. Los pares de cebadores utilizados para amplificar el ADNc de L19 se muestran en la Tabla 3.2. La amplificación de L19 fue consistente con la esperada (Figura 3.5).

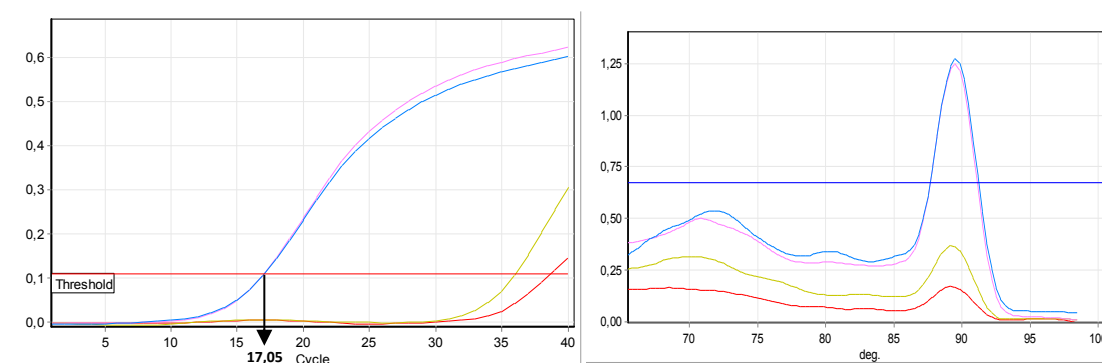


Figura 3.5. Análisis de PCR en tiempo real del cultivo de 6 ovarios. Izquierda: Curvas de amplificación relativa. Las curvas representan los valores de fluorescencia. El Ct promedio fue de 17,05, correspondiente al Ct esperado para L19. Derecha: Curvas de disociación: el pico corresponde a la temperatura a la cual el 50 % del producto amplificado se encuentra disociado, y es específica para cada amplicón (L19). *Threshold*: 0,10909.

Para reducir el número de animales, se probó la extracción con 4 ovarios. De esta extracción se obtuvo una masa de 8,58µg de ARN. La diferencia de masas de ARN obtenida de las extracciones de 6 y 4 ovarios podría deberse a una mayor eficiencia en la manipulación, ruptura y homogenización del tejido. La homogenización de los 4 ovarios fue igual de eficiente que la de 6 ovarios en cuanto a las masas extraídas de ARN. En base a esto, decidimos utilizar 4 ovarios para cada punto de análisis de la expresión génica (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Masa de ARN de pools de 4 ovarios para cada grupo experimental. Como podemos observar el procesado de 4 ovarios rindió una masa mayor a 1 µg de ARN total en todos los casos (Tabla 3.1).

Muestra	Masa de ARN (µg)	Muestra	Masa de ARN(µg)	Muestra	Masa de ARN(µg)
C#1	8,58	BPA#1	7,392	E4#1	8,15
C#2	11,44	BPA#2	18,26	E4#2	9,24
C#5	21,88	BPA#3	11	E4#3	6,765
C#6	22,4	BPA#4	10,12	E4#4	9,9

C: control. BPA: bisfenol A. E4: estradiol 10^{-4} M

3.2.2 Efectos del BPA sobre el ensamblado folicular *in vitro*

El siguiente experimento se realizó con el fin de evaluar el efecto del BPA sobre los procesos de ruptura de nidos y ensamblado folicular, utilizando estradiol como control positivo. Para este experimento, se extrajeron los ovarios de crías en DPN0 y se cultivaron por 7 días en presencia de medio base más estradiol 10^{-4} M (E4), BPA 10^{-4} M (BPA) o DMSO 0,001% (vehículo). El medio se renovó cada 48 hs y en el día 7 se cosecharon los ovarios, uno fue asignado para estudios histológicos, mientras que el otro ovario se conservó a -80°C para estudios de expresión génica (Figura 3.6).

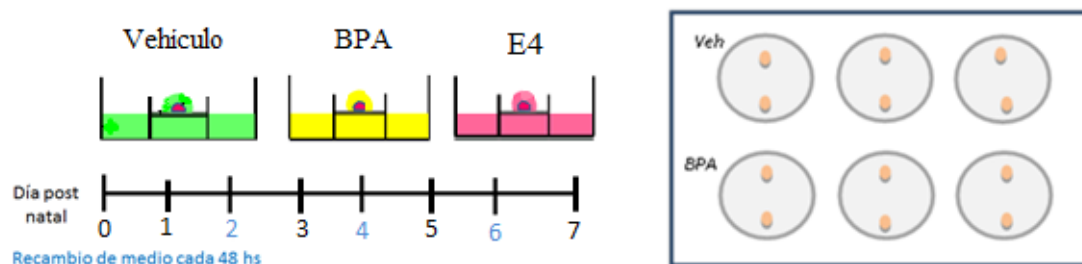


Figura 3.6. Esquema de exposición de los ovarios a BPA. Al igual que con la exposición a E2 los ovarios se distribuyeron al azar, colocando dos por pocillo sobre los filtros flotantes. En cada pocillo se los expuso a Vehículo, BPA (10^{-4} M) o E4 (10^{-4} M), durante 7 días y con un recambio de medio cada 48 hs.

3.2.2.1 Conteo de ovocitos por inmunofluorescencia

La identificación y cuantificación de los ovocitos dentro de los nidos (no ensamblados) o dentro de folículos primordiales (ensamblados) se realizó por inmunomarcación de la proteína VASA, ya que nos permitió distinguir claramente aquellos ovocitos que permanecían dentro de los nidos de aquellos que ya formaban parte de folículos individuales. Los ovarios fueron fijados en formol buffer durante 6 hs a temperatura ambiente (TA) y procesados en alcohol y xilol hasta ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 5 μm de espesor del ovario completo y se evaluaron las secciones más grandes de cada ovario. Se utilizó un anticuerpo específico de la proteína VASA (marcador citoplasmático de células germinales) como anticuerpo primario para identificar los ovocitos. La detección y co-localización de VASA mediante inmunofluorescencia se realizó según se describió previamente en trabajos de nuestro laboratorio (Varayoud y col., 2008a). Para minimizar la autofluorescencia del tejido, realizamos un tratamiento con borohidruro de sodio (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich de Argentina S.A.) durante 40 min a TA. Luego los cortes se procesaron en el microondas con buffer citrato 0,01 M; pH 6,00 para maximizar la recuperación antigénica. El bloqueo de las uniones inespecíficas se realizó incubando las muestras con suero normal de caballo durante 1 hora a TA. El anticuerpo primario [anti-VASA, proteína específica de células germinales, (H-80) sc-67185 rabbit polyclonal IgG Santa Cruz Biotechnology] se utilizó en una dilución de 1:100 y la incubación se realizó durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. El anticuerpo secundario Alexa Fluor®488 (verde) (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) se utilizó con una dilución 1:250 y se incubó durante 1 hora a TA. Luego se realizaron lavados con PBS, durante 45 min totales, con tres cambios de PBS totales. Para la visualización de los núcleos, los cortes se contracoloraron con 4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Fluka, Sigma) y se montaron con medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Los vidrios se mantuvieron en oscuridad a 4°C. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos sin anticuerpo primario. Todos los cortes inmunoteñidos se observaron en un microscopio Olympus BX- 51 equipado para detección epifluorescente con los filtros adecuados (Olympus). Las imágenes se obtuvieron utilizando una cámara digital de alta resolución USB 2.0 (QImaging® Go-3, QImaging, Surrey, BC, Canadá).

3.2.2.2 Análisis de la ruptura de nidos y de la formación de folículos primordiales

Para la evaluación de la ruptura de los nidos y del ensamblado folicular se determinó el porcentaje de ovocitos no ensamblados como el número de células germinales en los nidos en relación con el número de células germinales totales, mediante el análisis de imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia y el programa QCapture 6.0. También se calculó el correspondiente porcentaje de ovocitos ensamblados. La co-localización de imágenes se realizó con el programa Image Pro-Plus 3.0. El anticuerpo anti-Vasa se utilizó como un marcador para las células germinales, ya que marca específicamente el citoplasma de los ovocitos. Si bien la ruptura de los nidos comienza primero en la corteza interior y luego se expande a la corteza exterior (Pepling y Spradling 2001), nuestro análisis abarcó el ovario completo (Figura 3.7).

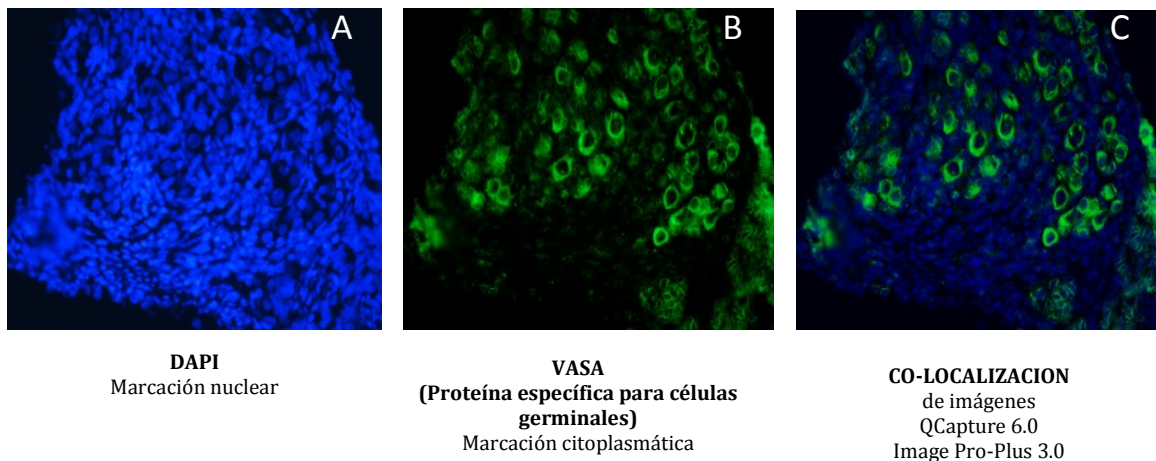


Figura 3.7. Inmunofluorescencia para VASA. **A)** DAPI es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias de ADN y marca de azul los núcleos de todas las células de ovario, incluyendo los ovocitos. **B)** VASA es una proteína específica de células germinales de localización citoplasmática, reconocida por el anticuerpo primario anti-VASA, marcando específicamente a los ovocitos. El color verde es atribuible al anticuerpo secundario Alexa Fluor®488. **C.** La co-localización de las imágenes se realizó con el programa Image Pro-Plus 3.0 y se evaluó el porcentaje de ovocitos no ensamblados, contando el número de ovocitos dentro de los nidos (no ensamblados), el número de ovocitos en folículos individuales (ensamblados), y el número de ovocitos totales (ovocitos no ensamblados+ovocitos ensamblados).

3.2.2.3 Expresión de genes reguladores del *nest-breakdown*

Para detectar posibles vías de acción de BPA sobre el ensamblado folicular, se analizaron los niveles de expresión relativos del ARNm de Foxl2, Nobox y MAPK-1 en los ovarios obtenidos de los cultivos de 7 días expuestos a estradiol, BPA y vehículo, por RT-PCR en tiempo real, siguiendo los protocolos detallados en el punto 3.2.2. Los pares de cebadores utilizados para amplificar el ADNc de Foxl2, Nobox y MAPK-1 (*housekeeping*) se muestran en la tabla 3.2. Se utilizaron las mismas condiciones de ciclado que para L19 [desnaturalización inicial a 95°C 15 min, ciclos sucesivos de desnaturalización a 95°C 15 s, hibridación a 61°C (para Foxl2), 56°C (para Nobox) y 59°C (para MAPK-1) 15 s, extensión a 72°C 15 s]. La pureza del producto fue confirmada por curvas de disociación, y se realizaron electroforesis en gel de agarosa. Se incluyeron en todos los ensayos, controles negativos que no contienen ADN molde, no produciendo amplificación consistente. Todos los controles y las muestras de cada experimento se analizaron por duplicado. La eficiencia de las reacciones de PCR se evaluó para cada gen target por amplificación de una serie de diluciones (más de cinco órdenes de magnitud) de fragmentos de ADNc de los transcritos analizados. La cuantificación de los datos de las PCRs en tiempo real se realizó por el método de la *Curva Estándar Relativa*, en la que se determina la cantidad relativa del *gen target* en las muestras experimentales a partir de una curva estándar del mismo. De igual manera, se realizó una curva estándar para el *housekeeping* (MAPK-1) y se determinó la cantidad relativa presente en las muestras. Finalmente se normalizaron los valores de las muestras del *gen target* con el *housekeeping*, y estos datos se analizaron mediante test estadísticos.

Tabla 3.2. Pares de cebadores y productos de PCR en tiempo real.

Gen	Cebadores (5'-3')	Tamaño (bp)	Acceso a Genbank
Foxl2	F:CGGAGAGCCGGCTTTTGTC R:TCTTTGACTGCGCGTCCGCT	96	NM_012020.2
Nobox	F:CTGGGCCATGGAACCTA R:TGGTCCCTCTGTCTCCAGT	97	NM_130869.3
MAPK-1	F:GCCCTTCAGAGCACTCCA R:AACACCAAAAAGGCATCCAC	74	NM_011949.3
L19	F:AGCCTGTGACTGTCCATCC R:TGGCAGTACCCTTCCTCTC	153	NM_031103

En paralelo, llevamos a cabo el cultivo de órgano entero con ovarios de ratones Oct4-GFP, como parte de un trabajo en colaboración con el *Institut Pasteur de Montevideo* (IPMon), evaluando la expresión de Foxl2 y Nobox. El diseño experimental para la obtención de muestras y la metodología de cultivo fue la misma que hemos descripto para ratas Wistar. Los pares de cebadores utilizados para amplificar el ADNc de Foxl2, Nobox y MAPK-1 (*housekeeping*) en ovarios de ratones Oct4-GFP son los mismos que utilizamos para rata (Tabla 3.2).

3.2.3 Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media \pm SEM. Para la evaluación de los resultados se realizó un análisis ANOVA para obtener el significado global cuando comparamos más de dos grupos, y se utilizó la prueba de Dunnett para comparar cada grupo experimental con el grupo control. Cuando se compararon solo dos grupos se utilizó la prueba *t de Student* no pareado de dos colas para analizar las diferencias entre dos grupos. En todos los casos, los valores con $p < 0,05$ fueron aceptados como significativos.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Optimización de la técnica de cultivo de órgano entero

Como resultado del análisis cualitativo al microscopio, no se observaron diferencias en el desarrollo folicular entre ovarios de 7 días de vida (*in vivo*) y ovarios de 7 días de cultivo (*in vitro*). Se observó un escaso número de nidos de ovocitos en ambos casos, y hubo un elevado porcentaje de folículos tanto primordiales como primarios. La arquitectura de los ovarios cultivados fue similar entre ambas condiciones (Figura 3.8).

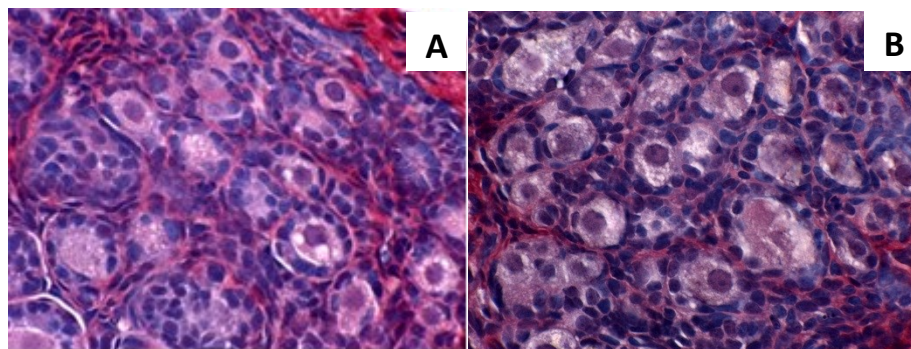


Figura 3.8. Comparación entre un ovario extraído en (A) día 7 post nacimiento (*in vivo*) y (B) en día 7 de cultivo (*in vitro*). Como podemos observar la arquitectura del ovario *in vitro*

(B) se conservó luego del cultivo, con folículos primordiales y primarios completamente ensamblados al igual que el ovario *in vivo* (A).

De las tres concentraciones de estradiol evaluadas, solo el grupo E4 (E_2 10^{-4} M) mostró un efecto inhibitorio sobre la ruptura de los nidos respecto al vehículo.

3.3.2 Efectos del BPA sobre el ensamblado folicular

Los ovarios expuestos *in vitro* a E4 o BPA mostraron un mayor porcentaje de ovocitos no ensamblados, correspondiéndose con un menor porcentaje de ovocitos ensamblados respecto al vehículo (Figura 3.9).

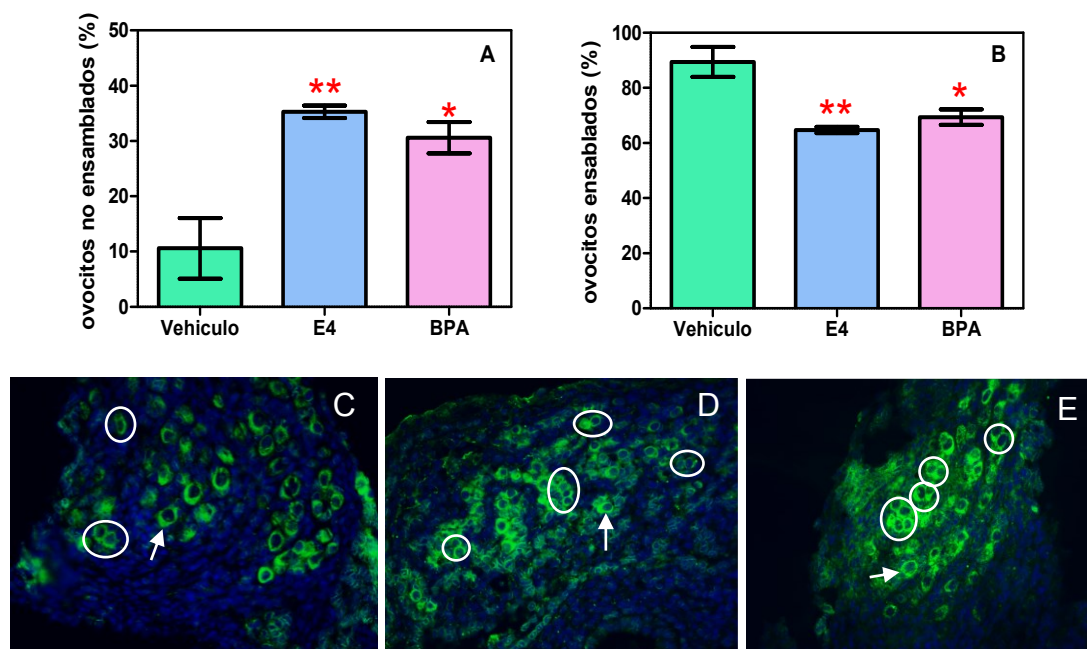


Figura 3.9. Ensamblado folicular *in vitro*. La exposición a E4 (10^{-4} M) y BPA (10^{-4} M) causó un aumento en el % de Ovocitos No Ensamblados(A) y un correspondiente menor % de ovocitos ensamblados (B). La expresión citoplasmática de VASA permite observar que en el grupo control (C) se ha llevado a cabo la ruptura de la mayoría de los nidos de ovocitos presentes en el momento del parto, permitiendo el ensamblado de los ovocitos en folículos individuales en día 7. En E4 (D) y BPA (E) se observa la persistencia de una mayor cantidad de nidos, conformados por dos o más ovocitos no ensamblados. Como se puede observar en las imágenes, aparece una tinción continua con VASA en las células germinales interconectadas (círculos), mientras que los ovocitos individuales aparecen aislados (flechas), debido a la presencia de células

somáticas intercaladas. Los datos fueron expresados como la media \pm SEM.

Significancia estadística: * $p < 0.05$ vs control.

3.3.2.1 Efectos de la exposición a estradiol y BPA sobre la expresión de genes reguladores del nest-breakdown

Nuestros resultados demuestran que la exposición *in vitro* a BPA disminuye la expresión del ARNm de Foxl2, mientras que en E4 no se observan cambios estadísticamente significativos sobre los mismos (Figura 3.10).

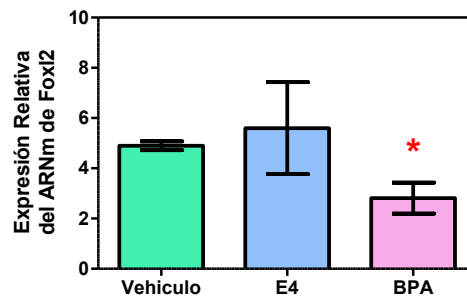


Figura 3.10. Niveles de expresión del ARNm de Foxl2 en ovarios de ratas Wistar expuestos a estradiol y BPA *in vitro*. La exposición *in vitro* a BPA disminuyó la expresión de Foxl2 en los ovarios en día 7 de cultivo. La exposición a estradiol no causó efectos sobre los niveles de expresión del ARNm de Foxl2. Los datos fueron expresados como la media \pm SEM.

Significancia estadística: * $p < 0.05$ vs control.

En cambio, en los ovarios de ratones Oct4-GFP, el agregado de BPA causó un incremento de los niveles de ARNm de Foxl2, sin registrarse cambios con estradiol (Figura 3.11).

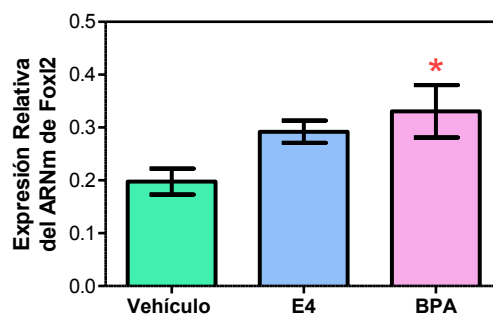


Figura 3.11. Niveles de expresión del ARNm de Foxl2 en ovarios de ratones OCT4-GFP expuestos a estradiol y BPA. La exposición *in vitro* a BPA incrementó la expresión de Foxl2

en los ovarios posnatales. La exposición a estradiol no causó efectos sobre los niveles de expresión del ARNm de Foxl2. Los datos fueron expresados como la media \pm SEM.

Significancia estadística: * $p < 0.05$ vs control.

Finalmente, la exposición a BPA no indujo cambios en la expresión génica de Nobox, tanto en los ovarios de ratas Wistar como de los ratones Oct4-GFP cultivados durante 7 días (datos no mostrados).

3.4 DISCUSIÓN

Los folículos son las unidades funcionales del ovario; cada folículo consiste de un ovocito rodeado por una o más capas de células somáticas, referidas como células de granulosa (Oktem y Oktay 2008). El ensamblado folicular es el proceso mediante el cual los ovocitos presentes en los nidos de células germinales son organizados en folículos primordiales. En roedores, inmediatamente después del parto, algunos ovocitos de los nidos son eliminados por apoptosis mientras que los ovocitos sobrevivientes son rodeados por células escamosas de pre-granulosa, formando así los folículos primordiales.

El cultivo de órgano entero es una metodología que permite reproducir todo el proceso de ensamblado folicular en condiciones *in vitro*, y que ha ganado interés en los últimos años como herramienta para el estudio de los estadios tempranos de desarrollo folicular (Devine y col., 2002; Pepling y Spradling 2001; Zhou y col., 2015). De esta manera, todo el proceso de ruptura de los nidos y ensamblado folicular que termina alrededor del cuarto día de vida postnatal, se puede reproducir con la técnica *in vitro* de cultivo de ovarios enteros (Kezele y Skinner 2003).

En una primera etapa nos propusimos optimizar esta metodología de cultivo en ovarios de hembras Wistar recién nacidas, dado que la mayoría de protocolos en la literatura describen la aplicación de esta técnica en ratones o en cepas de ratas diferentes a la Wistar. El análisis cualitativo de las poblaciones foliculares presentes en ovarios obtenidos en el día del parto y cultivados durante 7 días, nos permitió observar que no hubo diferencias al compararlo con ovarios obtenidos de crías de 7 días de vida. De esta manera, logramos mantener la arquitectura normal del tejido sin afectar el proceso de

ruptura de los nidos y ensamblado folicular. Esto nos permite reproducir y aplicar esta técnica en las condiciones de nuestro laboratorio.

La ruptura *in vivo* de los nidos de las células germinales se produce debido a una caída en los niveles de progesterona y estradiol maternos (Pepling 2006; Tingen y col., 2009). Estudios *in vitro* de cultivo de ovarios neonatales han demostrado que el tratamiento con estradiol y progesterona pueden inhibir la ruptura de los nidos de células germinales y el ensamblado folicular (Chen y col., 2009; Kezele y Skinner 2003). Por ello, en una segunda etapa quisimos reproducir el efecto inhibitorio de E2 sobre el ensamblado folicular *in vitro* (Kezele y Skinner 2003) y obtuvimos un mayor porcentaje de ovocitos no ensamblados en los ovarios expuestos a E2 10^{-4} M. Finalmente, establecimos las condiciones óptimas para poder realizar un análisis cuantitativo de expresión de genes implicados en la regulación de la ruptura de nidos y posterior ensamblado en folículos primordiales.

Los ovarios expuestos *in vitro* a BPA mostraron un mayor porcentaje de ovocitos no ensamblados, permitiéndonos concluir que el BPA actuaría de manera similar al estradiol, siendo capaz de inhibir la ruptura de los nidos de células germinales y el posterior ensamblado folicular en cultivos de ovarios enteros. Este resultado es coincidente con los publicados recientemente por otro grupo (Zhou y col., 2015).

Nobox se expresa preferentemente en los ovocitos de los nidos de células germinales y en los ovocitos de los folículos primordiales (Rajkovic y col., 2004; Suzumori y col., 2002). La eliminación de Nobox causa la pérdida de ovocitos posnatales y suprime la transición de los folículos primordiales a folículos en crecimiento en ratones (Rajkovic y col., 2004). Zhang y col., (2004) encuentran menores niveles de Nobox en los ovocitos de ovarios expuestos a BPA *in vitro*. Otros estudios atribuyen como mecanismo de acción del BPA a una alteración en la expresión de factores pro- y anti-apoptóticos del ovocito, los que están regulados por la caída en los niveles de estrógeno al nacimiento (Wang y col., 2014). Por nuestra parte, a diferencia de lo hallado por este grupo de investigadores, no observamos modificaciones en la expresión de Nobox. En cambio nuestros resultados nos muestran que la exposición *in vitro* a BPA causó la disminución de los niveles de ARNm de Foxl2, gen que es expresado en las células de

la pre-granulosa. Consideramos este resultado sumamente interesante, dado que durante la ruptura de los nidos y el ensamblado folicular, una menor expresión de FoxL2 inhibe la migración e invasión de los nidos por las células de la pre-granulosa (Li, G. y col., 2011). De esta manera, esto nos permite sugerir que BPA estaría alterando ensamblado folicular mediante una reducción de la expresión de FoxL2 en las células de la pre-granulosa, inhibiendo su invasión a los nidos de células germinales.

Otro indicio a favor de que BPA estaría actuando sobre el ensamblado de los folículos modificando la expresión de FoxL2, lo obtuvimos utilizando una especie de estudio diferente. Los ratones OCT4-GFP son ratones transgénicos de la cepa C57BL/6 (Yoshimizu y col., 1999). Estos tienen la particularidad de expresar la proteína verde fluorescente (GFP) en las células germinales. Resultados previos que obtuvimos en el contexto de un trabajo en colaboración con el Institut Pasteur de Montevideo mostraron un incremento en el porcentaje de ovocitos ensamblados en ovarios de 7 días, expuestas a BPA *in vitro*. Nuestros resultados mostraron un incremento en la expresión de FoxL2 por exposición a BPA *in vitro*.

Estos resultados en conjunto, agregan evidencia a la capacidad de BPA de impactar de forma directa sobre procesos tempranos del desarrollo ovárico, y también nos permiten proponer al cultivo de ovarios enteros como una metodología adecuada para la detección de acción estrogénica de contaminantes ambientales.

V- CAPÍTULO 4

LA EXPOSICIÓN NEONATAL A XENOESTRÓGENOS ALTERA LA RESPUESTA OVÁRICA AL TRATAMIENTO CON GONADOTROFINA EXÓGENA EN CORDERAS

Si buscas resultados distintos no hagas siempre lo mismo
Albert Einstein

4.1 INTRODUCCIÓN

La gran mayoría de los trabajos científicos biomédicos se realizan en animales de laboratorio, utilizando especialmente como modelo animal a la rata o el ratón por las ventajas que ofrece la sencillez de su manejo y su corto ciclo reproductivo y vital. Las crías de estas especies son consideradas “altriciales” por nacer inmaduras, prácticamente ciegas, sin los conductos auditivos abiertos, sin pelo y con una movilidad y desarrollo muy limitado. En cambio, las crías de las especies denominadas “precociales” nacen con un grado de desarrollo y maduración mayor. La oveja se encuentra entre las especies consideradas precociales al igual que el perro, el conejo y el humano entre otras (Rivera 2013).

La oveja (*Ovis aries*) es un mamífero rumiante, dócil por naturaleza. Un adulto pesa entre 30 a 80 kg según la raza y sexo, lo que facilita su manipulación quirúrgica (Scheerlinck y col., 2008). Tiene una vida media larga (aproximadamente 15 años) y en la hembra, el período de gestación dura 145 días. Tal como hemos visto en la introducción (Introducción sección I.4.1), la oveja tiene un desarrollo ovárico similar al observado en el humano (Juengel y col., 2002; Pryse-Davies y Dewhurst 1971; Sawyer y col., 2002) y algunas especies de ruminantes son susceptibles de padecer, de forma natural, afecciones reproductivas similares a las de la mujer. Por estas y otras razones, la oveja es utilizada como uno de los modelos animales de elección para estudiar patologías reproductivas tales como el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) (Padmanabhan y Veiga-Lopez 2013; Steckler y col., 2005). A este interés en salud humana, se le agrega la importancia que tienen los estudios en ovinos para mejorar aspectos de la producción animal de esta misma especie como la de otros ruminantes.

El ovario de la cordera es sensible a la perturbación por PEs durante la vida intrauterina (Fowler y col., 2008; Savabieasfahani y col., 2006) o durante la vida postnatal temprana (Rivera y col., 2011). Durante el desarrollo de la tesis doctoral “Efectos de la exposición postnatal a estrógenos ambientales (xenoestrógenos) sobre el desarrollo folicular en ovejas”, realizada en nuestro laboratorio por el Dr. Oscar Rivera (Rivera 2013) observamos que en las ovejas, la exposición a bajas dosis de BPA o DES desde el nacimiento hasta el DPN14 causó una disminución en el *stock* de folículos primordiales asociado a un incremento del desarrollo folicular, aumento de la folículos atrésicos, y una mayor incidencia de FMO en DPN30 (Rivera y col., 2011). Además, en este mismo

trabajo observamos que la respuesta ovárica a un tratamiento exógeno con hormona foliculo estimulante ovina (oFSH) está alterada. Concretamente, las corderas prepúberes expuestas a BPA o DES durante los primeros 14 días de vida posnatal tienen un escaso desarrollo folicular y bajos niveles de estradiol en respuesta al tratamiento con oFSH (Rivera y col., 2015).

El sistema de las proteínas morfogénicas óseas (BMP), tiene un papel de relevancia en el control de la dinámica folicular y la tasa de ovulación (Fabre y col., 2006). Concretamente, se han descubierto una serie de factores pertenecientes a esta familia que influyen en la regulación del desarrollo folicular: *bone morphogenetics protein 6* (BMP6) y BMP15, y *growth and differentiation factor 9* (GDF-9), que en la oveja estarían asociados con un normal desarrollo folicular en respuesta a FSH y que intervendrían en el control del número de ovulaciones (Fabre y col., 2006; Fortune 2003). Por lo tanto, en el presente capítulo nos propusimos estudiar si las alteraciones causadas por BPA o DES en la respuesta folicular del ovario al tratamiento con oFSH podrían estar asociadas a alteraciones en la expresión de BMP en ovejas prepúberes.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Animales y diseño experimental

Todos los procedimientos fueron revisados y autorizados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina). Los experimentos se llevaron a cabo en una granja experimental que pertenece a la Universidad Nacional de Lomas de Zamora (Buenos Aires, Argentina). Ovejas Corriedale (2-4 años) se aparearon con carneros Hampshire Down. Las corderas seleccionadas para los experimentos nacieron durante agosto y septiembre, de una sola entrega (no se utilizaron los gemelos).

La concentración de fitoestrógenos en el pasto no fue evaluada; sin embargo, debido a que la ingesta de alimentos en los animales control y tratados fue equivalente, asumimos que todos los animales fueron expuestos a los mismos niveles de fitoestrógenos. Madres e hijas permanecieron en condiciones naturales durante todo el experimento.

Después del nacimiento, las corderas hembra fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos postnatales diarios (Figura 4.1) con inyecciones subcutáneas

en el cuello, a partir del DPN1 (siendo este el día de nacimiento) hasta DPN14: 1) aceite de maíz como vehículo (Control; N=18), 2) DES (Sigma-Aldrich), 5 µg/kg por día (N=13), 3) BPA50 (99% de pureza, Sigma-Aldrich) y 50 µg/kg por día (N=16). Aunque la vía de administración del PE no es el modo natural de exposición, hemos seleccionado este método para estar seguros de la dosis administrada a los animales. El modelo postnatal de la exposición a xenoestrógenos se ha utilizado ampliamente en nuestro laboratorio tanto en roedores (Bosquiazzo y col., 2010; Monje y col., 2007; Monje y col., 2010; Ramos y col., 2007; Rodriguez y col., 2010) como en corderas (Rivera y col., 2011; Rivera y col., 2015) y ha demostrado ser útil para estudiar a corto y a largo plazo las consecuencias de la exposición neonatal a sustancias hormonalmente activas. Por otro lado, la vía de administración es una cuestión importante para determinar los riesgos del BPA en la salud humana y en modelos animales. En fetos y neonatos, Taylor y col. observaron bajos niveles de la enzima que conjuga BPA (uridinadifosfato-glucuronosil-transferasa), lo que implica que tanto la administración oral y no oral de BPA durante la vida neonatal proporciona la misma dosis activa interna. (Taylor y col., 2008).

La dosis utilizada de BPA es la misma que en los capítulos anteriores (BPA50). El DES se utilizó como control positivo porque se ha informado que la exposición a dosis bajas de este compuesto durante el desarrollo induce FMO y activa la transición del folículo primordial a primario en ratones (Iguchi y Takasugi 1986), ratas (Rodriguez y col., 2010), y en corderas (Rivera y col., 2011). La dosis de 5 µg/kg por día de DES utilizada se considera una dosis baja (Newbold y col., 2004), siendo 20 veces menor que la dada terapéuticamente para mujeres embarazadas.

En DPN30, los ovarios de las corderas de los grupos experimentales (Control N=6; DES N=4; BPA50 N=5) fueron obtenidos a través de una incisión abdominal debajo de la línea media, la anestesia se realizó con ketamina (20 mg/kg, i.m.) y xilazina (0,1-0,2 mg/kg, i.m.). El resto de las corderas de cada grupo experimental (Control N=12; DES N=9; BPA50 N=11) fueron tratadas con dosis múltiples de oFSH (Ovagen, ICPbioLtd, Auckland, Nueva Zelanda) a partir del DPN30. Cada cordera recibió una dosis total de 8,8 mg de oFSH. La oFSH se administró cada 12hs por vía intramuscular (i.m.) durante 3 días consecutivos (a las 08:00 y 20:00 h, DPN30, DPN31 y DPN32). Este protocolo de tratamiento fue adaptado, con modificaciones menores, al descrito previamente por

Kelly y col. (Kelly y col., 2005). 40 hs después de la última inyección con oFSH (DPN34), se obtuvieron los ovarios, los cuales fueron cortados en mitades y se utilizaron con diferentes propósitos experimentales. Para la extracción de ARNm, las porciones de cada ovario se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C (Figura 4.1).

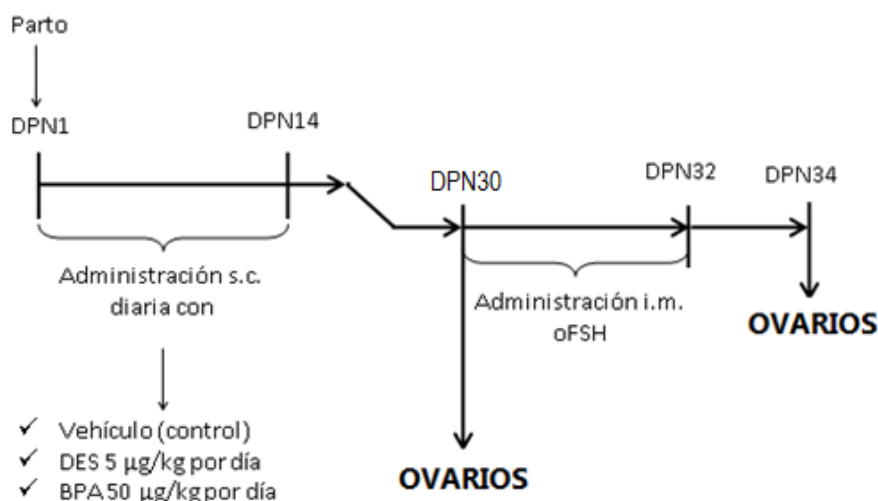


Figura 4.1. Representación esquemática del protocolo experimental utilizado para estudiar los efectos de la exposición temprana a DES o BPA en el ovario de las corderas.

La administración diaria se llevó a cabo por vía subcutánea. DPN, día postnatal.

4.2.2 Expresión génica de BMP, GDF9 y FSHR por RT-PCR en tiempo real

Un protocolo de RT-PCR optimizado se utilizó para analizar los niveles de expresión relativos del ARNm de BMP6, BMP15, BMPR-1B (receptor tipo 1-B de BMP), GDF9, y FSHR en los ovarios obtenidos en DPN30 o después de la estimulación con oFSH en DPN34. Los ovarios de cada grupo experimental (Control, BPA0.5, BPA50 y DES) se homogeneizaron individualmente en Trizol (Life Technologies), y el ARN se preparó de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de ARN total se evaluó por A260, y el ARN se almacenó a -80°C hasta su utilización. Cantidades iguales (4 µg) de ARN total fueron transcritas inversamente en ADNc de acuerdo con Ramos y col. (Ramos y col., 2007). Los pares de cebadores utilizados para amplificar BMP6, BMP15, BMPR1B, GDF9, FSHR y la proteína ribosomal 18S (*housekeeping*) se muestran en la tabla 1. Los niveles de ADNc fueron detectados por qRT-PCR usando el termociclador

Rotor-Gene Q (Qiagen Instrumentos AG) y HOT FIRE Pol EvaGreen qPCRMixPluss (Solís Biodyne; Biocientífica, Rosario, Argentina).

Después de la desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min, la mezcla de reacción se sometió a ciclos sucesivos de desnaturalización a 95°C para 15 s, hibridación a 59°C (para BMP6), 54°C (para BMP15), 52°C (para BMP-R-1B), 53°C (para FSHR y GDF9), o 55°C (para r18S) durante 15 s, y la extensión a 72°C durante 15 s. La pureza del producto fue confirmada por curvas de disociación, y las muestras al azar se sometieron a electroforesis en agarosa gel. Los controles negativos, sin ADN molde, se incluyeron en todos los ensayos, no produciendo amplificación consistente. Para cada análisis, se realizó una curva estándar a partir de ocho diluciones seriadas de una muestra estándar que contiene cantidades iguales de ADNc a partir de los diferentes grupos experimentales como se describió anteriormente (Varayoud y col., 2008a). Todos los controles y las muestras de cada experimento independiente se analizaron por triplicado.

Tabla 4.1. Productos de PCR y cebadores para PCR cuantitativa en tiempo real.

Gen	Cebadores (5'-3')	Tamaño (pb)	Acceso a GenBank
BMP6	F:CTCTACGTGAGCTTCCAGGACCT R:TCTCCGTCACAGTAGTTGGCAGC	83	DQ192014.1
BMP15	F:ATGGTCCTCCTGAGCATCCTTAG R:CTGCCCTACCTGTGTCATTTGG	87	NM_001114767
BMP-R-1B	F:TCTACACTTTGGTTATCAGC R:TTTGTATCCTCTCTTGTCAT	95	NM_001009431
GDF9	F:TAGAGGTTCTGTATGATGGG R:ATGCCTTATAGAGCCTCTTC	90	NM_001142888
FSHR	F:CCAACAACCTGCTATACATC R:GTGCTTAATACCTGTGTTGG	103	NM_001009289

Abreviaciones: BMP6, Proteína morfogénica ósea 6; BMP15, Proteína morfogénica ósea 15; BMP-R-1B, BMP receptor 1B; GDF9, factor de crecimiento y diferenciación 9; FSHR, receptor de hormona folículo estimulante. F: forward, R: reverse.

4.2.3 Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media±SEM. Se realizó un ANOVA unidireccional para evaluar la importancia global, y las diferencias entre los grupos de

tratamientos y el control se determinaron utilizando el post test de Dunnett. Un $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

4.3 RESULTADOS

Un posible mecanismo que afecta la respuesta ovárica al tratamiento con oFSH en corderas expuestas a xenoestrógenos puede residir en el sistema de las BMP. Por lo tanto, se evaluó la respuesta del sistema de BMP y FSHR a la estimulación con oFSH. Los resultados obtenidos nos muestran que los niveles de ARNm de BMP6, BMP15, o FSHR después de la estimulación con oFSH son similares entre los animales del grupo control y los expuestos a BPA o DES en su etapa neonatal (Figura 4.3). En cambio, encontramos un incremento significativo del nivel del ARNm de GDF9 luego del estímulo con oFSH en las ovejas previamente tratadas con DES o BPA50 (Figura 4.3). Al observar el estado de expresión génica en el ovario previamente al tratamiento de supermaduración, observamos que los niveles de ARNm de GDF9 ya estaban alterados en DPN30 en las corderas tratadas con BPA50 (Figura 4.2) y que permanecieron alterados luego del estímulo con oFSH. En las corderas tratadas con DES, no se observaron diferencias en los niveles de ARNm de GDF9 en DPN30 (Figura 4.2).

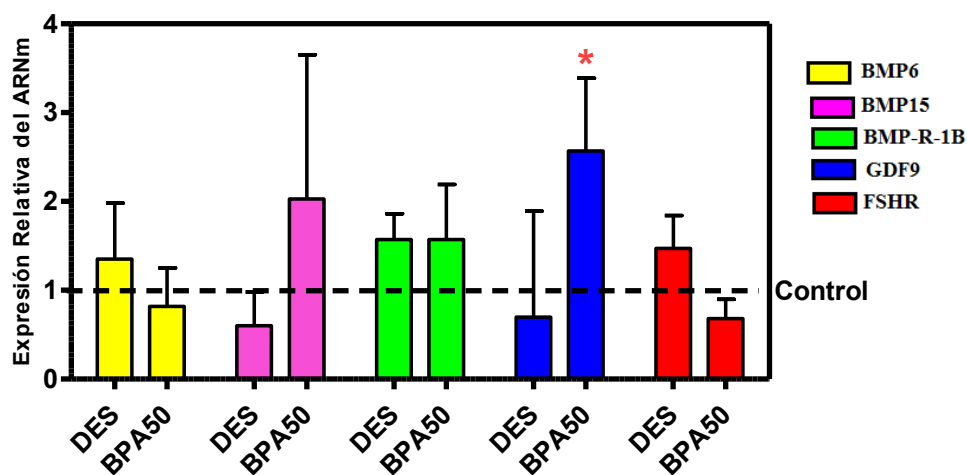


Figura 4.2. Expresión génica del sistema de BMP en DPN30 en ovarios de corderas expuestas a DES, BPA50, y vehículo. Análisis por RT-PCR en tiempo real del sistema BMP y del receptor de FSHR en corderas prepuberales. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. Significancia estadística: * $p < 0,05$ vs control. BMP-6/15: bone morphogenetic protein; BMP-R-1B: bone morphogenetic protein receptor type 1; GDF-9: growth differentiation 9.

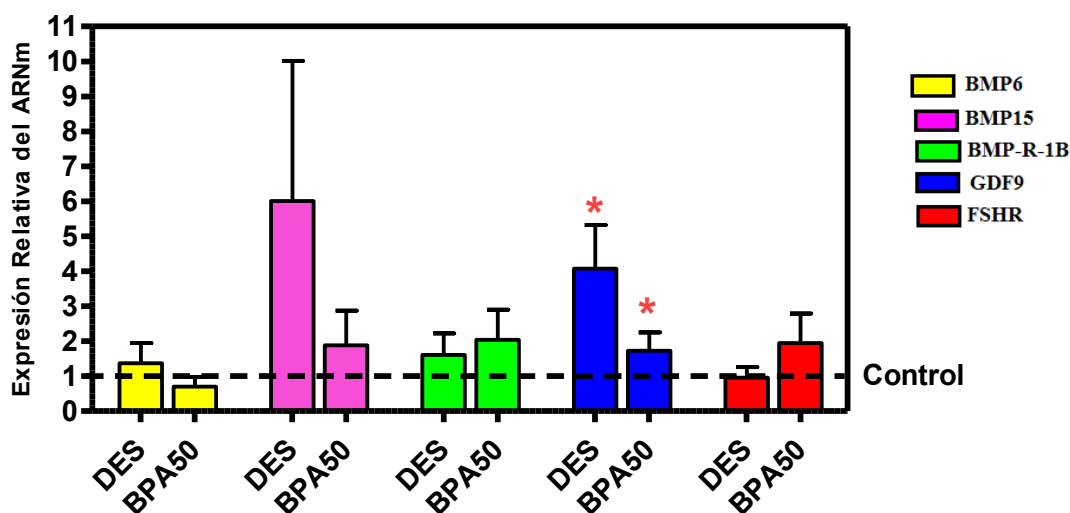


Figura 4.3. Expresión génica del sistema BMP en DPN34 en ovarios de corderas expuestas a DES, BPA50, BPA0.5 y vehículo. Análisis por RT-PCR en tiempo real del sistema BMP y del receptor de FSH-R en respuesta a oFSH. Los resultados se expresaron como la media±SEM. Significancia estadística: * $p < 0,05$ vs control. BMP-6/15: bone morphogenetic protein; BMP-R-1B: bone morphogenetic protein receptor type 1; GDF-9: growth differentiation 9.

4.4 DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios sobre los efectos de los contaminantes ambientales en el desarrollo y la función ovárica se han basado en sistemas *in vitro* o en modelos de roedores (Peretz y col., 2011; Rodríguez y col., 2010) y por lo tanto es recomendable que sean evaluados también en otros modelos animales (Veiga-Lopez y col., 2014). La oveja es una especie precocial en la que algunos aspectos del desarrollo reproductivo, y particularmente el desarrollo del ovario, sigue una línea de tiempo similar a la de los seres humanos (Padmanabhan y Veiga-Lopez 2013)(ver Introducción de esta tesis sección I.4.1).

Resultados provenientes de la tesis del Dr Rivera (2013) realizada recientemente en nuestro laboratorio, demuestran que la exposición postnatal temprana de corderas a BPA o DES impacta negativamente en la respuesta ovárica a oFSH exógena en la edad prepuberal: con un menor número de folículos grandes (mayores o igual a 2mm), asociado a una menor capacidad de producir estrógenos en respuesta a oFSH. Estos cambios están relacionados con una menor expresión de RA en los folículos antrales (Rivera OE y col, 2015).

De lo expuesto anteriormente, se desprende que la exposición neonatal a dosis bajas de BPA o DES disminuye drásticamente la capacidad de respuesta del ovario de las ovejas prepuberales al estímulo gonadotrófico (Rivera y col., 2015).

El esquema de la Figura 4.4 muestra cómo podrían insertarse los resultados obtenidos en este capítulo con los descriptos previamente. Como observamos en el presente capítulo, la exposición neonatal a DES y BPA50 incrementan la expresión de GDF9. Se ha reportado que GDF9 controla el desarrollo folicular de la etapa preantral a la etapa antral temprana por regulación positiva de la biosíntesis de andrógenos foliculares; por ello, la flutamida, un antagonista específico del RA, suprime el crecimiento del folículo preantral inducido por GDF9 (Orisaka y col., 2009). De esta manera, el efecto estimulante que los altos niveles de GDF9 tendrían sobre el desarrollo folicular, estarían disminuidos debido a los bajos niveles de RA en los folículos antrales (Figura 4.4).

Por otro lado, Vitt y col. (2000) demostraron que GDF9 suprime la producción de progesterona y estradiol inducida por FSH en los folículos de rata. Esto es acorde con el rol inhibitorio descrito para GDF9 sobre la sensibilidad folicular a FSH (Fabre y col., 2006). De esta manera, la mayor expresión de GDF9, junto con el bajo número de folículos antrales, podría explicar la capacidad disminuida para sintetizar estradiol en respuesta a oFSH en los animales expuestos a BPA o DES (Figura 4).

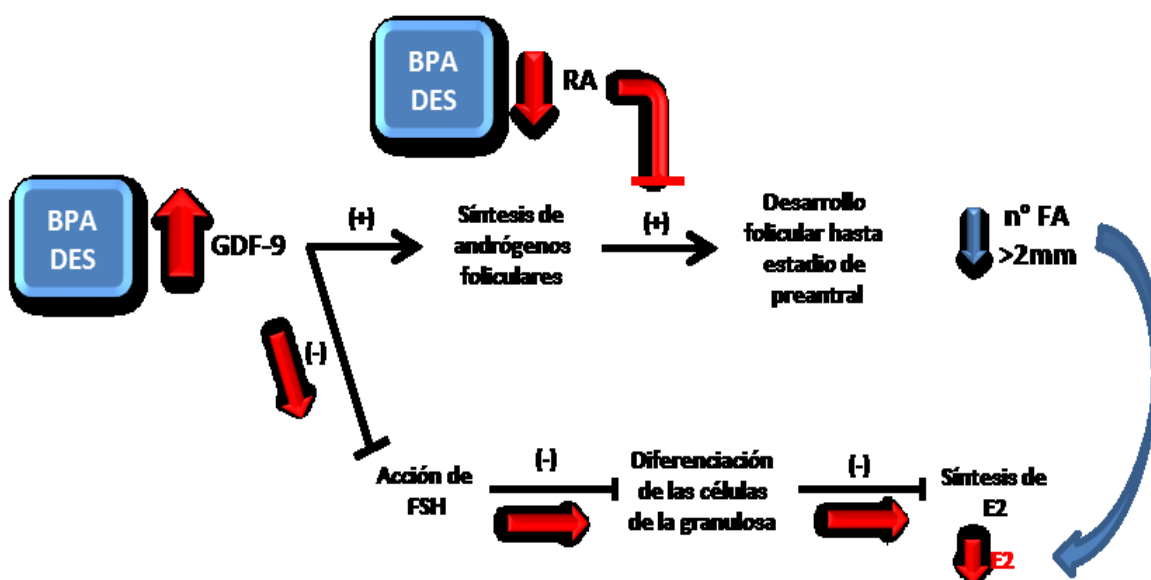


Figura 4.4. Esquema de comprensión de los resultados. GDF-9 estimula el crecimiento de los folículos preantrales por estimulación de la biosíntesis de andrógenos foliculares, a través de RA. Además, suprime la síntesis de E₂ mediante inhibición de la diferenciación de las células de

la granulosa en respuesta a FSH (flechas negras) (Orisaka y col., 2009; Vitt y col., 2000). En base a estos antecedentes, nuestros resultados sugieren que en la oveja: a) la exposición postnatal a BPA o DES altera la esteroidogénesis ovárica inducida por oFSH mediante un aumento en la expresión de GDF-9 (flechas rojas); b) la reducción del RA causada por la exposición a BPA o DES, atenúa el estímulo que tendrían los altos niveles de GDF9 sobre el desarrollo folicular en las ovejas expuestas a BPA (flechas azules).

Los resultados obtenidos nos permiten postular una relación entre la menor capacidad de respuesta del ovario a oFSH exógena y anomalías en la expresión de algunos componentes del sistema de proteínas BMP.

VI- *CONCLUSIÓN*

Todo parece imposible, hasta que se hace.
Nelson Mandela

Del análisis global de los resultados surgen aspectos que nos parecen muy interesantes en el contexto del estado actual del conocimiento en el área de perturbación endocrina y sus implicancias en la fisiología ovárica.

Una constante que observamos en nuestros trabajos es la capacidad de BPA de afectar los estadios tempranos de desarrollo folicular. Cuando BPA es administrado durante el período postnatal por vía subcutánea, actúa como un estimulador del reclutamiento inicial, provocando una reducción en la reserva de folículos primordiales en ratas y corderas (Rivera y col., 2011; Rodríguez y col., 2010). La exposición oral a BPA *in útero* también reduce el tamaño de la reserva de folículos primordiales en los recién nacidos (Wang y col., 2014), alterando la ruptura de los nidos de células germinales. Cuando BPA es inyectado por vía intraperitoneal provoca una disminución en el número de todos los tipos foliculares y de cuerpos lúteos, e incrementa el número de folículos atrésicos en ratas prepúberes (Li y col., 2014). En la presente tesis hemos demostrado un número reducido de folículos en crecimiento en los ovarios de hembras adultas, que estuvieron expuestas a BPA durante el período perinatal. También es muy interesante notar que en varios de estos trabajos, la expresión de RA ha estado alterada en relación a las perturbaciones del desarrollo folicular, enfatizando la capacidad de BPA de afectar no sólo las vías de acción estrogénicas sino también las androgénicas. En base a esto podemos concluir que el desarrollo folicular es un proceso altamente sensible a la acción del BPA, dado los efectos encontrados con diferentes vías de administración, diferentes dosis y momentos del desarrollo, e incluso diferentes especies.

Una de las ventajas del tratamiento exógeno con gonadotrofinas es que permite detectar alteraciones per se del ovario (Li y col., 2004). En esta tesis, hemos observado que el ovario de las hembras que estuvieron expuestas a BPA responde a PMSG con mayor desarrollo folicular en estadio antral. Luego, al recibir la inyección de hCG, estos mismos ovarios responden con una mayor incidencia de folículos antrales atrésicos. Este comportamiento no se observa en el animal adulto, ya que en las hembras adultas que estuvieron expuestas a BPA observamos por el contrario un mayor número de CL, indicio de una mayor cantidad de ovocitos ovulados. Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que en el animal adulto, sin tratamiento de gonadotrofinas exógenas, el eje Hipotalámico-Hipofisario-Gonadal es funcional, permitiendo una regulación fina de los mecanismos de retroalimentación entre gónada y secreción de gonadotrofinas, que

está ausente en el animal prepuberal superestimulado y que podrían evitar el ingreso a atresia de la población de folículos antrales.

En corderas prepúberes la respuesta ovárica al tratamiento con gonadotrofina exógena mostro anomalías en la expresión de algunos componentes del sistema de proteínas BMP asociados a una deficiente foliculogénesis, menor expresión del RA y bajos niveles de E2, por la exposición postnatal a BPA y DES.

El riesgo de infertilidad y una pobre respuesta ovárica a los tratamientos FIV (Fertilización *in vitro*) descritos en mujeres con altas concentraciones de BPA sugieren efectos en la calidad de los ovocitos y en la función ovárica (Caserta, 2011; Ehrlich, 2012; Rochester, 2013; Bloom, 2011; Caserta, 2013). Nuestros resultados de superestimulación, tanto en rata como en ovejas, muestran que la exposición perinatal a una dosis de BPA considerada como segura, condiciona la capacidad de respuesta del ovario a un tratamiento con gonadotrofinas exógenas.

El cultivo de ovarios enteros de roedores es una herramienta óptima para el estudio de los efectos directos de un contaminante sobre los procesos de ruptura de los nidos de células germinales y de ensamblado folicular que ocurren tempranamente, y son esenciales para la formación de la reserva de folículos primordiales. Los resultados obtenidos con ovarios enteros cultivados durante 7 días en presencia o ausencia de BPA, nos permiten concluir que BPA actuaría de manera similar a E2 siendo capaz de inhibir la ruptura de los nidos de células germinales y el posterior ensamblado folicular. Además, podemos sugerir a una menor expresión de FoxL2 como un posible mecanismo de acción por el que BPA estaría inhibiendo el ensamblado folicular.

Por último, los resultados detallados en esta tesis doctoral fundamentan la preocupación mundial por la creciente exposición a sustancias catalogadas como estrógenos ambientales, y demuestran que el desarrollo folicular y la síntesis esteroidogénica ováricas son un blanco de acción constante de los mismos.

VII- ANEXO

No eres lo que tienes, eres lo que das.

A.1 Dinámica folicular en ratas prepuberales expuestas perinatalmente a BPA0.5 luego del tratamiento con PMSG.

La exposición perinatal a BPA0.5 y el tratamiento de superestimulación con PMSG de estas hembras se realizó conjuntamente con los animales del capítulo 2. La dosis de BPA0.5 es la misma utilizada en el capítulo 1.

Los resultados obtenidos de la dinámica folicular fueron los siguientes:

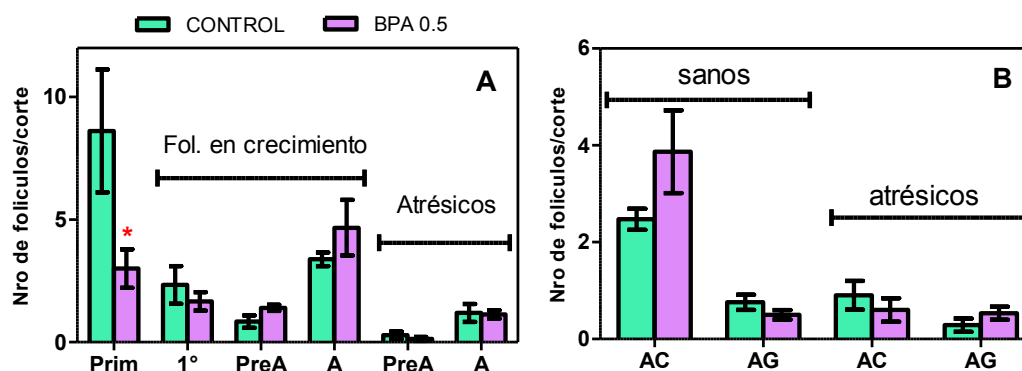


Figura A.1. La exposición a BPA 0.5 disminuye el número de folículos primordiales luego del tratamiento con PMSG. El análisis estadístico de los folículos en crecimiento no mostró cambios significativos pero si se observó una disminución en el número de folículos primordiales (A). La exposición perinatal a BPA 0.5 no causó modificaciones en la población de folículos antrales chicos y grandes luego del tratamiento con PMSG (B). Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. Significancia estadística: * $p < 0.05$. Prim, folículo primordial; 1°, folículo primario; PreA, folículo preantral; A, folículo antral; AC, folículo antral chico; AG, folículo antral grande.

En base a estos resultados de dinámica folicular, decidimos completar el estudio sólo con la dosis de BPA50 (capítulo 2), ya que con BPA0.5 no observamos cambios en la población de folículos en crecimiento luego del tratamiento con PMSG, ya que es ésta la población sensible a las gonadotrofinas (McGee y Hsueh 2000), ver sección I.4.2 de la introducción de ésta tesis.

VIII- *RESUMEN*

*El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar.
Es la fuente de todo arte y ciencia verdaderos.*

Albert Einstein

Las hormonas esteroideas sexuales, a través de sus receptores específicos, cumplen un importante rol en la diferenciación y desarrollo del aparato reproductor, en la regulación de la función ovárica y en el mantenimiento de la fertilidad de la hembra. Los PE son sustancias que tienen la capacidad de imitar o antagonizar a las hormonas endógenas. Por su particular mecanismo de toxicidad, todos los procesos hormonales son potencialmente sensibles a la acción de los PE. Aquellos PE que actúan alterando alguna vía de acción de los estrógenos, son denominados xenoestrógenos o estrógenos ambientales.

Nuestra hipótesis general de trabajo postula que la exposición a químicos clasificados como xenoestrógenos en períodos hormono-sensibles del desarrollo prenatal y postnatal temprano induce alteraciones en procesos críticos relacionados con el desarrollo normal de las gónadas y el tracto reproductor femenino, impactando negativamente en la capacidad reproductiva en la vida adulta.

Entre los xenoestrógenos más utilizados y estudiados podemos mencionar a BPA y DES. El DES fue ampliamente utilizado en mujeres embarazadas durante las décadas de 1950 y 1960 administrándose para evitar abortos espontáneos y complicaciones del embarazo. El BPA es uno de los químicos industriales con más volumen de producción en todo el mundo. El BPA atrajo la atención de las agencias regulatorias y de científicos de varios países debido a la elevada exposición de seres humanos y animales al mismo, y por los efectos que puede tener especialmente durante las etapas más susceptibles del desarrollo: fetal, neonatal, prepuberal y puberal.

Si bien hay muchos trabajos que demuestran efectos de estos dos xenoestrógenos sobre el desarrollo ovárico, hay aspectos que han sido poco estudiados y que han sido señalados como importantes en el estudio de la perturbación endocrina en relación a la funcionalidad del ovario (Doerge y col., 2010a; Peretz y col., 2014). Fundamentalmente en lo que refieren a la necesidad de:

- evaluar la exposición durante períodos tempranos de desarrollo, que refleje la exposición durante la etapa fetal y/o durante la etapa postnatal durante la lactancia,
- estudiar los efectos que una exposición en etapas tempranas de la vida podría tener posteriormente en la vida adulta,
- investigar la exposición a bajas dosis por vía oral a través de la dieta,

- diferenciar entre los efectos directos sobre el ovario de aquellos considerados indirectos.

Por lo tanto, los objetivos y experimentos que vamos a describir pretenden contestar, al menos en parte, estos interrogantes.

Capítulo 1. DISFUNCIONES OVÁRICAS EN RATAS ADULTAS NACIDAS DE MADRES TRATADAS CON BAJAS DOSIS DE BPA POR VÍA ORAL.

El estudio de la exposición oral al BPA en el período perinatal y sus efectos en la funcionalidad de ovario en la edad adulta ha generado un interés especial. Por lo tanto, nuestro primer objetivo fue investigar los efectos sobre la función ovárica adulta en ratas nacidas de madres tratadas con dosis bajas de BPA por vía oral durante la gestación y la lactancia (BPA50: 50 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{día}$; BPA0.5: 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{día}$). Para explorar posibles vías de acción del BPA, nos propusimos investigar diferentes vías de señalización relacionadas con la foliculogénesis y la esteroidogénesis (expresión de $\text{RE}\alpha$, $\text{RE}\beta$, RA, p27, enzimas esteroidogénicas y receptores de gonadotrofinas). Los resultados correspondientes a este capítulo muestran algunas disfunciones ováricas en hembras adultas nacidas de madres tratadas con bajas dosis de BPA por vía oral durante el período perinatal (período que abarca desde el día 9 de gestación hasta el final de la lactancia). Estas disfunciones comprenden un menor reclutamiento inicial asociado a un desbalance en la expresión de RA entre las poblaciones foliculares primordial/primario y un mayor número de cuerpos lúteos (indicio de incremento en el número de ovocitos ovulados), junto con mayores niveles de progesterona sérica. Nuestros resultados sugieren además que las dos dosis testeadas (BPA50 y BPA0.5) podrían afectar las últimas etapas del desarrollo folicular a través de mecanismos diferentes: por una menor expresión del RA en los ovarios de animales expuestos a BPA50, y un aumento de la sensibilidad a FSH en los animales expuestos a BPA0.5. En conjunto, nuestros resultados son una nueva evidencia de que BPA es capaz de afectar los estadios tempranos del desarrollo ovárico con consecuencias funcionales en la edad adulta.

Capítulo 2. EFECTOS DEL BPA SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA AL TRATAMIENTO CON GONADOTROFINAS EXÓGENAS EN RATAS.

Teniendo en cuenta los resultados del capítulo 1, nos propusimos estudiar la respuesta ovárica a un tratamiento con gonadotrofinas exógenas, en ratas inmaduras, nacidas de

madres tratadas con BPA por vía oral durante el período perinatal. Para simplificar el análisis de los resultados agrupamos los mismos como estados ováricos posteriores al tratamiento con PMSG por un lado, y a hCG por el otro. Pudimos observar que el desarrollo folicular luego del tratamiento con PMSG fue mayor en los ovarios de las hembras que estuvieron expuestas a BPA50 durante el período perinatal. Este estímulo en la foliculogénesis se evidencia por un tamaño mayor de la población de folículos en crecimiento, compuesto principalmente por un incremento de la subpoblación de folículos antrales chicos. Este incremento en el desarrollo folicular estuvo asociado a mayor expresión de FSHR y LHR, de las enzimas esteroidogénicas Cyp17 y Cyp19, así como también de RA y RE β . En base a estos cambios, pensamos que la exposición a BPA en etapas tempranas de la vida prenatal y postnatal causa una mayor susceptibilidad de los folículos ováricos a la acción de la FSH.

La respuesta a hCG se tradujo en una mayor incidencia de folículos atrésicos sin cambios en la ovulación, con un menor tamaño de CL. Al comparar los patrones de dinámica folicular obtenidas, podemos concluir que un porcentaje de la mayor población de folículos antrales chicos que encontramos luego del tratamiento con PMSG, ingresó en un proceso de atresia folicular en respuesta a hCG, reduciéndose de esta manera el número de ovocitos con posibilidad de ser ovulados. Nuestros resultados muestran que la exposición perinatal a una dosis de BPA considerada como segura, condiciona la capacidad de respuesta del ovario a un tratamiento con gonadotrofinas exógenas.

Capítulo 3. ACCIÓN DEL BPA EN EL ENSAMBLADO FOLICULAR EN CULTIVOS DE OVARIOS ENTEROS

Durante el desarrollo fetal de la rata, en el ovario los ovocitos se disponen en clusters denominados “nidos” o “quistes” de células germinales. Al nacimiento se produce la ruptura de estos nidos y los ovocitos se rodean de células de la pre-granulosa para formar los folículos primordiales, los que constituyen el *pool* de gametos disponibles en una hembra durante toda su vida reproductiva. Las hormonas esteroides juegan un rol importante en la ruptura de los nidos: los altos niveles de estradiol en el ovario fetal mantiene los ovocitos en los nidos y la caída de los niveles de estradiol al nacimiento causa la ruptura de los mismos. Nuestro objetivo fue profundizar el estudio de los *efectos directos* del BPA sobre la formación de folículos primordiales, en cultivos de ovarios enteros. Los ovarios expuestos *in vitro* a E2 o BPA mostraron un mayor

porcentaje de ovocitos no ensamblados en folículos primordiales y una menor expresión de Foxl2 en los ovarios expuestos a BPA. Estos resultados nos permiten concluir que el BPA actuaría de manera similar a E2, siendo capaz de inhibir la ruptura de los nidos de células germinales y el posterior ensamblado folicular en cultivos de ovarios enteros. Durante la ruptura de los nidos y el ensamblado folicular, la menor expresión de Foxl2 inhibe la invasión de los nidos por las células de la pre-granulosa, por lo que los resultados obtenidos sugieren otro posible mecanismo de acción por el que BPA estaría inhibiendo el ensamblado folicular. Otro indicio a favor de que BPA estaría actuando sobre el ensamblado de los folículos modificando la expresión de Foxl2, lo obtuvimos utilizando una especie de estudio diferente (ratones OCT4-GFP). Estos resultados en conjunto, agregan evidencia a la capacidad de BPA de impactar de forma directa sobre procesos tempranos del desarrollo ovárico, y también nos permiten proponer al cultivo de ovarios enteros como una metodología adecuada para la detección de acción estrogénica de contaminantes ambientales.

Capítulo 4. LA EXPOSICIÓN NEONATAL A XENOESTRÓGENOS ALTERA LA RESPUESTA OVÁRICA AL TRATAMIENTO CON GONADOTROFINA EN CORDERAS

En su fisiología ovárica, la oveja se asemeja más a la mujer que a los roedores. Durante el desarrollo de la tesis doctoral del Dr. Oscar Rivera (2013) realizada en nuestro laboratorio, observamos que en las ovejas, la exposición a bajas dosis de BPA o DES desde el nacimiento hasta el DPN14 causó una disminución en el *stock* de folículos primordiales asociado a un incremento del desarrollo folicular, aumento de la folículos atrésicos, y una mayor incidencia de FMO en DPN30. Además, en este mismo trabajo observamos que la respuesta ovárica a un tratamiento exógeno con oFSH está alterada. Concretamente, las corderas prepúberes expuestas a BPA o DES durante los primeros 14 días de vida posnatal tienen un escaso desarrollo folicular y bajos niveles de estradiol en respuesta al tratamiento con oFSH. El sistema de las BMP, tiene un papel de relevancia en el control de la dinámica folicular y la tasa de ovulación. Se han descubierto una serie de factores pertenecientes a esta familia que influyen en la regulación del desarrollo folicular (BMP6, BMP15, GDF9), que en la oveja estarían asociados con un normal desarrollo folicular en respuesta a FSH y que intervendrían en el control del número de ovulaciones. Por lo tanto, en el presente capítulo nos propusimos estudiar si las alteraciones causadas por BPA o DES en la respuesta

folicular del ovario al tratamiento con oFSH podrían estar asociadas a alteraciones en la expresión de BMP en ovejas prepúberes. Se observó un aumento en los niveles de expresión del ARNm de GDF9 en las corderas en respuesta a oFSH, previamente tratadas con DES o BPA50. Conjuntamente, los resultados obtenidos nos permiten postular una relación entre la menor capacidad de respuesta del ovario a FSH exógena y anomalías de expresión en algunos componentes del sistema BMP.

Los resultados detallados en esta tesis doctoral fundamentan la preocupación mundial por la creciente exposición a sustancias catalogadas como estrógenos ambientales, y demuestran que el desarrollo folicular y la síntesis esteroideogénica ováricas son un blanco de acción constante de los mismos.

IX- ABSTRACT

Love the life you live, live the life you love.

Bob Marley

Sex steroid hormones, through its specific receptors, play an important role in the differentiation and development of the reproductive system, in ovarian function regulation and maintenance of female fertility. ED are substances having the ability to mimic or antagonize endogenous hormones. By its particular mechanism of toxicity, all hormonal processes are potentially sensitive to ED action. Those ED acting altering any pathway estrogens action, are called environmental estrogens or xenoestrogens.

Our hypothesis postulated that exposure to chemicals classified as xenoestrogens in hormone-sensitive periods of prenatal and early postnatal development induces alterations in critical processes involved in the normal development of the gonads and the female reproductive tract, impacting negatively on the reproductive capacity in adulthood.

Among the most studied and used xenoestrogens we mention BPA and DES. DES was widely used in pregnant women during the 1950s and 1960s, it was administered to prevent spontaneous abortions and pregnancy complications. BPA is one of the highest volume chemicals produced worldwide. BPA attracted the attention of regulatory agencies and scientists from many countries due to the high humans and animals exposure, and the effects during the most susceptible stages of development: fetal, neonatal, prepubertal and pubertal.

While there are many studies showing effects of these two xenoestrogens on ovarian development, there are aspects that have not been studied in detail and have been identified as important in the study of endocrine disruption related to ovary functionality. This mainly refers to the need to:

- Assess exposure during early periods of development, which reflects exposure during fetal life and/or during the postnatal stage during lactation,
- Studying the effects that early exposure may have later in adult life,
- Investigate the exposure to low orally doses through the diet,
- Tell apart between direct or indirect effects on the ovary.

Therefore, objectives and experiments to be described are intended to answer, at least in part, these questions.

Chapter 1. OVARIAN DYSFUNCTION IN ADULT RATS BORN TO MOTHERS TREATED WITH LOW DOSES OF BPA ORALLY.

The study of oral exposure to BPA during the perinatal period and its effects on ovarian functionality in adulthood has generated special interest. Therefore, our first objective was to investigate the effects on ovarian function in adult rats born to mothers treated with low doses of BPA orally during gestation and breastfeeding (BPA50: 50 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{day}$; BPA0.5: 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{day}$). To explore potential mechanisms of BPA actions, we investigated different signaling pathways related to folliculogenesis and steroidogenesis (expression of ER α , ER β , AR, p27, steroidogenic enzymes and gonadotropin receptors). The results for this chapter show some ovarian dysfunction in adult females born to mothers treated with low doses of BPA orally during the perinatal period (period beginning on day 9 of gestation until the end of breastfeeding). These disorders comprise a lower initial recruitment associated with an imbalance in RA expression between primary/primary follicular populations and a greater number of corpora lutea (indicating an increased number of ovulated oocytes), coupled with higher levels of serum progesterone. Our results also suggest that the two tested doses (BPA50 and BPA0.5) could affect the later stages of follicular development through different mechanisms: by lower AR expression in ovaries of animals exposed to BPA50 and an increased sensitivity to FSH in animals exposed to BPA0.5. Taken together, our results are further evidence that BPA is able to affect the early stages of ovarian development with functional consequences in adulthood.

Chapter 2. BPA EFFECTS ON OVARIAN RESPONSE TO GONADOTROPINS TREATMENT IN RATS.

Taking into account the results of Chapter 1, we set out to study of ovarian response to treatment with exogenous gonadotropins in immature rats born to mothers exposed to BPA orally during the perinatal period. To simplify the analysis the results were grouped as ovarian states after treatment with PMSG and after treatment with hCG. We observed that follicular development after PMSG treatment was higher in female ovaries exposed to BPA50 during the perinatal period. This change in folliculogenesis is evidenced by a larger population of growing follicles, mainly an increase in the subpopulation of small antral follicles. This increase in follicular development was associated with an increased expression of FSHR, LHR, CYP17 and Cyp19, as well as RA and RE β . Based on these changes, we think that exposure to BPA in early life (prenatal and postnatal) cause increased susceptibility of ovarian follicles to FSH action.

The response to hCG resulted in an increased incidence of atretic follicles unchanged at ovulation, with smaller CL. When comparing patterns obtained from follicular dynamics, we can conclude that a percentage of population of small antral follicles after treatment with PMSG, entered in a process of follicular atresia in response to hCG, thereby reducing the number of oocytes that could be ovulated. Our results show that perinatal exposure to BPA dose considered as safe, condition the ovarian responsiveness to treatment with exogenous gonadotropins.

Chapter 3. BPA ACTION ON FOLLICULAR ASSEMBLY IN OVARIAN WHOLE CULTURE.

During fetal development in the rat, in the ovary the oocytes are arranged in clusters called "nests" or "cysts" of germ cell. At birth the nests breakdown occurs and the oocytes are surrounded by pre-granulosa cells to form primordial follicles, which constitute the pool of female gametes available throughout their reproductive life. Steroid hormones play an important role in follicle assembly: high levels of estradiol in the fetal ovary maintained oocytes in the nests and falling estradiol levels at birth causes the breakdown. Our aim was to deepen the study on direct effects of BPA on primordial follicles formation in cultures of whole ovaries. The ovaries exposed to E2 or BPA *in vitro* showed a higher percentage of oocytes unassembled in primordial follicles and a lower expression of FOXL2 in ovarian exposed to BPA. These results show that BPA act in a similar way that E2, being able to inhibit the breakdown of germ cell and subsequent follicular assembly in cultured of whole ovaries. During the nest breakdown and follicular assembly, the lower expression of FOXL2 inhibits the nests invasion by pre-granulosa cells, so the results suggest another potential mechanism of action by which BPA would be inhibiting follicular assembly. Another indication in favor that BPA would be acting on follicle assembly by affecting the FOXL2 expression, we obtained using a different kind of study (OCT4-GFP mice). These results taken together, added evidence of the ability of BPA to impact directly on early ovarian development processes, and also allow us to propose the whole culture ovaries as a suitable methodology for the detection of estrogenic action of environmental contaminants.

Chapter 4. NEONATAL EXPOSURE TO XENOESTROGENS IMPAIRS OVARIAN RESPONSE TO GONADOTROPIN TREATMENT IN LAMBS.

In the ovarian physiology, the sheep is more like women than rodents. During the development of Dr. Oscar Rivera PhD (2013), performed in our laboratory, we note that in sheep, exposure to low doses of BPA or DES from birth until DPN14 caused a decrease in the stock of primordial follicles associated with an increase of follicular development, an increase in atretic follicles, and an increased incidence of MOF in DPN30. Moreover, in this work we note that the ovarian response to treatment with oFSH exogenous is altered. Specifically, prepubertal lambs exposed to BPA or DES during the first 14 days of postnatal life, have little follicular development and low E2 levels in response to oFSH treatment. BMP system has a prominent role in controlling follicular dynamics and ovulation rate. There have been discovered a number of factors of this family that influence in the regulation of follicular development (BMP6, BMP15, GDF9), that in sheep would be associated with normal follicular development in response to FSH and intervene in the number of ovulations. Therefore, in this chapter we set out to study whether alterations caused by BPA or DES in ovarian follicular response to oFSH treatment might be associated with altered expression of BMP in ewe lambs. An increase in GDF9 levels of mRNA expression was observed in response to oFSH in lambs pretreated with DES or BPA50. Together, the results allow us to postulate a relationship between lower ovarian responsiveness to exogenous FSH and abnormal expression in some components of the BMP system.

The results in this thesis support the global concern about the increasing exposure to substances classified as environmental estrogens, and demonstrate that follicular development and ovarian steroidogenic synthesis is a constant target of their action.

X- BIBLIOGRAFÍA

Tarda en llegar, y al final hay recompensa.

Gustavo Cerati

- Abbott, D.H.; Barnett, D.K.; Bruns, C.M. y Dumesic, D.A. (2005) *Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome?* Hum Reprod Update. 11: 357-374.
- Alonso-Magdalena, P.; Ropero, A.B.; Carrera, M.P.; Cederroth, C.R.; Baquie, M.; Gauthier, B.R.; Nef, S.; Stefani, E. y Nadal, A. (2008) *Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha.* PLoS One. 3: e2069.
- Alonso-Magdalena, P.; Vieira, E.; Soriano, S.; Menes, L.; Burks, D.; Quesada, I. y Nadal, A. (2010) *Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring.* Environ Health Perspect. 118: 1243-1250.
- http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44704/1/9789241502283_eng.pdf
- Bao, B.; Garverick, H.A.; Smith, G.W.; Smith, M.F.; Salfen, B.E. y Youngquist, R.S. (1997) *Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles.* Biol Reprod. 56: 1158-1168.
- Barnes, R.B.; Namnoum, A.B.; Rosenfield, R.L. y Layman, L.C. (2002) *The role of LH and FSH in ovarian androgen secretion and ovarian follicular development: clinical studies in a patient with isolated FSH deficiency and multicystic ovaries.* Hum Reprod. 17: 88-91.
- Beldomenico, P.M.; Rey, F.; Prado, W.S.; Villarreal, J.C.; Munoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2007) *In ovum exposure to pesticides increases the egg weight loss and decreases hatchlings weight of Caiman latirostris (Crocodylia: Alligatoridae).* Ecotoxicol Environ Saf. 68: 246-251.
- Berger, R.G.; Shaw, J. y deCatanzaro, D. (2008) *Impact of acute bisphenol-A exposure upon intrauterine implantation of fertilized ova and urinary levels of progesterone and 17beta-estradiol.* Reprod Toxicol. 26: 94-99.
- Biedermann, S.; Tschudin, P. y Grob, K. (2010) *Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin.* Anal Bioanal Chem. 398: 571-576.
- Bloom, B.; Cohen, R.A. y Freeman, G. (2009) *Summary health statistics for U.S. children: National Health Interview Survey, 2007.* Vital Health Stat 10. 1-80.

- Boland, N.I.; Humpherson, P.G.; Leese, H.J. y Gosden, R.G. (1993) *Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles in vitro*. Biol Reprod. 48: 798-806.
- Bonde, J.P.; Ernst, E.; Jensen, T.K.; Hjollund, N.H.; Kolstad, H.; Henriksen, T.B.; Scheike, T.; Giwercman, A.; Olsen, J. y Skakkebaek, N.E. (1998) *Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners*. Lancet. 352: 1172-1177.
- Borgeest, C.; Greenfeld, C.; Tomic, D. y Flaws, J.A. (2002) *The effects of endocrine disrupting chemicals on the ovary*. Front Biosci. 7: d1941-1948.
- Bosquiazzo, V.L.; Varayoud, J.; Munoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. y Ramos, J.G. (2010) *Effects of neonatal exposure to bisphenol A on steroid regulation of vascular endothelial growth factor expression and endothelial cell proliferation in the adult rat uterus*. Biol Reprod. 82: 86-95.
- Braun, J.M.; Yolton, K.; Dietrich, K.N.; Hornung, R.; Ye, X.; Calafat, A.M. y Lanphear, B.P. (2009) *Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior*. Environ Health Perspect. 117: 1945-1952.
- Britt, K.L. y Findlay, J.K. (2002) *Estrogen actions in the ovary revisited*. J Endocrinol. 175: 269-276.
- Bromer, J.G.; Zhou, Y.; Taylor, M.B.; Doherty, L. y Taylor, H.S. (2010) *Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response*. FASEB J. 24: 2273-2280.
- Byers, M.; Kuiper, G.G.; Gustafsson, J.A. y Park-Sarge, O.K. (1997) *Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins*. Mol Endocrinol. 11: 172-182.
- Cabaton, N.J.; Wadia, P.R.; Rubin, B.S.; Zalko, D.; Schaeberle, C.M.; Askenase, M.H.; Gadbois, J.L.; Tharp, A.P.; Whitt, G.S.; Sonnenschein, C.; y col. (2011) *Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice*. Environ Health Perspect. 119: 547-552.

- Caione, P. (2009) *Prevalence of hypospadias in European countries: is it increasing?* Eur Urol. 55: 1027-1029; discussion 1029-1030.
- Calafat, A.M.; Weuve, J.; Ye, X.; Jia, L.T.; Hu, H.; Ringer, S.; Huttner, K. y Hauser, R. (2009) *Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants.* Environ Health Perspect. 117: 639-644.
- Calafat, A.M.; Ye, X.; Wong, L.Y.; Reidy, J.A. y Needham, L.L. (2008) *Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004.* Environ Health Perspect. 116: 39-44.
- Campbell, B.K.; Kendall, N.R. y Baird, D.T. (2009) *Effect of direct ovarian infusion of bone morphogenetic protein 6 (BMP6) on ovarian function in sheep.* Biol Reprod. 81: 1016-1023.
- Cantonwine, D.; Meeker, J.D.; Hu, H.; Sanchez, B.N.; Lamadrid-Figueroa, H.; Mercado-Garcia, A.; Fortenberry, G.Z.; Calafat, A.M. y Tellez-Rojo, M.M. (2010) *Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study.* Environ Health. 9: 62.
- Castellino, N.; Bellone, S.; Rapa, A.; Vercellotti, A.; Binotti, M.; Petri, A. y Bona, G. (2005) *Puberty onset in Northern Italy: a random sample of 3597 Italian children.* J Endocrinol Invest. 28: 589-594.
- Cohen, P.E. y Holloway, J.K. (2010) *Predicting gene networks in human oocyte meiosis.* Biol Reprod. 82: 469-472.
- Cook, M.B.; Trabert, B. y McGlynn, K.A. (2011) *Organochlorine compounds and testicular dysgenesis syndrome: human data.* Int J Androl. 34: e68-84; discussion e84-65.
- Couse, J.F.; Curtis Hewitt, S. y Korach, K.S. (2000) *Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues.* J Steroid Biochem Mol Biol. 74: 287-296.
- Couse, J.F.; Yates, M.M.; Deroo, B.J. y Korach, K.S. (2005) *Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins.* Endocrinology. 146: 3247-3262.

- Crain, D.A.; Janssen, S.J.; Edwards, T.M.; Heindel, J.; Ho, S.M.; Hunt, P.; Iguchi, T.; Juul, A.; McLachlan, J.A.; Schwartz, J.; y col. (2008) *Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing*. Fertil Steril. 90: 911-940.
- Crisp, T.M.; Clegg, E.D.; Cooper, R.L.; Wood, W.P.; Anderson, D.G.; Baetcke, K.P.; Hoffmann, J.L.; Morrow, M.S.; Rodier, D.J.; Schaeffer, J.E.; y col. (1998) *Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis*. Environ Health Perspect. 106 Suppl 1: 11-56.
- Crisponi, L.; Deiana, M.; Loi, A.; Chiappe, F.; Uda, M.; Amati, P.; Bisceglia, L.; Zelante, L.; Nagaraja, R.; Porcu, S.; y col. (2001) *The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome*. Nat Genet. 27: 159-166.
- Chandra, A.; Copen, C.E. y Stephen, E.H. (2013) *Infertility and impaired fecundity in the United States, 1982-2010: data from the National Survey of Family Growth*. Natl Health Stat Report. 1-18, 11 p following 19.
- Chen, Y.; Breen, K. y Pepling, M.E. (2009) *Estrogen can signal through multiple pathways to regulate oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary*. J Endocrinol. 202: 407-417.
- Chen, Y.; Jefferson, W.N.; Newbold, R.R.; Padilla-Banks, E. y Pepling, M.E. (2007) *Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo*. Endocrinology. 148: 3580-3590.
- Dallinga, J.W.; Moonen, E.J.; Dumoulin, J.C.; Evers, J.L.; Geraedts, J.P. y Kleinjans, J.C. (2002) *Decreased human semen quality and organochlorine compounds in blood*. Hum Reprod. 17: 1973-1979.
- Darmani, H. y Al-Hiyasat, A.S. (2004) *Reproductive toxic effect of bisphenol A dimethacrylate in mice*. J Biomed Mater Res A. 69: 637-643.
- Daughton, C.G. (2003) *Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. I. Rationale for and avenues toward a green pharmacy*. Environ Health Perspect. 111: 757-774.

- Delclos, K.B.; Camacho, L.; Lewis, S.M.; Vanlandingham, M.M.; Latendresse, J.R.; Olson, G.R.; Davis, K.J.; Patton, R.E.; Gamboa da Costa, G.; Woodling, K.A.; y col. (2014) *Toxicity evaluation of bisphenol A administered by gavage to Sprague Dawley rats from gestation day 6 through postnatal day 90*. Toxicol Sci. 139: 174-197.
- Devine, P.J.; Rajapaksa, K.S. y Hoyer, P.B. (2002) *In vitro ovarian tissue and organ culture: a review*. Front Biosci. 7: d1979-1989.
- Dierich, A.; Sairam, M.R.; Monaco, L.; Fimia, G.M.; Gansmuller, A.; LeMeur, M. y Sassone-Corsi, P. (1998) *Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance*. Proc Natl Acad Sci U S A. 95: 13612-13617.
- DiVall, S.A. y Radovick, S. (2009) *Endocrinology of female puberty*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 16: 1-4.
- diZerega, G.S. y Hodgen, G.D. (1981) *Folliculogenesis in the primate ovarian cycle*. Endocr Rev. 2: 27-49.
- Doerge, D.R.; Twaddle, N.C.; Vanlandingham, M. y Fisher, J.W. (2010a) *Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats*. Toxicol Appl Pharmacol. 247: 158-165.
- Doerge, D.R.; Vanlandingham, M.; Twaddle, N.C. y Delclos, K.B. (2010b) *Lactational transfer of bisphenol A in Sprague-Dawley rats*. Toxicol Lett. 199: 372-376.
- Dorrington, J.H.; Moon, Y.S. y Armstrong, D.T. (1975) *Estradiol-17beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone*. Endocrinology. 97: 1328-1331.
- Driancourt, M.A. (2001) *Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction*. Theriogenology. 55: 1211-1239.
- Drummond, A.E. (2006) *The role of steroids in follicular growth*. Reprod Biol Endocrinol. 4: 16.
- Drummond, A.E.; Baillie, A.J. y Findlay, J.K. (1999) *Ovarian estrogen receptor alpha and beta mRNA expression: impact of development and estrogen*. Mol Cell Endocrinol. 149: 153-161.

- Drummond, A.E.; Britt, K.L.; Dyson, M.; Jones, M.E.; Kerr, J.B.; O'Donnell, L.; Simpson, E.R. y Findlay, J.K. (2002) *Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function*. Mol Cell Endocrinol. 191: 27-33.
- Euling, S.Y.; Herman-Giddens, M.E.; Lee, P.A.; Selevan, S.G.; Juul, A.; Sorensen, T.I.; Dunkel, L.; Himes, J.H.; Teilmann, G. y Swan, S.H. (2008) *Examination of US puberty-timing data from 1940 to 1994 for secular trends: panel findings*. Pediatrics. 121 Suppl 3: S172-191.
- Evans, A.C. y Fortune, J.E. (1997) *Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors*. Endocrinology. 138: 2963-2971.
- Fabre, S.; Pierre, A.; Mulsant, P.; Bodin, L.; Di Pasquale, E.; Persani, L.; Monget, P. y Monniaux, D. (2006) *Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models*. Reprod Biol Endocrinol. 4: 20.
- Fausser, B.C. y Van Heusden, A.M. (1997) *Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences*. Endocr Rev. 18: 71-106.
- Fernandez, M.F.; Arrebola, J.P.; Taoufik, J.; Navalon, A.; Ballesteros, O.; Pulgar, R.; Vilchez, J.L. y Olea, N. (2007) *Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women*. Reprod Toxicol. 24: 259-264.
- Fortune, J.E. (2003) *The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles*. Anim Reprod Sci. 78: 135-163.
- Fowler, P.A.; Dora, N.J.; McFerran, H.; Amezaga, M.R.; Miller, D.W.; Lea, R.G.; Cash, P.; McNeilly, A.S.; Evans, N.P.; Cotinot, C.; y col. (2008) *In utero exposure to low doses of environmental pollutants disrupts fetal ovarian development in sheep*. Mol Hum Reprod. 14: 269-280.
- Franks, S.; Stark, J. y Hardy, K. (2008) *Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome*. Hum Reprod Update. 14: 367-378.
- Gamez, J.M.; Penalba, R.; Cardoso, N.; Bernasconi, P.S.; Carbone, S.; Ponzo, O.; Pandolfi, M.; Scacchi, P. y Reynoso, R. (2015) *Exposure to a low dose of bisphenol A*

impairs pituitary-ovarian axis in prepubertal rats: effects on early folliculogenesis. Environ Toxicol Pharmacol. 39: 9-15.

Gao, X.; Petroff, B.K.; Oluola, O.; Georg, G.; Terranova, P.F. y Rozman, K.K. (2002) *Endocrine disruption by indole-3-carbinol and tamoxifen: blockage of ovulation.* Toxicol Appl Pharmacol. 183: 179-188.

Gao, X.; Petroff, B.K.; Rozman, K.K. y Terranova, P.F. (2000) *Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) partially reverses the inhibitory effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on ovulation in the immature gonadotropin-treated rat.* Toxicology. 147: 15-22.

Gill, A.; Jamnongjit, M. y Hammes, S.R. (2004) *Androgens promote maturation and signaling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis.* Mol Endocrinol. 18: 97-104.

Gill, W.B.; Schumacher, G.F. y Bibbo, M. (1976) *Structural and functional abnormalities in the sex organs of male offspring of mothers treated with diethylstilbestrol (DES).* J Reprod Med. 16: 147-153.

Giusti, R.M.; Iwamoto, K. y Hatch, E.E. (1995) *Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects.* Ann Intern Med. 122: 778-788.

Gondos, B.; Westergaard, L. y Byskov, A.G. (1986) *Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study.* Am J Obstet Gynecol. 155: 189-195.

Goosey, E. y Harrad, S. (2011) *Perfluoroalkyl compounds in dust from Asian, Australian, European, and North American homes and UK cars, classrooms, and offices.* Environ Int. 37: 86-92.

Graham, J.D. y Clarke, C.L. (1997) *Physiological action of progesterone in target tissues.* Endocr Rev. 18: 502-519.

Green, S.; Kumar, V.; Krust, A.; Walter, P. y Chambon, P. (1986) *Structural and functional domains of the estrogen receptor.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 51 Pt 2: 751-758.

- Grive, K.J. y Freiman, R.N. (2015) *The developmental origins of the mammalian ovarian reserve*. *Development*. 142: 2554-2563.
- Guzick, D.S.; Overstreet, J.W.; Factor-Litvak, P.; Brazil, C.K.; Nakajima, S.T.; Coutifaris, C.; Carson, S.A.; Cisneros, P.; Steinkampf, M.P.; Hill, J.A.; y col. (2001) *Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men*. *N Engl J Med*. 345: 1388-1393.
- Hampton, J.H.; Manikkam, M.; Lubahn, D.B.; Smith, M.F. y Garverick, H.A. (2004) *Androgen receptor mRNA expression in the bovine ovary*. *Domest Anim Endocrinol*. 27: 81-88.
- Hanson, M.A. y Gluckman, P.D. (2011) *Developmental origins of health and disease: moving from biological concepts to interventions and policy*. *Int J Gynaecol Obstet*. 115 Suppl 1: S3-5.
- Harris, H.A. (2007) *Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies*. *Mol Endocrinol*. 21: 1-13.
- Haug, L.S.; Huber, S.; Becher, G. y Thomsen, C. (2011) *Characterisation of human exposure pathways to perfluorinated compounds--comparing exposure estimates with biomarkers of exposure*. *Environ Int*. 37: 687-693.
- Hayes, H.M., Jr.; Hoover, R. y Tarone, R.E. (1981) *Bladder cancer in pet dogs: a sentinel for environmental cancer?* *Am J Epidemiol*. 114: 229-233.
- Hegele-Hartung, C.; Siebel, P.; Peters, O.; Kosemund, D.; Muller, G.; Hillisch, A.; Walter, A.; Kraetzschmar, J. y Fritzscheier, K.H. (2004) *Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 5129-5134.
- Hendry, W.J., 3rd; Sheehan, D.M.; Khan, S.A. y May, J.V. (2002) *Developing a laboratory animal model for perinatal endocrine disruption: the hamster chronicles*. *Exp Biol Med (Maywood)*. 227: 709-723.
- Herbst, A.L.; Ulfelder, H. y Poskanzer, D.C. (1971) *Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women*. *N Engl J Med*. 284: 878-881.

- Hild-Petito, S.; Stouffer, R.L. y Brenner, R.M. (1988) *Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle*. Endocrinology. 123: 2896-2905.
- Hillier, S.G. (2001) *Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development*. Mol Cell Endocrinol. 179: 39-46.
- Hillier, S.G. y De Zwart, F.A. (1981) *Evidence that granulosa cell aromatase induction/activation by follicle-stimulating hormone is an androgen receptor-regulated process in-vitro*. Endocrinology. 109: 1303-1305.
- Hillier, S.G. y de Zwart, F.A. (1982) *Androgen/antiandrogen modulation of cyclic AMP-induced steroidogenesis during granulosa cell differentiation in tissue culture*. Mol Cell Endocrinol. 28: 347-361.
- Hillier, S.G. y Tetsuka, M. (1997) *Role of androgens in follicle maturation and atresia*. Baillieres Clin Obstet Gynaecol. 11: 249-260.
- Hirshfield, A.N. (1991) *Development of follicles in the mammalian ovary*. Int Rev Cytol. 124: 43-101.
- Hirshfield, A.N. (1997) *Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist*. Environ Mol Mutagen. 29: 10-15.
- Hirshfield, A.N. y Midgley, A.R., Jr. (1978) *Morphometric analysis of follicular development in the rat*. Biol Reprod. 19: 597-605.
- Horie, K.; Takakura, K.; Fujiwara, H.; Suginami, H.; Liao, S. y Mori, T. (1992) *Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human ovary throughout the menstrual cycle in relation to oestrogen and progesterone receptor expression*. Hum Reprod. 7: 184-190.
- Hoyer, P.B.; Cannady, E.A.; Kroeger, N.A. y Sipes, I.G. (2001) *Mechanisms of ovotoxicity induced by environmental chemicals: 4-vinylcyclohexene diepoxide as a model chemical*. Adv Exp Med Biol. 500: 73-81.
- Hu, Y.C.; Wang, P.H.; Yeh, S.; Wang, R.S.; Xie, C.; Xu, Q.; Zhou, X.; Chao, H.T.; Tsai, M.Y. y Chang, C. (2004) *Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 11209-11214.

- Hugo, E.R.; Brandebourg, T.D.; Woo, J.G.; Loftus, J.; Alexander, J.W. y Ben-Jonathan, N. (2008) *Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes*. Environ Health Perspect. 116: 1642-1647.
- Hunt, P.A.; Koehler, K.E.; Susiarjo, M.; Hodges, C.A.; Ilagan, A.; Voigt, R.C.; Thomas, S.; Thomas, B.F. y Hassold, T.J. (2003) *Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse*. Curr Biol. 13: 546-553.
- Huyghe, E.; Matsuda, T. y Thonneau, P. (2003) *Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review*. J Urol. 170: 5-11.
- Iguchi, T.; Fukazawa, Y.; Uesugi, Y. y Takasugi, N. (1990) *Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol in vivo and in vitro*. Biol Reprod. 43: 478-484.
- Iguchi, T. y Takasugi, N. (1986) *Polyovular follicles in the ovary of immature mice exposed prenatally to diethylstilbestrol*. Anat Embryol (Berl). 175: 53-55.
- Irusta, G.; Pazos, M.C.; Abramovich, D.; De Zuniga, I.; Parborell, F. y Tesone, M. (2013) *Effects of an inhibitor of the gamma-secretase complex on proliferation and apoptotic parameters in a FOXL2-mutated granulosa tumor cell line (KGN)*. Biol Reprod. 89: 9.
- Iwai, T.; Fujii, S.; Nanbu, Y.; Nonogaki, H.; Konishi, I.; Mori, T. y Okamura, H. (1991) *Effect of human chorionic gonadotropin on the expression of progesterone receptors and estrogen receptors in rabbit ovarian granulosa cells and the uterus*. Endocrinology. 129: 1840-1848.
- Jefferson, W.; Newbold, R.; Padilla-Banks, E. y Pepling, M. (2006) *Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse: inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival*. Biol Reprod. 74: 161-168.
- Jefferson, W.N.; Couse, J.F.; Padilla-Banks, E.; Korach, K.S. y Newbold, R.R. (2002) *Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)alpha expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions*. Biol Reprod. 67: 1285-1296.

- Johnson, M.H.y.E., B.J. (2007) *Essential Reproduction*. (Eds.) Blackwell Publishing, Massachusetts 02148-5020, USA.
- Juengel, J.L.; Sawyer, H.R.; Smith, P.R.; Quirke, L.D.; Heath, D.A.; Lun, S.; Wakefield, S.J. y McNatty, K.P. (2002) *Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries*. Mol Cell Endocrinol. 191: 1-10.
- Karnaky, K.J. (1953) *Diethylstilbestrol therapy; long period and high dosage Des therapy*. Med Times. 81: 315-317.
- Kass, L.; Altamirano, G.A.; Bosquiazzo, V.L.; Luque, E.H. y Munoz-de-Toro, M. (2012) *Perinatal exposure to xenoestrogens impairs mammary gland differentiation and modifies milk composition in Wistar rats*. Reprod Toxicol. 33: 390-400.
- Kastner, P.; Krust, A.; Turcotte, B.; Stropp, U.; Tora, L.; Gronemeyer, H. y Chambon, P. (1990) *Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B*. EMBO J. 9: 1603-1614.
- Kelly, J.M.; Kleemann, D.O. y Walker, S.K. (2005) *Enhanced efficiency in the production of offspring from 4- to 8-week-old lambs*. Theriogenology. 63: 1876-1890.
- Kezele, P. y Skinner, M.K. (2003) *Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly*. Endocrinology. 144: 3329-3337.
- Klimentidis, Y.C.; Beasley, T.M.; Lin, H.Y.; Murati, G.; Glass, G.E.; Guyton, M.; Newton, W.; Jorgensen, M.; Heymsfield, S.B.; Kemnitz, J.; y col. (2011) *Canaries in the coal mine: a cross-species analysis of the plurality of obesity epidemics*. Proc Biol Sci. 278: 1626-1632.
- Knobil, E. (1999) *Hormonally active agents in the environment*. (Eds.) National Academy Press, Washington, D.C.
- Kobayashi, K.; Kubota, H.; Ohtani, K.; Hojo, R. y Miyagawa, M. (2012) *Lack of effects for dietary exposure of bisphenol A during in utero and lactational periods on reproductive development in rat offspring*. J Toxicol Sci. 37: 565-573.

- Kuchera, L.K. (1971) *Postcoital contraception with diethylstilbestrol*. JAMA. 218: 562-563.
- Landrigan, P.J. y Goldman, L.R. (2011) *Children's vulnerability to toxic chemicals: a challenge and opportunity to strengthen health and environmental policy*. Health Aff (Millwood). 30: 842-850.
- Lang, I.A.; Galloway, T.S.; Scarlett, A.; Henley, W.E.; Depledge, M.; Wallace, R.B. y Melzer, D. (2008) *Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults*. JAMA. 300: 1303-1310.
- Ledda, S.; Bogliolo, L.; Bebbere, D.; Ariu, F. y Pirino, S. (2010) *Characterization, isolation and culture of primordial germ cells in domestic animals: recent progress and insights from the ovine species*. Theriogenology. 74: 534-543.
- Li, D.K.; Zhou, Z.; Miao, M.; He, Y.; Wang, J.; Ferber, J.; Herrinton, L.J.; Gao, E. y Yuan, W. (2011) *Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality*. Fertil Steril. 95: 625-630 e621-624.
- Li, G.; Zhang, H.; Wang, Y.; Wen, J.; Teng, Z.; Mao, G.; Wang, J.; Guo, M.; Mu, X. y Xia, G. (2011) *Stage-specific mice ovarian somatic cell is involved in primordial folliculogenesis*. Front Biosci (Elite Ed). 3: 1025-1033.
- Li, Y.; Zhang, W.; Liu, J.; Wang, W.; Li, H.; Zhu, J.; Weng, S.; Xiao, S. y Wu, T. (2014) *Prepubertal bisphenol A exposure interferes with ovarian follicle development and its relevant gene expression*. Reprod Toxicol. 44: 33-40.
- Liao, C. y Kannan, K. (2011) *Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: implications for human exposure*. Environ Sci Technol. 45: 9372-9379.
- Loutradis, D.; Bletsas, R.; Aravantinos, L.; Kallianidis, K.; Michalas, S. y Psychoyos, A. (1991) *Preovulatory effects of the progesterone antagonist mifepristone (RU486) in mice*. Hum Reprod. 6: 1238-1240.
- Lunder, S.; Hovander, L.; Athanassiadis, I. y Bergman, A. (2010) *Significantly higher polybrominated diphenyl ether levels in young U.S. children than in their mothers*. Environ Sci Technol. 44: 5256-5262.

- Lydon, J.P.; DeMayo, F.J.; Funk, C.R.; Mani, S.K.; Hughes, A.R.; Montgomery, C.A., Jr.; Shyamala, G.; Conneely, O.M. y O'Malley, B.W. (1995) *Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities*. *Genes Dev.* 9: 2266-2278.
- Maffini, M.V.; Rubin, B.S.; Sonnenschein, C. y Soto, A.M. (2006) *Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A*. *Mol Cell Endocrinol.* 254-255: 179-186.
- Magnusson, U. (2012) *Environmental endocrine disruptors in farm animal reproduction: research and reality*. *Reprod Domest Anim.* 47 Suppl 4: 333-337.
- Malcolm, K.D.; Jackson, L.M.; Bergeon, C.; Lee, T.M.; Padmanabhan, V. y Foster, D.L. (2006) *Long-term exposure of female sheep to physiologic concentrations of estradiol: effects on the onset and maintenance of reproductive function, pregnancy, and social development in female offspring*. *Biol Reprod.* 75: 844-852.
- Markey, C.M.; Coombs, M.A.; Sonnenschein, C. y Soto, A.M. (2003) *Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs*. *Evol Dev.* 5: 67-75.
- Markey, C.M.; Wadia, P.R.; Rubin, B.S.; Sonnenschein, C. y Soto, A.M. (2005) *Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract*. *Biol Reprod.* 72: 1344-1351.
- Martin, J.A.; Kirmeyer, S.; Osterman, M. y Shepherd, R.A. (2009) *Born a bit too early: recent trends in late preterm births*. *NCHS Data Brief.* 1-8.
- McGee, E.A. y Hsueh, A.J. (2000) *Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles*. *Endocr Rev.* 21: 200-214.
- McLachlan, J.A.; Korach, K.S.; Newbold, R.R. y Degen, G.H. (1984) *Diethylstilbestrol and other estrogens in the environment*. *Fundam Appl Toxicol.* 4: 686-691.
- Medicine, I.o. (2007) *Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention*. (Eds.) The National Academies Press, Washington, DC.
- Meijs-Roelofs, H.M.; Kramer, P.; Van Cappellen, W.A. y Van Leeuwen, E.C. (1990) *Effects of a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist in late-juvenile female*

rats: blockade of follicle growth and delay of first ovulation following suppression of gonadotropin concentrations. *Biol Reprod.* 43: 607-613.

Mendola, P.; Messer, L.C. y Rappazzo, K. (2008) *Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult female.* *Fertil Steril.* 89: e81-94.

Metzler, M. (1981) *The metabolism of diethylstilbestrol.* *CRC Crit Rev Biochem.* 10: 171-212.

Milligan, S.R.; Khan, O. y Nash, M. (1998) *Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) plasma.* *Gen Comp Endocrinol.* 112: 89-95.

Mlynarcikova, A.; Fickova, M. y Scsukova, S. (2014) *Impact of endocrine disruptors on ovarian steroidogenesis.* *Endocr Regul.* 48: 201-224.

Mlynarcikova, A.; Kolena, J.; Fickova, M. y Scsukova, S. (2005) *Alterations in steroid hormone production by porcine ovarian granulosa cells caused by bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate.* *Mol Cell Endocrinol.* 244: 57-62.

Mok-Lin, E.; Ehrlich, S.; Williams, P.L.; Petrozza, J.; Wright, D.L.; Calafat, A.M.; Ye, X. y Hauser, R. (2010) *Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF.* *Int J Androl.* 33: 385-393.

Monje, L.; Varayoud, J.; Luque, E.H. y Ramos, J.G. (2007) *Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area.* *J Endocrinol.* 194: 201-212.

Monje, L.; Varayoud, J.; Munoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. y Ramos, J.G. (2010) *Exposure of neonatal female rats to bisphenol A disrupts hypothalamic LHRH pre-mRNA processing and estrogen receptor alpha expression in nuclei controlling estrous cyclicity.* *Reprod Toxicol.* 30: 625-634.

Monniaux, D.; Clement, F.; Dalbies-Tran, R.; Estienne, A.; Fabre, S.; Mansanet, C. y Monget, P. (2014) *The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link?* *Biol Reprod.* 90: 85.

- Montes, G.S. y Luque, E.H. (1988) *Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat*. Acta Anat (Basel). 133: 192-199.
- Moriyama, K.; Tagami, T.; Akamizu, T.; Usui, T.; Saijo, M.; Kanamoto, N.; Hataya, Y.; Shimatsu, A.; Kuzuya, H. y Nakao, K. (2002) *Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist*. J Clin Endocrinol Metab. 87: 5185-5190.
- Motta, P.M.; Makabe, S. y Nottola, S.A. (1997) *The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary*. Hum Reprod Update. 3: 281-295.
- Muncke, J. (2009) *Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source?* Sci Total Environ. 407: 4549-4559.
- Munoz-de-Toro, M.; Beldomenico, H.R.; Garcia, S.R.; Stoker, C.; De Jesus, J.J.; Beldomenico, P.M.; Ramos, J.G. y Luque, E.H. (2006) *Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina*. Environ Res. 102: 107-112.
- Munoz-de-Toro, M.; Markey, C.M.; Wadia, P.R.; Luque, E.H.; Rubin, B.S.; Sonnenschein, C. y Soto, A.M. (2005) *Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice*. Endocrinology. 146: 4138-4147.
- Murray, T.J.; Maffini, M.V.; Ucci, A.A.; Sonnenschein, C. y Soto, A.M. (2007) *Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure*. Reprod Toxicol. 23: 383-390.
- Nah, W.H.; Park, M.J. y Gye, M.C. (2011) *Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice*. Clin Exp Reprod Med. 38: 75-81.
- Newbold, R.R. (2008) *Prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES)*. Fertil Steril. 89: e55-56.
- Newbold, R.R.; Jefferson, W.N.; Padilla-Banks, E. y Haseman, J. (2004) *Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent mice: low versus high dose effects*. Reprod Toxicol. 18: 399-406.

- Newbold, R.R.; Tyrey, S.; Haney, A.F. y McLachlan, J.A. (1983) *Developmentally arrested oviduct: a structural and functional defect in mice following prenatal exposure to diethylstilbestrol*. *Teratology*. 27: 417-426.
- Oktaý, K.; Briggs, D. y Gosden, R.G. (1997) *Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles*. *J Clin Endocrinol Metab*. 82: 3748-3751.
- Oktaý, K.; Schenken, R.S. y Nelson, J.F. (1995) *Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat*. *Biol Reprod*. 53: 295-301.
- Oktem, O. y Oktaý, K. (2008) *The ovary: anatomy and function throughout human life*. *Ann N Y Acad Sci*. 1127: 1-9.
- Orisaka, M.; Jiang, J.Y.; Orisaka, S.; Kotsuji, F. y Tsang, B.K. (2009) *Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis*. *Endocrinology*. 150: 2740-2748.
- Owens, J.W. y Chaney, J.G. (2005) *Weighing the results of differing 'low dose' studies of the mouse prostate by Nagel, Cagen, and Ashby: quantification of experimental power and statistical results*. *Regul Toxicol Pharmacol*. 43: 194-202.
- Padmanabhan, V. y Veiga-Lopez, A. (2013) *Sheep models of polycystic ovary syndrome phenotype*. *Mol Cell Endocrinol*. 373: 8-20.
- Palmer, J.R.; Wise, L.A.; Hatch, E.E.; Troisi, R.; Titus-Ernstoff, L.; Strohsnitter, W.; Kaufman, R.; Herbst, A.L.; Noller, K.L.; Hyer, M.; y col. (2006) *Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15: 1509-1514.
- Palmlund, I. (1996) *Exposure to a xenoestrogen before birth: the diethylstilbestrol experience*. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 17: 71-84.
- Palmlund, I.; Apfel, R.; Buitendijk, S.; Cabau, A. y Forsberg, J.G. (1993) *Effects of diethylstilbestrol (DES) medication during pregnancy: report from a symposium at the 10th international congress of ISPOG*. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 14: 71-89.
- Paredes, A.; Garcia-Rudaz, C.; Kerr, B.; Tapia, V.; Dissen, G.A.; Costa, M.E.; Cornea, A. y Ojeda, S.R. (2005) *Loss of synaptonemal complex protein-1, a synaptonemal*

complex protein, contributes to the initiation of follicular assembly in the developing rat ovary. Endocrinology. 146: 5267-5277.

Park, O.K. y Mayo, K.E. (1991) *Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge.* Mol Endocrinol. 5: 967-978.

Parkes, A.S.; Dodds, E.C. y Noble, R.L. (1938) *Interruption of Early Pregnancy by Orally Active Oestrogens.* Br Med J. 2: 557-559.

Parrott, J.A. y Skinner, M.K. (1999) *Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis.* Endocrinology. 140: 4262-4271.

Pepling, M.E. (2006) *From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development.* Genesis. 44: 622-632.

Pepling, M.E. (2012) *Follicular assembly: mechanisms of action.* Reproduction. 143: 139-149.

Pepling, M.E. y Spradling, A.C. (2001) *Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles.* Dev Biol. 234: 339-351.

Peretz, J.; Gupta, R.K.; Singh, J.; Hernandez-Ochoa, I. y Flaws, J.A. (2011) *Bisphenol A impairs follicle growth, inhibits steroidogenesis, and downregulates rate-limiting enzymes in the estradiol biosynthesis pathway.* Toxicol Sci. 119: 209-217.

Peretz, J.; Vrooman, L.; Ricke, W.A.; Hunt, P.A.; Ehrlich, S.; Hauser, R.; Padmanabhan, V.; Taylor, H.S.; Swan, S.H.; VandeVoort, C.A.; y col. (2014) *Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013.* Environ Health Perspect. 122: 775-786.

Petersen, D.N.; Tkalcevic, G.T.; Koza-Taylor, P.H.; Turi, T.G. y Brown, T.A. (1998) *Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues.* Endocrinology. 139: 1082-1092.

Petroff, B.K.; Gao, X.; Rozman, K.K. y Terranova, P.F. (2000) *Interaction of estradiol and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in an ovulation model: evidence for systemic potentiation and local ovarian effects.* Reprod Toxicol. 14: 247-255.

- Petroff, B.K.; Roby, K.F.; Gao, X.; Son, D.; Williams, S.; Johnson, D.; Rozman, K.K. y Terranova, P.F. (2001) *A review of mechanisms controlling ovulation with implications for the anovulatory effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in rodents*. Toxicology. 158: 91-107.
- Pleis, J.R.; Ward, B.W. y Lucas, J.W. (2010) *Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2009*. Vital Health Stat 10. 1-207.
- Prins, G.S.; Tang, W.Y.; Belmonte, J. y Ho, S.M. (2008) *Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis*. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 102: 134-138.
- Prizant, H.; Gleicher, N. y Sen, A. (2014) *Androgen actions in the ovary: balance is key*. J Endocrinol. 222: R141-151.
- Prüss-Üstün, A.y.C., C. (2006) *Chap. 5. Analysis of estimates of the environmentally attributable fraction, by disease*.
http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/preventingdisease.pdf?ua=1
- Pryse-Davies, J. y Dewhurst, C.J. (1971) *The development of the ovary and uterus in the foetus, newborn and infant: a morphological and enzyme histochemical study*. J Pathol. 103: 5-25.
- Rajah, R.; Glaser, E.M. y Hirshfield, A.N. (1992) *The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis*. Dev Dyn. 194: 177-192.
- Rajareddy, S.; Reddy, P.; Du, C.; Liu, L.; Jagarlamudi, K.; Tang, W.; Shen, Y.; Berthet, C.; Peng, S.L.; Kaldis, P.; y col. (2007) *p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice*. Mol Endocrinol. 21: 2189-2202.
- Rajkovic, A.; Pangas, S.A.; Ballow, D.; Suzumori, N. y Matzuk, M.M. (2004) *NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression*. Science. 305: 1157-1159.
- Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Bosquiazzo, V.L.; Luque, E.H. y Munoz-de-Toro, M. (2002) *Cellular turnover in the rat uterine cervix and its relationship to estrogen and progesterone receptor dynamics*. Biol Reprod. 67: 735-742.

- Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Kass, L.; Rodriguez, H.; Costabel, L.; Munoz-De-Toro, M. y Luque, E.H. (2003) *Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats*. *Endocrinology*. 144: 3206-3215.
- Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Monje, L.; Moreno-Piovano, G.; Munoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2007) *Diethylstilbestrol alters the population dynamic of neural precursor cells in the neonatal male rat dentate gyrus*. *Brain Res Bull*. 71: 619-627.
- Richards, J.S. y Kersey, K.A. (1979) *Changes in theca and granulosa cell function in antral follicles developing during pregnancy in the rat: gonadotropin receptors, cyclic AMP and estradiol-17 beta*. *Biol Reprod*. 21: 1185-1201.
- Richards, J.S. y Rolfes, A.I. (1980) *Hormonal regulation of cyclic AMP binding to specific receptor proteins in rat ovarian follicles. Characterization by photoaffinity labeling*. *J Biol Chem*. 255: 5481-5489.
- Richiardi, L.; Bellocco, R.; Adami, H.O.; Torrang, A.; Barlow, L.; Hakulinen, T.; Rahu, M.; Stengrevics, A.; Storm, H.; Tretli, S.; y col. (2004) *Testicular cancer incidence in eight northern European countries: secular and recent trends*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13: 2157-2166.
- Richter, C.A.; Birnbaum, L.S.; Farabollini, F.; Newbold, R.R.; Rubin, B.S.; Talsness, C.E.; Vandenberg, J.G.; Walser-Kuntz, D.R. y vom Saal, F.S. (2007) *In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies*. *Reprod Toxicol*. 24: 199-224.
- Rivera, O.E. (2013) *Efectos de la exposición postnatal a estrógenos ambientales (xenoestrógenos) sobre el desarrollo folicular en ovejas*. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.
- Rivera, O.E.; Varayoud, J.; Rodriguez, H.A.; Munoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2011) *Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb*. *Reprod Toxicol*. 32: 304-312.
- Rivera, O.E.; Varayoud, J.; Rodriguez, H.A.; Santamaria, C.G.; Bosquiazzo, V.L.; Osti, M.; Belmonte, N.M.; Munoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2015) *Neonatal exposure to xenoestrogens impairs the ovarian response to gonadotropin treatment in lambs*. *Reproduction*. 149: 645-655.

- Robker, R.L.; Russell, D.L.; Espey, L.L.; Lydon, J.P.; O'Malley, B.W. y Richards, J.S. (2000) *Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases*. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 4689-4694.
- Rodriguez, H.A.; Santambrosio, N.; Santamaria, C.G.; Munoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2010) *Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary*. Reprod Toxicol. 30: 550-557.
- Ross, M.H.K., G. I. y Pawlina, W. (2005) *Aparato genital femenino*. En: *Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular. 4ta Edición*, (Eds.), Editorial medica Panamericana. , p. 728-765.
- Rubin, B.S. (2011) *Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects*. J Steroid Biochem Mol Biol. 127: 27-34.
- Rubin, B.S.; Lenkowski, J.R.; Schaeberle, C.M.; Vandenberg, L.N.; Ronsheim, P.M. y Soto, A.M. (2006) *Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A*. Endocrinology. 147: 3681-3691.
- Rubin, B.S.; Murray, M.K.; Damassa, D.A.; King, J.C. y Soto, A.M. (2001) *Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels*. Environ Health Perspect. 109: 675-680.
- Rubin, M.M. (2007) *Antenatal exposure to DES: lessons learned...future concerns*. Obstet Gynecol Surv. 62: 548-555.
- Ruenitz, P.C.; Bourne, C.S.; Sullivan, K.J. y Moore, S.A. (1996) *Estrogenic triarylethylene acetic acids: effect of structural variation on estrogen receptor affinity and estrogenic potency and efficacy in MCF-7 cells*. J Med Chem. 39: 4853-4859.
- Safe, S.H. (1999) *Environmental Estrogens*. En: *Encyclopedia of Reproduction*, (Eds.), Academic Press. , p. 1100.
- Savabieasfahani, M.; Kannan, K.; Astapova, O.; Evans, N.P. y Padmanabhan, V. (2006) *Developmental programming: differential effects of prenatal exposure to bisphenol-A or methoxychlor on reproductive function*. Endocrinology. 147: 5956-5966.

- Sawyer, H.R.; Smith, P.; Heath, D.A.; Juengel, J.L.; Wakefield, S.J. y McNatty, K.P. (2002) *Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep*. Biol Reprod. 66: 1134-1150.
- Scaramuzzi, R.J.; Baird, D.T.; Campbell, B.K.; Driancourt, M.A.; Dupont, J.; Fortune, J.E.; Gilchrist, R.B.; Martin, G.B.; McNatty, K.P.; McNeilly, A.S.; y col. (2011) *Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants*. Reprod Fertil Dev. 23: 444-467.
- Scheerlinck, J.P.; Snibson, K.J.; Bowles, V.M. y Sutton, P. (2008) *Biomedical applications of sheep models: from asthma to vaccines*. Trends Biotechnol. 26: 259-266.
- Sekiguchi, S.; Ito, S. y Honma, T. (2003) *Experimental model to study reproductive toxicity of chemicals using induced ovulation in immature F344 rats*. Ind Health. 41: 287-290.
- Semiz, S.; Kurt, F.; Kurt, D.T.; Zencir, M. y Sevinc, O. (2008) *Pubertal development of Turkish children*. J Pediatr Endocrinol Metab. 21: 951-961.
- Shankaran, H.; Wiley, H.S. y Resat, H. (2007) *Receptor downregulation and desensitization enhance the information processing ability of signalling receptors*. BMC Syst Biol. 1: 48.
- Shelby, M.D. (2008) *NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A*. NTP CERHR MON. v, vii-ix, 1-64 passim.
- Shiina, H.; Matsumoto, T.; Sato, T.; Igarashi, K.; Miyamoto, J.; Takemasa, S.; Sakari, M.; Takada, I.; Nakamura, T.; Metzger, D.; y col. (2006) *Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A. 103: 224-229.
- Shikone, T.; Kokawa, K.; Yamoto, M. y Nakano, R. (1997) *Apoptosis of human ovary and uterine endometrium during the menstrual cycle*. Horm Res. 48 Suppl 3: 27-34.
- Skakkebaek, N.E. (2010) *Normal reference ranges for semen quality and their relations to fecundity*. Asian J Androl. 12: 95-98.
- Skinner, M.K. (2005) *Regulation of primordial follicle assembly and development*. Hum Reprod Update. 11: 461-471.

- Slomczynska, M. y Tabarowski, Z. (2001) *Localization of androgen receptor and cytochrome P450 aromatase in the follicle and corpus luteum of the porcine ovary*. Anim Reprod Sci. 65: 127-134.
- Slomczynska, M.; Tabarowski, Z.; Duda, M.; Burek, M. y Knapczyk, K. (2006) *Androgen receptor in early apoptotic follicles in the porcine ovary at pregnancy*. Folia Histochem Cytobiol. 44: 185-188.
- Smith, P.; Steckler, T.L.; Veiga-Lopez, A. y Padmanabhan, V. (2009) *Developmental programming: differential effects of prenatal testosterone and dihydrotestosterone on follicular recruitment, depletion of follicular reserve, and ovarian morphology in sheep*. Biol Reprod. 80: 726-736.
- Sohoni, P. y Sumpter, J.P. (1998) *Several environmental oestrogens are also anti-androgens*. J Endocrinol. 158: 327-339.
- Soto, A.M.; Lin, T.M.; Sakabe, K.; Olea, N.; Damassa, D.A. y Sonnenschein, C. (1995) *Variants of the human prostate LNCaP cell line as tools to study discrete components of the androgen-mediated proliferative response*. Oncol Res. 7: 545-558.
- Spelsberg, T.C.; Steggle, A.W.; Chytil, F. y O'Malley, B.W. (1972) *Progesterone-binding components of chick oviduct. V. Exchange of progesterone-binding capacity from target to nontarget tissue chromatins*. J Biol Chem. 247: 1368-1374.
- Stahlhut, R.W.; Welshons, W.V. y Swan, S.H. (2009) *Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both*. Environ Health Perspect. 117: 784-789.
- Steckler, T.; Wang, J.; Bartol, F.F.; Roy, S.K. y Padmanabhan, V. (2005) *Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment*. Endocrinology. 146: 3185-3193.
- Stoker, C.; Beldomenico, P.M.; Bosquiazzo, V.L.; Zayas, M.A.; Rey, F.; Rodriguez, H.; Munoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2008) *Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in Caiman latirostris*. Gen Comp Endocrinol. 156: 603-612.

- Stoker, C.; Repetti, M.R.; Garcia, S.R.; Zayas, M.A.; Galoppo, G.H.; Beldomenico, H.R.; Luque, E.H. y Munoz-de-Toro, M. (2011) *Organochlorine compound residues in the eggs of broad-snouted caimans (Caiman latirostris) and correlation with measures of reproductive performance*. Chemosphere. 84: 311-317.
- Stoker, C.; Rey, F.; Rodriguez, H.; Ramos, J.G.; Sirosky, P.; Larriera, A.; Luque, E.H. y Munoz-de-Toro, M. (2003) *Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A*. Gen Comp Endocrinol. 133: 287-296.
- Stoker, C.; Zayas, M.A.; Ferreira, M.A.; Durando, M.; Galoppo, G.H.; Rodriguez, H.A.; Repetti, M.R.; Beldomenico, H.R.; Caldini, E.G.; Luque, E.H.; y col. (2013) *The eggshell features and clutch viability of the broad-snouted caiman (Caiman latirostris) are associated with the egg burden of organochlorine compounds*. Ecotoxicol Environ Saf. 98: 191-195.
- Sugiura-Ogasawara, M.; Ozaki, Y.; Sonta, S.; Makino, T. y Suzumori, K. (2005) *Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage*. Hum Reprod. 20: 2325-2329.
- Susiarjo, M.; Hassold, T.J.; Freeman, E. y Hunt, P.A. (2007) *Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse*. PLoS Genet. 3: e5.
- Suter, D. (2005) *Ovarian physiology*. En: *Ovarian Toxicology* (Eds.: Hayes, A.W.T., J. A.; Gardner, D. E.), Boca Raton London New York Washington, D.C, p. 1-3.
- Suzuki, A.; Sugihara, A.; Uchida, K.; Sato, T.; Ohta, Y.; Katsu, Y.; Watanabe, H. y Iguchi, T. (2002) *Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice*. Reprod Toxicol. 16: 107-116.
- Suzumori, N.; Yan, C.; Matzuk, M.M. y Rajkovic, A. (2002) *Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes*. Mech Dev. 111: 137-141.
- Szoltys, M. y Slomczynska, M. (2000) *Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles*. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 108: 228-234.

- Tabb, M.M. y Blumberg, B. (2006) *New modes of action for endocrine-disrupting chemicals*. Mol Endocrinol. 20: 475-482.
- Taylor, J.A.; Welshons, W.V. y Vom Saal, F.S. (2008) *No effect of route of exposure (oral; subcutaneous injection) on plasma bisphenol A throughout 24h after administration in neonatal female mice*. Reprod Toxicol. 25: 169-176.
- Terranova P, F.R., K. K. (2005) *Ovarian toxicity caused by endocrine disruptors*. En: *Ovarian Toxicology*, (Eds.: Hoyer, P.B.), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida., p. 65.
- Tetsuka, M.; Whitelaw, P.F.; Bremner, W.J.; Millar, M.R.; Smyth, C.D. y Hillier, S.G. (1995) *Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary*. J Endocrinol. 145: 535-543.
- Tharp, A.P.; Maffini, M.V.; Hunt, P.A.; VandeVoort, C.A.; Sonnenschein, C. y Soto, A.M. (2012) *Bisphenol A alters the development of the rhesus monkey mammary gland*. Proc Natl Acad Sci U S A. 109: 8190-8195.
- Theobald, H.M. y Peterson, R.E. (1997) *In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: effects on development of the male and female reproductive system of the mouse*. Toxicol Appl Pharmacol. 145: 124-135.
- Tilly, J.L. (2003) *Ovarian follicle counts--not as simple as 1, 2, 3*. Reprod Biol Endocrinol. 1: 11.
- Tingen, C.; Kim, A. y Woodruff, T.K. (2009) *The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries*. Mol Hum Reprod. 15: 795-803.
- Toran-Allerand, C.D. (1984) *On the genesis of sexual differentiation of the general nervous system: morphogenetic consequences of steroidal exposure and possible role of alpha-fetoprotein*. Prog Brain Res. 61: 63-98.
- Trombly, D.J.; Woodruff, T.K. y Mayo, K.E. (2009) *Suppression of Notch signaling in the neonatal mouse ovary decreases primordial follicle formation*. Endocrinology. 150: 1014-1024.
- Trudel, D.; Scheringer, M.; von Goetz, N. y Hungerbuhler, K. (2011) *Total consumer exposure to polybrominated diphenyl ethers in North America and Europe*. Environ Sci Technol. 45: 2391-2397.

- Uda, M.; Ottolenghi, C.; Crisponi, L.; Garcia, J.E.; Deiana, M.; Kimber, W.; Forabosco, A.; Cao, A.; Schlessinger, D. y Pilia, G. (2004) *Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development*. Hum Mol Genet. 13: 1171-1181.
- van der Schoot, P.; Bakker, G.H. y Klijn, J.G. (1987) *Effects of the progesterone antagonist RU486 on ovarian activity in the rat*. Endocrinology. 121: 1375-1382.
- Vandenberg, L.N.; Colborn, T.; Hayes, T.B.; Heindel, J.J.; Jacobs, D.R., Jr.; Lee, D.H.; Shioda, T.; Soto, A.M.; vom Saal, F.S.; Welshons, W.V.; y col. (2012) *Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses*. Endocr Rev. 33: 378-455.
- Vandenberg, L.N.; Chahoud, I.; Heindel, J.J.; Padmanabhan, V.; Paumgartten, F.J. y Schoenfelder, G. (2010) *Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A*. Environ Health Perspect. 118: 1055-1070.
- Vandenberg, L.N.; Hauser, R.; Marcus, M.; Olea, N. y Welshons, W.V. (2007) *Human exposure to bisphenol A (BPA)*. Reprod Toxicol. 24: 139-177.
- Vandenberg, L.N.; Maffini, M.V.; Schaeberle, C.M.; Ucci, A.A.; Sonnenschein, C.; Rubin, B.S. y Soto, A.M. (2008) *Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice*. Reprod Toxicol. 26: 210-219.
- Vandenberg, L.N.; Maffini, M.V.; Sonnenschein, C.; Rubin, B.S. y Soto, A.M. (2009) *Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption*. Endocr Rev. 30: 75-95.
- Varayoud, J.; Monje, L.; Bernhardt, T.; Munoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. y Ramos, J.G. (2008a) *Endosulfan modulates estrogen-dependent genes like a non-uterotrophic dose of 17beta-estradiol*. Reprod Toxicol. 26: 138-145.
- Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Bosquiazzo, V.L.; Lower, M.; Munoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2011) *Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites*. Endocrinology. 152: 1101-1111.

- Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Bosquiazso, V.L.; Munoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2008b) *Developmental exposure to Bisphenol a impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult*. *Endocrinology*. 149: 5848-5860.
- Veiga-Lopez, A.; Beckett, E.M.; Abi Salloum, B.; Ye, W. y Padmanabhan, V. (2014) *Developmental programming: prenatal BPA treatment disrupts timing of LH surge and ovarian follicular wave dynamics in adult sheep*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 279: 119-128.
- Ventura, C.; Nunez, M.; Miret, N.; Martinel Lamas, D.; Randi, A.; Venturino, A.; Rivera, E. y Cocca, C. (2012) *Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticide*. *Toxicol Lett*. 213: 184-193.
- Vigizzi, L.; Bosquiazso, V.L.; Kass, L.; Ramos, J.G.; Munoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2015) *Developmental exposure to bisphenol A alters the differentiation and functional response of the adult rat uterus to estrogen treatment*. *Reprod Toxicol*. 52: 83-92.
- Vitt, U.A.; Hayashi, M.; Klein, C. y Hsueh, A.J. (2000) *Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles*. *Biol Reprod*. 62: 370-377.
- Vogel, S.A. (2009) *The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety"*. *Am J Public Health*. 99 Suppl 3: S559-566.
- Volkel, W.; Colnot, T.; Csanady, G.A.; Filser, J.G. y Dekant, W. (2002) *Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration*. *Chem Res Toxicol*. 15: 1281-1287.
- Walters, K.A.; Allan, C.M.; Jimenez, M.; Lim, P.R.; Davey, R.A.; Zajac, J.D.; Illingworth, P. y Handelsman, D.J. (2007) *Female mice haploinsufficient for an inactivated androgen receptor (AR) exhibit age-dependent defects that resemble the AR null phenotype of dysfunctional late follicle development, ovulation, and fertility*. *Endocrinology*. 148: 3674-3684.

- Walters, K.A.; Middleton, L.J.; Joseph, S.R.; Hazra, R.; Jimenez, M.; Simanainen, U.; Allan, C.M. y Handelsman, D.J. (2012) *Targeted loss of androgen receptor signaling in murine granulosa cells of preantral and antral follicles causes female subfertility*. Biol Reprod. 87: 151.
- Walters, K.A.; Simanainen, U. y Handelsman, D.J. (2010) *Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models*. Hum Reprod Update. 16: 543-558.
- Wang, W.; Hafner, K.S. y Flaws, J.A. (2014) *In utero bisphenol A exposure disrupts germ cell nest breakdown and reduces fertility with age in the mouse*. Toxicol Appl Pharmacol. 276: 157-164.
- Ware, V.C. (1982) *The role of androgens in follicular development in the ovary. I. A quantitative analysis of oocyte ovulation*. J Exp Zool. 222: 155-167.
- Wassarman, P.M.y.A.D.F. (1994) *The mammalian ovum. The physiology of reproduction. 2nd ed.* . (Eds.: Knobil, E.y.N., J. D.) RavenPress, New York.
- Welshons, W.V.; Nagel, S.C. y vom Saal, F.S. (2006) *Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure*. Endocrinology. 147: S56-69.
- Welshons, W.V.; Thayer, K.A.; Judy, B.M.; Taylor, J.A.; Curran, E.M. y vom Saal, F.S. (2003) *Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity*. Environ Health Perspect. 111: 994-1006.
- Wilcox, A.J.; Baird, D.D.; Weinberg, C.R.; Hornsby, P.P. y Herbst, A.L. (1995) *Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol*. N Engl J Med. 332: 1411-1416.
- Witorsch, R.J. (2002) *Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature*. Food Chem Toxicol. 40: 905-912.
- Woodruff, T.J.; Axelrad, D.A.; Kyle, A.D.; Nweke, O.; Miller, G.G. y Hurley, B.J. (2004) *Trends in environmentally related childhood illnesses*. Pediatrics. 113: 1133-1140.

- Woodruff, T.J.; Carlson, A.; Schwartz, J.M. y Giudice, L.C. (2008) *Proceedings of the Summit on Environmental Challenges to Reproductive Health and Fertility: executive summary*. Fertil Steril. 89: e1-e20.
- Xi, W.; Lee, C.K.; Yeung, W.S.; Giesy, J.P.; Wong, M.H.; Zhang, X.; Hecker, M. y Wong, C.K. (2011) *Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice*. Reprod Toxicol. 31: 409-417.
- Xu, Z.; Garverick, H.A.; Smith, G.W.; Smith, M.F.; Hamilton, S.A. y Youngquist, R.S. (1995) *Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave*. Biol Reprod. 53: 951-957.
- Yang, M.Y. y Fortune, J.E. (2008) *The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes*. Biol Reprod. 78: 1153-1161.
- Yang, Y.J.; Hong, Y.C.; Oh, S.Y.; Park, M.S.; Kim, H.; Leem, J.H. y Ha, E.H. (2009) *Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women*. Environ Res. 109: 797-801.
- Yoshimizu, T.; Sugiyama, N.; De Felice, M.; Yeom, Y.I.; Ohbo, K.; Masuko, K.; Obinata, M.; Abe, K.; Scholer, H.R. y Matsui, Y. (1999) *Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice*. Dev Growth Differ. 41: 675-684.
- Yuan, W. y Giudice, L.C. (1997) *Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status*. J Clin Endocrinol Metab. 82: 3148-3155.
- Zalko, D.; Jacques, C.; Duplan, H.; Bruel, S. y Perdu, E. (2011) *Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A*. Chemosphere. 82: 424-430.
- Zhang, H.Q.; Zhang, X.F.; Zhang, L.J.; Chao, H.H.; Pan, B.; Feng, Y.M.; Li, L.; Sun, X.F. y Shen, W. (2012) *Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes*. Mol Biol Rep. 39: 5651-5657.

Zhang, T.; Li, L.; Qin, X.S.; Zhou, Y.; Zhang, X.F.; Wang, L.Q.; De Felici, M.; Chen, H.; Qin, G.Q. y Shen, W. (2014) *Di-(2-ethylhexyl) phthalate and bisphenol A exposure impairs mouse primordial follicle assembly in vitro*. Environ Mol Mutagen. 55: 343-353.

Zhou, C.; Wang, W.; Peretz, J. y Flaws, J.A. (2015) *Bisphenol A exposure inhibits germ cell nest breakdown by reducing apoptosis in cultured neonatal mouse ovaries*. Reprod Toxicol. 57: 87-99.