

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



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

***EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A  
BAJAS DOSIS DE BISFENOL A SOBRE EL  
DESARROLLO Y FUNCIONALIDAD DEL  
TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO***

***Lic. Lucía Vigezzi***

*Director de Tesis: Dr. Enrique H. Luque  
Co-Director de Tesis: Dra. Verónica L. Bosquiazzo*

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL, CONICET-  
UNL). Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas  
Universidad Nacional del Litoral

Santa Fe  
**2016**

*"Un sueño que sueñas solo, es solo un sueño. Un sueño que sueñas con alguien, es una realidad..."*

*John Lennon*

*A mis papás, Fanny y Eduardo, que son mi orgullo y ejemplo a seguir. Por acompañarme y motivarme en cada paso que doy*

*A mis hermanos, Cecilia, Carolina y Joaquín, por estar incondicionalmente siempre*

*A mis abuelos, que desde el cielo me guían y protegen*

*A Emilio, por incentivar-me cada día. Por darme alas para que volemos juntos...*

## **Agradecimientos**

A mi director Enrique Luque, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme el apoyo y la confianza necesarios para cumplir esta meta. A Mónica Muñoz de Toro por colaborar con mi trabajo y entregarme su tiempo.

A mi co-directora Verónica Bosquiazzo, por confiar en mí y guiarme con mucho entusiasmo y dedicación a lo largo de estos años.

A mis amigos y compañeros del ISAL con quienes compartí la mayor parte de mis días durante estos años: Flor R., Gaby, Flor A., Aye, Meli, Chula, Nani, Clari, Guille, Cami, Pao, Beti, Rami, Turco, Lau, Merce, Vir, Silvi, Mile, Jor, Ger, Guillito, Guille R., Cori, Horacio, Juanca.

A mis directores del IRB, Núria y Xavi, que me aceptaron en su laboratorio y me brindaron con mucha generosidad sus conocimientos. A mis compañeros del IRB, que me ofrecieron su amistad y cariño durante esos meses.

A mi familia que amo con toda el alma. Porque son mi mayor sostén en la vida y me acompañan incondicionalmente siempre.

A Emi, por su apoyo y paciencia, y por hacer que mis días empiecen y terminen siempre con una sonrisa.

A mis grandes hermanas de la vida: Romi, Nati, Carla y Eli. A mis amigos Mati, Pablo, Dani y Mumi.

A Sabri, Lali y Dolo, porque estuvieron conmigo desde mis primeros días en Santa Fe, y porque hoy nos une una enorme amistad.

A mis amigos de la pro-BioMol '09, con los que tuve el placer de compartir los mejores años de facultad.

A las involuntarias protagonistas de esta tesis, perdón y gracias.

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

Al programa Bec.Ar, por apoyar mi trabajo y crecimiento científico, brindándome los medios para realizar una capacitación en España.

A las autoridades de la Facultad de Bioquímica y de la Universidad Nacional del Litoral, por darme un lugar y apoyar mi crecimiento académico.

A todas aquellas personas que de alguna manera formaron parte de esta importante etapa de mi vida.

## LISTADO DE PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

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

### Publicaciones

- ***A deregulated expression of estrogen-target genes is associated with an altered response to estradiol in aged rats perinatally exposed to bisphenol A.*** Lucía Vigezzi; Jorge G Ramos; Laura Kass; María V. Tschopp; Mónica Muñoz-de-Toro; Enrique H. Luque; Verónica L. Bosquiazzo. Mol Cell Endocrinol. En prensa. DOI: 10.1016/j.mce.2016.02.010.
- ***Developmental exposure to bisphenol A alters the differentiation and functional response of the adult rat uterus to estrogen treatment.*** Lucía Vigezzi; Verónica L. Bosquiazzo; Laura Kass; Jorge G. Ramos; Mónica Muñoz-de-Toro; Enrique H. Luque. Reprod Toxicol. 52:83-92, 2015.
- ***Perinatal exposure to diethylstilbestrol alters the functional differentiation of the adult rat uterus.*** Verónica L. Bosquiazzo; Lucía Vigezzi; Mónica Muñoz-de-Toro; Enrique H. Luque. J Steroid Biochem Mol Biol. 138:1-9, 2013.

### Presentaciones a Congresos

- Lucía Vigezzi, Verónica L. Bosquiazzo, Jorge G. Ramos, Mónica Muñoz-de-Toro, Enrique H. Luque (2014). La exposición perinatal a Bisfenol A modifica la abundancia de transcritos con regiones 5'UTR alternativas del receptor de estrógenos a en el útero de ratas con terapia estrogénica. LIX Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Argentina.
- Verónica L. Bosquiazzo, Lucía Vigezzi, Jorge G. Ramos, Mónica Muñoz-de-Toro, Enrique H. Luque (2014). La exposición a bisfenol A durante el desarrollo altera la diferenciación funcional y la respuesta uterina a un tratamiento con

estrógenos en la rata adulta. LIX Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Argentina.

- Verónica L. Bosquiazzo, **Lucía Vigezzi**, Jorge G. Ramos, Mónica Muñoz-de-Toro, Enrique H. Luque (2013). La edad y la terapia estrogénica como factores predisponentes para el desarrollo de anormalidades uterinas en la rata. LVIII Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Argentina.
- **Lucía Vigezzi**, Verónica L. Bosquiazzo, Jorge G. Ramos, Mónica Muñoz-de-Toro, Enrique H. Luque (2013). Expresión alterada de enzimas claves en la regulación epigenética en el útero de ratas con terapia hormonal de reemplazo y expuestas perinatalmente a Bisfenol A. LVII Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Argentina.
- **Lucía Vigezzi**, Verónica L. Bosquiazzo, Mónica Muñoz-de-Toro, Enrique H. Luque (2012). Efectos de la exposición perinatal a Bisfenol A sobre la diferenciación funcional del útero de ratas adultas con terapia hormonal de reemplazo. LVII Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Argentina.
- **Lucía Vigezzi**, Verónica L. Bosquiazzo, Mónica Muñoz-de-Toro, Enrique H. Luque (2012). La exposición perinatal a bajas dosis de Bisfenol A modifica la expresión de genes vinculados con la diferenciación funcional del útero de ratas adultas con terapia hormonal de reemplazo. IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina. Buenos Aires, Argentina.
- Verónica L. Bosquiazzo, **Lucía Vigezzi**, Mónica Muñoz-de-Toro, Enrique H. Luque (2011). Terapia hormonal de reemplazo en ratas adultas expuestas perinatalmente a bisfenol a: alteraciones en la diferenciación funcional del útero. LVI Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Argentina.

- **Lucía Vigezzi**, Verónica L. Bosquiazzo, Mónica Muñoz-de-Toro, Enrique H. Luque (2011). La exposición perinatal a bajas dosis de Bisfenol A modifica la respuesta uterina de la rata adulta a la terapia hormonal de reemplazo. 2da Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina. San Juan, Argentina.
- **Lucía Vigezzi**, Verónica L. Bosquiazzo (2010). Efectos a largo plazo de la exposición perinatal a bisfenol A sobre el desarrollo de lesiones uterinas. XVIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo. Santa Fe, Argentina.
- Verónica L. Bosquiazzo, **Lucía Vigezzi**, Jorge G. Ramos, Mónica Muñoz-de-Toro, Enrique H. Luque (2010). Histopatología uterina: Terapia hormonal de reemplazo en animales expuestos perinatalmente a bajas dosis de bisfenol A. LV Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Argentina.

## INDICE GENERAL

<b>Abreviaturas y Símbolos</b>	<b><i>i</i></b>
<b>Índice de tablas</b>	<b><i>iv</i></b>
<b>Índice de figuras</b>	<b><i>vi</i></b>
<b>Resumen</b>	<b><i>x</i></b>
<b>Abstract</b>	<b><i>xvi</i></b>
<b>I- INTRODUCCIÓN</b>	
1. Desarrollo perinatal del tracto reproductor femenino de la rata	<b>1</b>
1.1. Morfogénesis uterina	<b>2</b>
1.1.1. Adenogénesis	<b>8</b>
2. Diferenciación funcional uterina en la adultez	<b>11</b>
2.1. Ciclo estral	<b>13</b>
2.1.1. Cambios en el ciclo estral en ratas de edad avanzada	<b>16</b>
2.2. Expresión de Wnt en el útero	<b>17</b>
2.3. Interacciones estroma-epitelio reguladas por estrógenos	<b>18</b>
2.4. Receptores de hormonas esteroideas	<b>20</b>
2.4.1. Coreguladores	<b>24</b>
2.4.2. Mecanismos de regulación del RE $\alpha$	<b>26</b>
2.5. Modificaciones epigenéticas	<b>28</b>
3. Perturbadores endocrinos	<b>29</b>
3.1. Bisfenol A	<b>31</b>
4. Hipótesis de trabajo	<b>36</b>
<b>II- OBJETIVOS</b>	
1. Objetivo general	<b>37</b>
1.1. Objetivos particulares	<b>37</b>
<b>III- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. Animales	<b>39</b>
1.1. Diseño experimental	<b>39</b>
1.2. Experimentos complementarios	<b>42</b>
2. Cirugías y obtención de muestras	<b>43</b>
2.1. Ovariectomía bilateral	<b>43</b>

2.2. Colocación de implantes	44
2.3. Disección de cuernos uterinos	44
3. Procesamiento de las muestras	45
4. CAPÍTULO I: Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre el útero de ratas en diferentes etapas reproductivas	46
4.1. Evaluación del tejido uterino en ratas de DPN90 (adultas jóvenes)	46
4.1.1. Proliferación celular	48
4.1.2. Detección <i>in situ</i> de la apoptosis celular	49
4.1.3. Área periglandular ocupada por células vimentina-positivas	50
4.1.4. Perímetro glandular ocupado por células $\alpha$ -SMA positivas	51
4.2. Análisis estadístico	51
4.3. Evaluación histológica del tejido uterino en ratas de DPN360 (adultas)	52
4.3.1. Histomorfología uterina	52
4.3.2. Inmunofenotipo de glándulas uterinas	52
4.3.3. Co-localización de proteínas <i>in situ</i> : IHQ doble	53
4.4. Análisis estadístico	54
5. CAPÍTULO II: Respuesta uterina al tratamiento crónico con E2 en ratas adultas (DPN460) expuestas perinatalmente a BPA	54
5.1. Niveles séricos de E2	55
5.2. Evaluación histológica del tejido uterino	55
5.2.1. Histomorfología uterina	55
5.2.2. Morfometría de glándulas uterinas	55
5.3. Expresión de p63 y sus isoformas TA y $\Delta$ N	56
5.3.1. Extracción de ARN total y transcripción reversa	56
5.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real	57
5.4. Generación de anticuerpos contra Wnt7a y Wnt5a	60
5.4.1. Obtención de antígenos recombinantes en células procariotas	60
5.4.1.1. Diseño bioinformático, amplificación y clonado de la secuencia nucleotídica necesaria para la expresión de los antígenos de Wnt7a y Wnt5a	60

5.4.1.2. <i>Expresión y purificación de los antígenos recombinantes</i>	<b>62</b>
5.4.2. <i>Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales monoespecíficos de conejo</i>	<b>63</b>
5.5. <i>Cuantificación de Wnt7a, Wnt5a, <math>\beta</math>-catenina y RP en glándulas uterinas</i>	<b>66</b>
5.6. <i>Expresión de RE<math>\alpha</math>, RE<math>\beta</math> y RP en el estroma uterino</i>	<b>66</b>
5.7. <i>Expresión del ARNm de RE<math>\alpha</math> y sus promotores transcripcionales OS, ON, O, OT y E1</i>	<b>67</b>
5.8. <i>Expresión de coactivadores de la acción de los receptores de hormonas esteroideas: SRC1 y SRC3 en el estroma uterino</i>	<b>68</b>
5.9. <i>Expresión del ARNm de IGF-I e IGF-IR</i>	<b>69</b>
5.10. <i>Expresión de enzimas involucradas en mecanismos epigenéticos: Dnmt3a y 3b, Hdac-1, -2, -3 y Enhancer of zeste homolog 2 (EZH-2)</i>	<b>69</b>
5.11. <i>Análisis estadístico</i>	<b>70</b>
6. <i>CAPÍTULO III: Establecimiento de cultivos en tres dimensiones (3D) de células epiteliales endometriales para estudiar los efectos de la exposición in vitro a Bisfenol A</i>	<b>70</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	
1. <i>Dosis de BPA recibida por los animales durante el tratamiento</i>	<b>73</b>
2. <i>Efectos de la exposición a BPA sobre parámetros reproductivos en madres y crías</i>	<b>73</b>
<i>CAPÍTULO I. Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre el útero de ratas en diferentes etapas reproductivas</i>	<b>74</b>
3. <i>Evaluación del tejido uterino en ratas de DPN90 (adultas jóvenes)</i>	<b>74</b>
3.1. <i>Proliferación y apoptosis celular</i>	<b>75</b>
3.2. <i>Expresión de vimentina y <math>\alpha</math>-SMA</i>	<b>76</b>
3.3. <i>Evaluación histológica del tejido uterino en ratas de DPN360 (adultas)</i>	<b>77</b>
3.4. <i>Caracterización inmunofenotípica de la histología uterina</i>	<b>80</b>
3.4.1. <i>Co-localización de proteínas en las GME</i>	<b>82</b>
<i>CAPÍTULO II. Respuesta uterina al tratamiento crónico con E2 en ratas</i>	<b>83</b>

<i>adultas (DPN460) expuestas perinatalmente a BPA</i>	
<i>4. Niveles séricos de E2</i>	<b>83</b>
<i>5. Evaluación histológica del tejido uterino en ratas de DPN460-E2</i>	<b>83</b>
<i>5.1. Histomorfología uterina de ratas Control+E2</i>	<b>83</b>
<i>5.2. Histomorfología uterina de ratas BPA+E2</i>	<b>84</b>
<i>6. Expresión de p63 y sus isoformas TA y ΔN</i>	<b>86</b>
<i>7. Desarrollo de anticuerpos policlonales para la detección de Wnt7a y Wnt5a por IHQ</i>	<b>87</b>
<i>7.1. Diseño y obtención de antígenos específicos</i>	<b>87</b>
<i>7.2. Generación y caracterización de los anticuerpos policlonales</i>	<b>91</b>
<i>7.3. Expresión de Wnt7a y Wnt5a en glándulas uterinas</i>	<b>93</b>
<i>8. Expresión de β-catenina en glándulas uterinas</i>	<b>94</b>
<i>9. Expresión de RP en glándulas uterinas</i>	<b>95</b>
<i>10. Expresión de REα, REβ y RP en el estroma uterino</i>	<b>95</b>
<i>11. Expresión del ARNm de REα y sus promotores transcripcionales OS, ON, O, OT y E1</i>	<b>97</b>
<i>12. Expresión de coactivadores de la acción de los receptores de hormonas esteroideas: SRC1 y SRC3 en el estroma uterino</i>	<b>98</b>
<i>13. Expresión del ARNm de IGF-I e IGF-IR</i>	<b>99</b>
<i>14. Expresión del ARNm de enzimas involucradas en mecanismos epigenéticos</i>	<b>100</b>
<b><i>CAPÍTULO III. Establecimiento de cultivos en tres dimensiones (3D) de células epiteliales endometriales como modelo para el estudio de los efectos de la exposición in vitro a Bisfenol A</i></b>	<b>101</b>
<i>15. Desarrollo de los cultivos en 3D</i>	<b>101</b>
<i>16. Efecto de la exposición a BPA sobre las estructuras glandulares en cultivos en 3D</i>	<b>102</b>
<i>17. Efecto de la exposición a BPA sobre la polaridad apicobasal de las estructuras glandulares en 3D</i>	<b>104</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	

<i>1. La exposición perinatal a BPA afecta la diferenciación funcional uterina en ratas adultas durante la vida reproductiva</i>	<b>106</b>
<i>2. La exposición perinatal a BPA altera la respuesta uterina al tratamiento con E2 en ratas adultas</i>	<b>110</b>
<i>3. La exposición in vitro a <math>10^{-5}</math> M de BPA produce respuesta estrogénica sobre la proliferación de estructuras glandulares en cultivos en 3D</i>	<b>117</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>121</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>124</b>

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>ADNc</b>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<b>ADN</b>	<i>Ácido desoxirribonucleico copia</i>
<b>ARN (m)</b>	<i>Ácido ribonucleico (mensajero)</i>
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	<i>Alfa actina de músculo liso</i>
<b>BPA</b>	<i>Bisfenol A</i>
<b>BrdU</b>	<i>Bromodeoxyuridina</i>
<b>cm</b>	<i>Centímetros</i>
<b>col</b>	<i>Colaboradores</i>
<b>Ct</b>	<i>Ciclo umbral</i>
<b>DAB</b>	<i>Diaminobencidina</i>
<b>DES</b>	<i>Diestilbestrol</i>
<b>DG</b>	<i>Día de gestación</i>
<b>DMSO</b>	<i>Dimetilsulfóxido</i>
<b>Dnmt</b>	<i>ADN metiltransferasa</i>
<b>dNTP</b>	<i>Desoxinucleótidos trifosfato</i>
<b>DOI</b>	<i>Densidad Óptica Integrada</i>
<b>DPN</b>	<i>Día postnatal</i>
<b>E2</b>	<i>17<math>\beta</math>-estradiol</i>
<b>Eg</b>	<i>Estrógenos</i>
<b>EGF</b>	<i>Factor de crecimiento epidermal</i>
<b>EPA</b>	<i>Agencia de protección ambiental</i>
<b>ERE</b>	<i>Elemento de respuesta a estrógenos</i>
<b>EZH-2</b>	<i>Enhancer of Zeste Homolog 2</i>
<b>FSH</b>	<i>Hormona folículo estimulante</i>
<b>GGH</b>	<i>Glándulas con glándulas hijas</i>
<b>GME</b>	<i>Glándulas con metaplasia escamosa</i>
<b>GST</b>	<i>Glutación S-transferasa</i>
<b>h</b>	<i>Horas</i>
<b>H&amp;E</b>	<i>Hematoxilina-eosina</i>

<b>Hdac</b>	<i>Histona deacetilasa</i>
<b>IF</b>	<i>Inmunofluorescencia</i>
<b>IGF</b>	<i>Factor de crecimiento similar a insulina</i>
<b>IHQ</b>	<i>Inmunohistoquímica</i>
<b>kDa</b>	<i>Kilodalton</i>
<b>kg</b>	<i>Kilogramo</i>
<b>L19</b>	<i>Proteína ribosomal L19</i>
<b>LH</b>	<i>Hormona luteinizante</i>
<b>LOAEL</b>	<i>Nivel más bajo de efectos adversos observados</i>
<b>M</b>	<i>Molar</i>
<b>M&amp;M</b>	<i>Materiales y métodos</i>
<b>min</b>	<i>Minutos</i>
<b>ml</b>	<i>Mililitro</i>
<b>mm</b>	<i>Milímetro</i>
<b>mM</b>	<i>Milimol</i>
<b>µm</b>	<i>Micrometro</i>
<b>µg</b>	<i>Microgramo</i>
<b>µl</b>	<i>Microlitro</i>
<b>nmol</b>	<i>Nanomol</i>
<b>OVX</b>	<i>Ovariectomizada</i>
<b>pb</b>	<i>Pares de bases</i>
<b>PBS</b>	<i>Buffer de fosfatos salino</i>
<b>PCR</b>	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>
<b>PE</b>	<i>Perturbadores endocrinos</i>
<b>Pg</b>	<i>Progesterona</i>
<b>pmol</b>	<i>Picomol</i>
<b>RE</b>	<i>Receptor de estrógenos</i>
<b>RE<math>\alpha</math></b>	<i>Receptor de estrógenos alfa</i>
<b>RE<math>\beta</math></b>	<i>Receptor de estrógenos beta</i>
<b>RN</b>	<i>Receptor nuclear</i>
<b>RP</b>	<i>Receptor de progesterona</i>

<b>RT</b>	<i>Transcripción reversa</i>
<b>s</b>	<i>Segundos</i>
<b>sc</b>	<i>Subcutánea</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio</i>
<b>SEM</b>	<i>Error estándar medio</i>
<b>SRC</b>	<i>Coactivador de receptores esteroides</i>
<b>SRY</b>	<i>Sex-determining Region on the Y chromosome</i>
<b>TRF</b>	<i>Tracto Reproductor Femenino</i>
<b>Vv</b>	<i>Densidad de volumen</i>
<b>Wnt</b>	<i>Wingless-related MMTV integration site</i>
<b>°C</b>	<i>Grados Centígrados</i>
<b>5'UTR</b>	<i>Región no traducida ubicada en dirección 5'</i>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	<i>Niveles de BPA reportados en humanos.</i>	<b>33</b>
<b>Tabla 2.</b>	<i>Protocolo general de la técnica de IHQ.</i>	<b>47</b>
<b>Tabla 3.</b>	<i>Anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ para evaluar Vimentina, <math>\alpha</math>-SMA y BrdU.</i>	<b>48</b>
<b>Tabla 4.</b>	<i>Anticuerpos empleados para caracterizar el inmunofenotipo de glándulas uterinas por IHQ.</i>	<b>53</b>
<b>Tabla 5.</b>	<i>Protocolo básico de la segunda parte de una IHQ doble.</i>	<b>53</b>
<b>Tabla 6.</b>	<i>Oligonucleótidos empleados para amplificar las isoformas de p63 y L19.</i>	<b>58</b>
<b>Tabla 7.</b>	<i>Protocolo general de ciclado de PCR en tiempo real.</i>	<b>59</b>
<b>Tabla 8.</b>	<i>Oligonucleótidos utilizados para amplificar y clonar las secuencias de Wnt7a y Wnt5a.</i>	<b>61</b>
<b>Tabla 9.</b>	<i>Anticuerpos utilizados para evaluar la expresión de Wnt7a, Wnt5a, <math>\beta</math>-catenina y RP.</i>	<b>66</b>
<b>Tabla 10.</b>	<i>Anticuerpos utilizados para evaluar la expresión de receptores hormonales.</i>	<b>67</b>
<b>Tabla 11.</b>	<i>Oligonucleótidos empleados para amplificar RE<math>\alpha</math> y sus promotores transcripcionales.</i>	<b>68</b>
<b>Tabla 12.</b>	<i>Anticuerpos utilizados para evaluar la expresión de coactivadores de receptores hormonales.</i>	<b>69</b>
<b>Tabla 13.</b>	<i>Oligonucleótidos empleados para amplificar IGF-I e IGF-IR.</i>	<b>69</b>
<b>Tabla 14.</b>	<i>Oligonucleótidos empleados para amplificar Dnmt3a y 3b, Hdac-1, -2, -3 y EZH-2.</i>	<b>70</b>
<b>Tabla 15.</b>	<i>Consumo de agua y dosis de BPA recibida por los animales</i>	<b>73</b>

*de cada grupo experimental.*

<b>Tabla 16.</b>	<i>Parámetros generales evaluados en madres y crías expuestas a BPA en el agua de bebida.</i>	<b>74</b>
<b>Tabla 17.</b>	<i>Incidencia de alteraciones glandulares histológicamente diagnosticadas en ratas de DPN360 expuestas perinatalmente a BPA.</i>	<b>79</b>
<b>Tabla 18.</b>	<i>Incidencia de alteraciones glandulares histológicamente diagnosticadas en ratas de DPN460-E2 expuestas perinatalmente a BPA.</i>	<b>85</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	<i>Representación esquemática del dominio espacial de los genes HOX en el desarrollo del conducto paramesonérico humano.</i>	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b>	<i>Representación esquemática de la estructura del gen p63 y de sus isoformas protéicas.</i>	<b>6</b>
<b>Figura 3.</b>	<i>Patrón de expresión de p63 total y de las isoformas TA y <math>\Delta N</math> en el tracto reproductor de la hembra.</i>	<b>7</b>
<b>Figura 4.</b>	<i>Proceso general de adenogénesis uterina.</i>	<b>9</b>
<b>Figura 5.</b>	<i>Esquema comparativo de la anatomía del útero y cérvix.</i>	<b>11</b>
<b>Figura 6.</b>	<i>Fotomicrografía de una sección histológica de útero de rata.</i>	<b>12</b>
<b>Figura 7.</b>	<i>Niveles hormonales de progesterona (Pg), prolactina (PRL), 17<math>\beta</math>-estradiol (E2), hormona leutinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) durante el ciclo estral de la rata.</i>	<b>15</b>
<b>Figura 8.</b>	<i>Cambios cronológicos en los patrones de periodicidad del ciclo estral de ratas hembra entre nueve y veintiséis meses de edad.</i>	<b>16</b>
<b>Figura 9.</b>	<i>Esquema representativo de las interacciones estroma-epitelio en el útero, mediadas por acción del receptor de estrógenos <math>\alpha</math> en respuesta al estradiol (E2).</i>	<b>19</b>
<b>Figura 10.</b>	<i>Organización estructural de los receptores nucleares.</i>	<b>20</b>
<b>Figura 11.</b>	<i>Representación esquemática de la vía clásica y no clásica de acción de los Estrógenos (Eg).</i>	<b>22</b>
<b>Figura 12.</b>	<i>Reclutamiento de coactivadores y corepresores por el receptor de estrógenos (RE).</i>	<b>25</b>
<b>Figura 13.</b>	<i>Representación esquemática de la región promotora del gen</i>	<b>27</b>

	<i>del RE<math>\alpha</math>.</i>	
<b>Figura 14.</b>	<i>Estructura molecular de algunas hormonas esteroideas y xenoestrógenos.</i>	<b>31</b>
<b>Figura 15.</b>	<i>Efectos de la exposición temprana a BPA sobre la histoarquitectura y funcionalidad de distintos tejidos.</i>	<b>34</b>
<b>Figura 16.</b>	<i>Diseño experimental principal.</i>	<b>41</b>
<b>Figura 17.</b>	<i>Diseño de experimentos complementarios.</i>	<b>43</b>
<b>Figura 18.</b>	<i>Representación esquemática de la secuencia del gen p63.</i>	<b>59</b>
<b>Figura 19.</b>	<i>Plásmido pGEX-4T-3 y estrategia de clonado direccional utilizada para la expresión de los antígenos de Wnt7a y Wnt5a como una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST-Wnt7a/Wnt5a).</i>	<b>62</b>
<b>Figura 20.</b>	<i>Organización genómica de la región promotora del gen de RE<math>\alpha</math>.</i>	<b>68</b>
<b>Figura 21.</b>	<i>Fotomicrografías representativas del tejido uterino de un animal control de DPN90.</i>	<b>75</b>
<b>Figura 22.</b>	<i>Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre el índice proliferativo y apoptótico en el útero de ratas de DPN90.</i>	<b>76</b>
<b>Figura 23.</b>	<i>Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre el estroma periglandular del útero de ratas de DPN90.</i>	<b>77</b>
<b>Figura 24.</b>	<i>Fotomicrografías que muestran alteraciones en el epitelio luminal observadas en ratas de DPN360.</i>	<b>78</b>
<b>Figura 25.</b>	<i>Fotomicrografías representativas de los diferentes tipos de glándulas observadas en ratas de DPN360.</i>	<b>79</b>
<b>Figura 26.</b>	<i>Caracterización inmunofenotípica del epitelio luminal y glandular del útero de ratas de DPN360.</i>	<b>81</b>
<b>Figura 27.</b>	<i>Caracterización de las células p63 positivas en glándulas con metaplasia escamosa (GME), en el útero de ratas de</i>	<b>82</b>

	<i>DPN360.</i>	
<b>Figura 28.</b>	<i>Fotomicrografías que muestran alteraciones glandulares en ratas de DPN460-E2.</i>	<b>84</b>
<b>Figura 29.</b>	<i>Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la densidad de glándulas con metaplasia escamosa (GME) en el útero de ratas de DPN460 tratadas con E2.</i>	<b>86</b>
<b>Figura 30.</b>	<i>Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de p63 en el útero de ratas de DPN460 tratadas con E2.</i>	<b>87</b>
<b>Figura 31.</b>	<i>Selección del fragmento de la secuencia de Wnt7a para ser utilizado como antígeno en la producción de un anticuerpo policlonal específico.</i>	<b>89</b>
<b>Figura 32.</b>	<i>Purificación de los antígenos GST-Wnt5a y GST-Wnt7a mediante cromatografía de afinidad.</i>	<b>90</b>
<b>Figura 33.</b>	<i>Caracterización de los anticuerpos anti-Wnt7a y anti-Wnt5a en el útero y testículo de rata.</i>	<b>92</b>
<b>Figura 34.</b>	<i>Expresión de Wnt7a y Wnt5a en las glándulas uterinas de ratas de DPN460-E2.</i>	<b>93</b>
<b>Figura 35.</b>	<i>Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de Wnt7a en las glándulas con metaplasia escamosa (GME) de ratas de DPN460 tratadas con E2.</i>	<b>94</b>
<b>Figura 36.</b>	<i>Inmunomarcación de <math>\beta</math>-catenina en las glándulas uterinas de hembras de DPN460-E2.</i>	<b>95</b>
<b>Figura 37.</b>	<i>Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión inmunohistoquímica de receptores hormonales en el tejido uterino de ratas de DPN460 tratadas con E2.</i>	<b>96</b>
<b>Figura 38.</b>	<i>Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión del ARNm del RE<math>\alpha</math> en el útero de ratas de DPN460 tratadas con E2.</i>	<b>98</b>
<b>Figura 39.</b>	<i>Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de SRC1 y SRC3 en el tejido uterino de ratas de DPN460 tratadas con E2.</i>	<b>99</b>

<b>Figura 40.</b>	<i>Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de IGF-I e IGF-IR en el útero de ratas de DPN460 tratadas con E2.</i>	<b>99</b>
<b>Figura 41.</b>	<i>Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de las enzimas Dnmt3a, Dnmt3b, EZH-2, Hdac-1, Hdac-2 y Hdac-3 en el útero de ratas de DPN460 tratadas con E2.</i>	<b>100</b>
<b>Figura 42.</b>	<i>Fotomicrografías que muestran el progreso de un cultivo en 3D de células epiteliales endometriales a lo largo del tiempo.</i>	<b>102</b>
<b>Figura 43.</b>	<i>Efecto de la exposición a BPA sobre el perímetro de las estructuras glandulares en cultivos en 3D.</i>	<b>103</b>
<b>Figura 44.</b>	<i>Efecto de la exposición a BPA sobre la proliferación de las estructuras glandulares en cultivos en 3D.</i>	<b>104</b>
<b>Figura 45.</b>	<i>Fotomicrografías representativas de las inmunofluorescencias realizadas para evaluar polaridad apicobasal en las estructuras glandulares en 3D.</i>	<b>105</b>

## RESUMEN

La morfogénesis perinatal uterina es un periodo crítico en el desarrollo, ya que situaciones de perturbación hormonal pueden reprogramar la diferenciación del útero y predisponer a los individuos a enfermedades y/o disfunciones reproductivas. Esta diferenciación es controlada por diversos mecanismos endocrinos, celulares y moleculares que programan a las células diana para responder apropiadamente a las señales hormonales más tarde en la vida. Las vías de señalización de los morfogenes Wnt cumplen importantes roles durante la diferenciación uterina y pueden ser alterados por exposición a compuestos exógenos con actividad estrogénica (denominados xenoestrógenos). Además, las interacciones epitelio-mesénquima del conducto Mülleriano cumplen un rol clave en la diferenciación de los epitelios oviductal, uterino, cervical y vaginal, la cual se manifiesta por la expresión de moléculas específicas tales como las citoqueratinas (CK) y p63. p63 se expresa normalmente en células epiteliales del cérvix y vagina pero no en el epitelio uterino, aunque se ha demostrado que la exposición a xenoestrógenos puede alterar su patrón normal de expresión.

En la adultez, el útero presenta diferenciación funcional (i.e.: proliferación, expresión de proteínas específicas y apoptosis) en respuesta a los niveles séricos de los esteroides sexuales. Al igual que durante el periodo de desarrollo organogenético, las interacciones entre el estroma y el epitelio son críticas para mediar los efectos de estas hormonas. Evidencias demuestran que la exposición a xenoestrógenos durante el desarrollo afecta la histología y la respuesta uterina a estrógenos (Eg) en la edad adulta. La expresión anormal de genes sensibles a Eg, resulta en una desregulación de las vías de señalización hormonal y puede traer consecuencias negativas para la función uterina.

El Bisfenol A (BPA) es un xenoestrógeno producido en grandes cantidades para su uso en la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi. Se lo utiliza en la fabricación de envases retornables, recipientes para bebidas y alimentos, etc. Numerosos estudios en roedores han demostrado que el BPA puede inducir diversas alteraciones en las funciones reproductivas. Muchos de los

efectos de la exposición perinatal a BPA podrían no evidenciarse hasta la madurez sexual, cuando los tejidos hormono-sensibles atraviesan distintas situaciones endocrinas. Se ha sugerido que el BPA podría modificar el patrón epigenético normal durante el desarrollo, provocando alteraciones en la transcripción y/o la regulación de genes específicos con consecuencias adversas a largo plazo.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, estudiar los efectos de la exposición perinatal a BPA sobre el útero, en circunstancias controladas por hormonas (i.e.: ciclo estral, tratamiento con Eg), aportaría evidencias experimentales en relación a posibles mecanismos o desregulaciones responsables de alteraciones en el tracto reproductor con consecuencias adversas para la salud reproductiva.

En el presente trabajo de tesis nos propusimos estudiar los efectos de la exposición perinatal a bajas dosis de BPA sobre la diferenciación funcional uterina en ratas adultas en distintas edades reproductivas y en un modelo de rata ovariectomizada (OVX) tratada con Eg. Para ello, ratas preñadas fueron tratadas con BPA por vía oral desde el día 9 de gestación hasta el destete de las crías en el día postnatal (DPN) 21. Se trabajó con tres grupos experimentales: **Control** (etanol al 0,001%), **BPA0.6** (0.6 µg/kg/día) y **BPA60** (60 µg/kg/día). Las crías hembra de cada grupo fueron divididas en dos experimentos principales:

**A)** Para investigar el efecto de la exposición a BPA sobre el útero de ratas en diferentes etapas reproductivas, las hembras fueron sacrificadas en estro en **DPN90** (adultas jóvenes) y en **DPN360** (adultas).

**B)** Para investigar si la exposición a BPA modifica la respuesta a un tratamiento crónico con 17β-estradiol (E2), ratas de DPN360 fueron OVX y tratadas con E2 durante 3 meses (grupos de **DPN460-E2**).

En ratas de DPN90 se cuantificó la proliferación y apoptosis celular (en los diferentes compartimientos del útero) y la expresión de marcadores de diferenciación estromal Vimentina y α-SMA, a partir de ensayos de inmunohistoquímica (IHQ). En ratas de DPN360 se realizó un exhaustivo análisis histomorfológico y se evaluó la incidencia de alteraciones uterinas. Posteriormente se analizó el fenotipo de las alteraciones uterinas mediante ensayos de IHQ para diferentes marcadores tales como CK8, pan CK-basal, receptor de estrógenos alfa

-RE $\alpha$ - y de progesterona -RP, y p63. En ratas adultas tratadas con E2 (DPN460-E2) se estudiaron las características histomorfológicas del útero, y se evaluó la incidencia de alteraciones uterinas. En algunos casos en los que se consideró necesario, se cuantificó también la densidad de volumen de ciertos tipos glandulares. Se evaluó por IHQ la expresión de moléculas involucradas en la respuesta epitelial uterina al E2 y en la diferenciación funcional de las glándulas uterinas tales como RP, Wnt7a, Wnt5a y  $\beta$ -catenina. En el estroma uterino se evaluó la expresión de receptores hormonales y de coactivadores de la acción de los receptores (SRC1 y SRC3) por IHQ. Se evaluó la expresión del ARNm del RE $\alpha$  y de sus variantes transcripcionales con exones 5' no traducibles (RE $\alpha$ -ON, -OS, -O, -OT y -E1) por PCR en tiempo real. Además se cuantificó la expresión de moléculas implicadas en las interacciones estroma-epitelio en respuesta a E2, tales como el factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I) y su receptor (IGF-IR) y de enzimas involucradas en distintos mecanismos epigenéticos: ADN metiltransferasa 3a y 3b; histona deacetilasa -1, -2 y -3; histona metilasa EZH-2, por PCR en tiempo real.

En la última etapa de esta tesis nos propusimos desarrollar una metodología de cultivos en tres dimensiones (3D) de células epiteliales endometriales, para posteriormente optimizar un experimento de exposición *in vitro* a bajas dosis de BPA. Para ello, se extrajeron las células epiteliales del útero de ratones de 3 a 4 semanas de vida y se realizaron cultivos en 3D colocando una base de Matrigel en el fondo de cada pocillo, y empleando medio de cultivo suplementado con Matrigel al 3%. En esas condiciones las células epiteliales formaron estructuras glandulares en 3D. Posteriormente, los cultivos fueron expuestos a DMSO al 0.1% (Control) o a distintas dosis de BPA:  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  M, durante 12 días. Cada 3 días se evaluó la proliferación de las estructuras glandulares por el perímetro de las mismas y cuantificando la incorporación de bromodeoxiuridina.

Nuestros resultados demostraron que la exposición perinatal a BPA produjo una disminución significativa en el índice de proliferación celular de las glándulas uterinas en ratas adultas jóvenes (DPN90), sin observarse cambios en los índices apoptóticos. Además, en el grupo de BPA60 se observó una disminución de la

expresión de  $\alpha$ -SMA en las células del estroma periglandular. En hembras de DPN360 observamos la presencia de alteraciones uterinas que incluyeron cambios morfológicos en el epitelio luminal del útero y diferentes tipos de glándulas uterinas tales como glándulas con metaplasia escamosa (GME), glándulas quísticas y glándulas con anomalías celulares. La incidencia de alteraciones en el epitelio luminal fue mayor en las hembras expuestas a ambas dosis de BPA. Las hembras expuestas a BPA60 mostraron también mayor incidencia de glándulas con anomalías celulares. Todos los tipos de glándulas uterinas expresaron CK8 y RE $\alpha$ . Las GME fueron también inmunoreactivas para la pan-CK basal y además presentaron una alta expresión de p63.

Las hembras perinatalmente expuestas a BPA y tratadas con E2 en la adultez (grupos de BPA+E2) mostraron la presencia de alteraciones glandulares similares a las observadas en DPN360, y además mostraron la presencia de glándulas con glándulas hijas (GGH) y conglomerados de glándulas. En el grupo de BPA60+E2 aumentó la incidencia de glándulas con anomalías celulares y la densidad de GME. Las GME del grupo de BPA60+E2 presentaron menor expresión de Wnt7a que las GME del grupo control+E2. En las hembras del grupo de BPA0.6+E2 se observó un aumento en la incidencia de GGH. Estas hembras presentaron también menor expresión del ARNm del IGF-I y del IGF-IR. La expresión de RP disminuyó en el estroma uterino de ambos grupos de BPA+E2. La expresión de RE $\alpha$  disminuyó en el grupo de BPA60+E2, debido a la caída en la abundancia relativa de los transcritos con exones 5' alternativos RE $\alpha$ -O y RE $\alpha$ -OT. También se observó una disminución en la expresión de los coactivadores SRC1 y SRC3 en el estroma uterino de las ratas expuestas a ambas dosis de BPA+E2, y cambios en la expresión de enzimas involucradas en mecanismos de regulación epigenética.

Por otra parte demostramos que la exposición *in vitro* a BPA produjo una reducción inicial en el tamaño de las estructuras glandulares en 3D y menor proliferación celular. Sin embargo, al final del tratamiento se observó un aumento significativo en el perímetro de las estructuras glandulares expuestas a  $10^{-5}$  M de BPA con respecto a los controles.

Los resultados presentados aquí nos permiten concluir que la exposición perinatal a bajas dosis de BPA altera el desarrollo del útero con consecuencias adversas a largo plazo en la histología y la diferenciación funcional uterina de ratas de distintas edades reproductivas. Observamos importantes cambios en el compartimento glandular del útero, lo que sugiere que el BPA podría alterar la funcionalidad de las glándulas uterinas. También demostramos que la exposición perinatal a BPA altera la respuesta uterina al E2 en ratas adultas de edad avanzada. Esto fue evidenciado por alteraciones en la histología y en la expresión de proteínas implicadas en la diferenciación funcional de las glándulas uterinas; y por cambios en la expresión de receptores hormonales y de moléculas asociadas a las interacciones estroma-epitelio mediadas por E2, como IGF-I e IGF-IR. A su vez, otras moléculas reguladoras claves como el SRC1 y SRC3 se encontraron también alteradas por exposición a BPA, pudiendo estar involucradas en la desregulación de la expresión de genes hormono-sensibles. Por último, demostramos alteraciones en la expresión de enzimas responsables de modificaciones epigenéticas como metilación de ADN y metilación/acetilación de histonas, que podrían estar implicadas en los cambios observados en genes E<sub>2</sub>-sensibles como RE $\alpha$ , RP, coactivadores o miembros de la familia Wnt.

Por otra parte, el análisis de los cultivos en 3D nos permite concluir que la exposición *in vitro* a  $10^{-5}$  M de BPA produjo una respuesta estrogénica sobre la proliferación de las estructuras glandulares en 3D. Esto fue evidenciado a partir de la comparación de nuestros resultados con los anteriormente reportados para cultivos expuestos a E2 en dosis comparables a las utilizadas aquí. Este patrón de respuesta se caracterizó por una disminución inicial en el perímetro y proliferación de las estructuras glandulares, que fue incrementándose a lo largo del tratamiento hasta aumentar significativamente respecto a los controles.

En esta tesis se presentan evidencias experimentales de efectos adversos de la exposición perinatal a BPA sobre la diferenciación funcional del útero y en consecuencia, la salud reproductiva de la hembra. Estos resultados deberían contribuir a la toma de conciencia para promover la elaboración de normas que regulen/eviten la exposición a químicos clasificados como perturbadores

endocrinos que contaminan el medio ambiente y que afectan la salud animal y de los seres humanos.

## **ABSTRACT**

Perinatal uterine morphogenesis is a critical period in the development because exposure to hormonal disruptors can reprogram the uterine differentiation and predispose individuals to disease and/or reproductive disorders. This period of differentiation is controlled by several endocrine, cellular and molecular mechanisms that program target cells to respond appropriately to hormonal cues later in life. Wnt signaling pathway play important roles along the uterine development and it can be altered by exposure to exogenous estrogenic compounds (xenoestrogens). In addition, Müllerian mesenchymal-epithelial interactions play a key role in the differentiation of oviductal, uterine, cervical and vaginal epithelium, which is manifested by the expression of specific molecules such as cytokeratins (CK) and p63. p63 is commonly expressed in cervical and vaginal cells but not in the uterine epithelium. However, developmental exposure to xenoestrogens can disturb the normal p63 expression pattern.

In the adult, the processes of uterine functional differentiation (i.e.: proliferation, apoptosis and expression of specific proteins) are also dependent on reciprocal stromal-epithelial interactions, which are governed by sex steroids. Recent studies have shown that developmental exposure to xenoestrogens can affect the histology and uterine response to estrogen (Eg) in adulthood. The abnormal expression of steroid-sensitive genes could lead to a dysregulation of the hormonal signaling pathway that would alter the uterine function.

Bisphenol A (BPA) is a xenoestrogen produced in large quantities for use in the manufacture of polycarbonate plastics and epoxy resins. It is used in the manufacture of returnable packaging, beverages and food containers, etc. Numerous studies in rodents have shown that BPA can induce several adverse effects in reproductive functions. Sometimes, the effects of perinatal exposure to BPA are not evidenced until adulthood, when hormone-dependent tissues are exposed to particular endocrine situations. It has been suggested that BPA could alters the normal epigenetic patterns during the development and causes

alterations in the transcription and/or regulation of specific target genes leading in long-term consequences.

Taking into account these antecedents, to study the effects of perinatal BPA-exposure on the uterus would provide experimental evidence regarding the mechanisms or dysregulations that could be responsible of the alterations in the reproductive health.

In the present work we investigated the long-term effects of perinatal exposure to low doses of BPA on the uterine functional differentiation in adult rats at different reproductive stages; and in ovariectomized (OVX) adult rats treated with Eg. To carry out this, BPA was orally administered to pregnant rats from gestational day 9 until weaning (postnatal day -PND) 21. The rats were divided in three experimental groups: **Control** (0.001% ethanol), **BPA0.6** (0.6 µg/kg/day) and **BPA60** (60 µg/kg/day). The female offspring from each group were divided into two main experiments:

**A)** To investigate the effect of BPA exposure on the rat uterus from different reproductive ages, females were sacrificed at estrus in **PND90** (young adults) and **PND360** (adults).

**B)** To investigate whether the exposure to BPA modified the response to a chronic treatment with 17β-estradiol (E2), rats on PND360 were OVX and treated with E2 for 3 months (**PND460-E2** groups).

In PND90, we quantified the proliferative and apoptotic indexes in all compartments of the uterus, and the expression of stromal differentiation molecules (Vimentin and α-SMA), by immunohistochemistry (IHC). In PND360, an exhaustive histomorphologic analysis was performed, and the incidence of uterine abnormalities was evaluated. Thereafter, to analyze the immunophenotype of the uterine alterations, we performed IHC assays for different markers such as CK8, pan CK-basal, estrogen receptor alpha -ERα-, progesterone receptor -PR, and p63. In adult rats treated with E2 (PND460-E2), we analyzed the uterine histomorphology and the incidence of uterine abnormalities. When it was considered necessary, the volume density of glandular alterations was also quantified. In uterine glands, the expression of molecules involved in the functional

differentiation and uterine epithelial E2-response (such as PR, Wnt7a, Wnt5a,  $\beta$ -catenin) was analyzed by IHC. In the uterine stroma, we evaluated the expression of hormonal receptors and coactivator proteins (SRC1 and SRC3) by IHC. The mRNA expression of ER $\alpha$  and its 5'- untranslated exons (ER $\alpha$ -ON, -OS, -O, -OT and -E1) was analyzed by real-time PCR. In addition, we evaluated the expression of molecules involved in epithelial-stromal communications such as Insulin-like growth factor I (IGF-I), and its receptor IGF-IR; and the expression of enzymes involved in epigenetic mechanisms: DNA methyltransferase 3a and 3b; histone deacetylase -1, -2 and -3; histone methylase EZH-2, by real-time PCR.

In the last part of the thesis we developed a methodology of three dimensional (3D) endometrial epithelial cell cultures, and then we optimized an experiment of *in vitro* exposure to low doses of BPA. To accomplish this, epithelial cells were squeezed out from the uterus of 3- to 4-week-old mice, and 3D cultures were performed using a layer of Matrigel at the bottom of each well, and medium supplemented with 3% Matrigel. Under these conditions, endometrial epithelial cells formed 3D glandular structures. Subsequently, the cultures were exposed to 0.1% DMSO (Control) or BPA ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  or  $10^{-7}$  M) for 12 days. To evaluate proliferation rates, the perimeter of glandular structures and bromodeoxiuridine incorporation was quantified every 3 days.

Our results showed that young adult rats (PND90) exposed to BPA presented a significant decrease in proliferative activity of glandular epithelium, whereas apoptotic indexes were not modified. Furthermore, the expression of  $\alpha$ -SMA was significantly decreased in the glandular perimeter of BPA60-exposed rats. In females of PND360 we observed the presence of uterine abnormalities including morphological changes in the uterine luminal epithelium and different types of glands such as glands with squamous metaplasia (GSM), cystic glands and glands with cellular anomalies. The incidence of luminal epithelial alterations was higher in rats exposed to both doses of BPA. The incidence of glands with cellular anomalies increased in BPA60 rats. All types of uterine glands expressed CK8 and ER $\alpha$ . The GSM were also immunoreactive for pan-CK basal and showed high expression of p63.

Females perinatally exposed to BPA and treated with E2 in adulthood (BPA+E2 groups) showed similar abnormalities to those described in PND360 rats, and with the presence of glands with daughter glands (GDG) and conglomerates of glands. In BPA60+E2 rats, the incidence of glands with cellular anomalies and the density of GSM were increased. In GSM of BPA60+E2, the expression of Wnt7a was lower than that in GSM of the control+E2 group. The incidence of GDG was higher in BPA0.6+E2 than in control+E2. The expression of IGF-I and IGF-IR mRNA was lower in BPA0.6+E2. In the uterine stroma, PR expression decreased in both BPA+E2 groups, while ER $\alpha$  expression was lower in BPA60+E2. The reduction of ER $\alpha$  in BPA60+E2 rats was correlated with a decrease in the relative abundance of the alternative spliced 5' exons ER $\alpha$ -O and ER $\alpha$ -OT. The expression of SRC1 and SRC3 was lower in the uterine stroma of both BPA+E2-exposed rats. In addition, we showed changes in enzymes involved in the epigenetic regulatory machinery in BPA+E2 groups.

On the other hand, we showed that *in vitro* exposure to BPA  $10^{-5}$  M presented an initial reduction in the perimeter and proliferation indexes of glandular structures, followed by a significant increase at the end of the treatment.

The results presented here demonstrate that perinatal exposure to low doses of BPA alters the histology and uterine functional differentiation of PND90 and PND360 rats. We observed significant changes in uterine glands, suggesting that BPA could alter the glandular function. We also demonstrated that perinatal exposure to BPA alters the uterine response to E2 in aged rats. This was evidenced by alterations in the histology and the expression of proteins involved in the glandular functional differentiation; and by changes in the expression of hormonal receptors and molecules involved in stromal-epithelial interactions mediated by E2 such as IGF-I and IGF-IR. In addition, other key regulatory molecules such as SRC1 and SRC3 were also altered by BPA, and they could be involved in the dysregulation of the hormonal-target genes. Finally, we found alterations in different epigenetic regulatory enzymes in aged BPA+E2 rats that could be implicated in changes in specific Eg-target genes such as ER $\alpha$ , PR, coactivators or Wnt family members.

The analysis of 3D cultures allows us to conclude that *in vitro* exposure to BPA  $10^{-5}$  M produce an estrogenic response on the proliferation of glandular structures. This was evidenced by the comparison of our results with those previously reported for cultures exposed to E2 at comparable doses to those used here. This pattern of response was characterized by an initial decrease in the perimeter and proliferation of 3D glandular structures, which was increasing throughout the treatment to achieve a significant increase at the end of the experiment.

In this thesis we presented experimental evidence showing adverse effects of perinatal exposure to BPA on the uterine functional differentiation and therefore, the female reproductive health. These results should contribute to promote the elaboration of future norms that will regulate the degree of human and wild life exposure to chemicals classified as endocrine disruptors.

# ***I- INTRODUCCIÓN***

*"Nada me importa más que hacer el recorrido, más que saber a dónde voy..."*

*Gustavo Cerati*

---

## **1. Desarrollo perinatal del tracto reproductor femenino de la rata**

La diferenciación sexual ha sido motivo de asombro por siglos. En el año 335 antes de Cristo, Aristóteles (384-322 aC) postulaba que la determinación sexual se debía a diferencias en la temperatura del semen al momento de la copulación (Haqq y Donahoe 1998). Muchos siglos después, Painter (1923) descubrió la primera pista genética: todos los machos de mamíferos poseían un par de cromosomas XY y todas las hembras XX. Más tarde, en la década del '90, el descubrimiento del gen SRY (del inglés: *Sex-determining Region on the Y chromosome*) terminaría con la larga búsqueda del responsable de la diferenciación de machos y hembras en mamíferos (Haqq y Donahoe 1998).

Actualmente se sabe que la diferenciación sexual en los mamíferos es un proceso controlado genéticamente y por hormonas (Hernandez-Valencia y Zarate 2010) que implica tres etapas cronológicas de desarrollo. La primera etapa es cuando se determina "el sexo genético", lo que se produce poco después de la fertilización cuando el sexo del cigoto se define por la presencia de un cromosoma X ó Y en el pronúcleo masculino. La segunda etapa conocida como "determinación sexual" implica procesos moleculares que abren vías alternativas de expresión génica previas a la diferenciación sexual morfológica de la gónada embrionaria. La tercera etapa se denomina "diferenciación sexual somática o fenotípica" y se refiere al desarrollo de las características morfológicas masculinas y femeninas, que comienza en la sexta o séptima semana de gestación en los humanos o día 11,5 postcoito en el ratón. Durante el desarrollo embrionario temprano los dos sexos son indistinguibles y poseen dos pares de conductos genitales: los conductos mesonéfricos o de Wolf y los conductos paramesonéfricos o de Müller. La diferenciación del sexo masculino de los conductos de Wolf (desarrollo de órganos reproductivos internos y externos, y la adquisición de caracteres sexuales secundarios masculinos) obedece a la producción de hormonas por los testículos: hormona anti-Mülleriana, producida por las células de Sertoli, y testosterona secretada por las células de Leydig. En ausencia de estas hormonas y del gen

SRY, se produce el correspondiente desarrollo y fusión de los conductos de Müller y por consiguiente la diferenciación sexual femenina (Vigier y col., 1989). Sin embargo, el proceso que conduce al dimorfismo sexual del individuo continúa después de nacimiento.

Específicamente en ratones, el conducto de Müller antes del nacimiento es histológicamente indiferenciado y de apariencia homogénea, consistiendo en un epitelio simple sostenido por un mesénquima indiferenciado. Durante las primeras dos semanas de vida postnatal ocurre la máxima diferenciación del tracto reproductor femenino (TRF) (Daftary y Taylor 2006; Kurita y col., 2001). Esta diferenciación es gobernada por interacciones epitelio-mesénquima del conducto Mülleriano que son finamente orquestadas por la expresión de genes homeóticos específicos y por numerosas cascadas de genes que regulan la diferenciación de las células madre, la proliferación y el crecimiento tisular (Daftary y Taylor 2006). Inicialmente, señales paracrinas procedentes de la expresión de moléculas específicas por el mesénquima, inducen la diferenciación de los epitelios oviductal, uterino, cervical y vaginal (Kurita y col., 2001). Estudios de recombinación tisular han demostrado que durante la etapa de diferenciación del tracto reproductor de la hembra, el epitelio mülleriano mantiene cierta plasticidad y es capaz de responder a señales inductivas del mesénquima. Es decir, cuando el mesénquima que va a dar origen al útero es recombinado con el epitelio que formará la vagina, éste se diferencia en un epitelio cilíndrico simple propio del epitelio uterino, en lugar de diferenciarse en epitelio vaginal (estratificado escamoso) (Miller y Sassoon 1998). Los diferentes tipos de epitelio pueden identificarse, no solo desde el punto de vista histomorfológico sino también por la expresión de moléculas específicas asociadas a los procesos de maduración y diferenciación, tales como las citoqueratinas (CK- componentes del citoesqueleto de células epiteliales) y p63 (Kurita y col., 2005).

### **1.1. Morfogénesis uterina**

Específicamente, la morfogénesis postnatal del útero presenta eventos comunes en todos los mamíferos, que incluyen: (1) desarrollo y diferenciación de

las glándulas uterinas (adenogénesis); (2) organización y estratificación del estroma endometrial; y (3) diferenciación y crecimiento del miometrio. Durante este periodo de morfogénesis uterina, el microambiente hormonal es crucial ya que, a través de una compleja serie de interacciones entre los receptores hormonales y moléculas de señalización específicas, se programará a las células diana para responder apropiadamente a señales hormonales durante la vida adulta. La morfogénesis uterina es un periodo crítico en el desarrollo, debido a que situaciones de perturbación hormonal pueden causar problemas reproductivos a largo plazo en la adultez (Hayashi y col., 2011; Newbold y col., 2009; Peretz y col., 2014; Reed y Fenton 2013; Varayoud y col., 2014).

La familia de genes homeóticos llamados *Hox* (del inglés: *Homeobox*), poseen una secuencia altamente conservada de 183 pb que codifica para un dominio de 61 aminoácidos llamado "homeodominio". Estos genes cumplen roles muy importantes en el desarrollo y el establecimiento de patrones de expresión específicos en el eje corporal antero-posterior durante el desarrollo perinatal (Daftary y Taylor 2006). En el ratón y en el humano, los genes *Hox* se distribuyen en 4 clusters separados: A, B, C y D, conteniendo cada uno entre 9 y 13 genes. Estos genes codifican proteínas que actúan como factores de transcripción activando una cascada de genes reguladores (Daftary y Taylor 2006; Martin y col., 2007). Se ha demostrado que el gen *Hoxa9* se expresa preferentemente en los oviductos, *Hoxa10* en el útero, *Hoxa11* en el útero y cérvix y *Hoxa13* en la vagina (figura 1). En ratones modificados genéticamente se ha observado que la alteración de este patrón de expresión produce cambios anatómicos significativos en la organización espacial del tracto reproductor (Taylor y col., 1997). Así, la interrupción en la expresión del gen *Hoxa10* provoca que el 25% de la porción anterior del útero se transforme en oviducto, impidiendo la correcta implantación del embrión (Block y col., 2000).

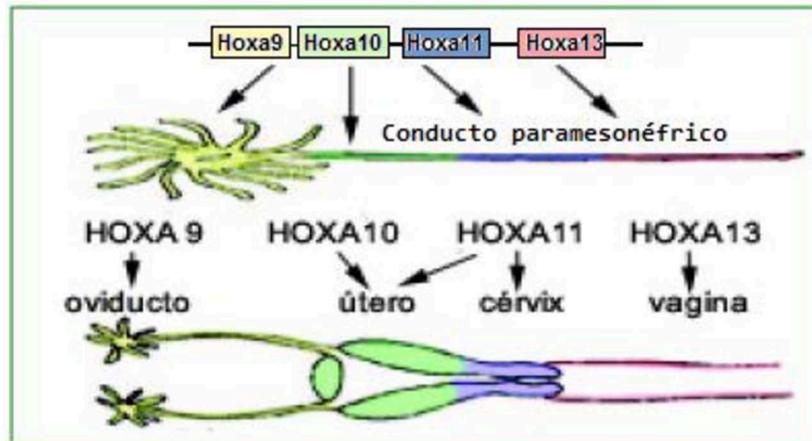


Figura 1: Representación esquemática del dominio espacial de los genes HOX en el desarrollo del conducto paramesonéfrico humano. Tomado y modificado de Daftary y Taylor (2006).

La familia de genes **Wnt** (del inglés: *Wingless-related MMTV integration site*) son los homólogos en vertebrados de los genes “*Wingless*” de *Drosophila Melanogaster*, implicados en el establecimiento de patrones de polaridad de segmentos corporales durante la embriogénesis de la mosca (Moon y col., 1997). En mamíferos, codifican para una familia de glicoproteínas de secreción que incluye al menos 16 miembros con secuencias altamente conservadas, y que exhiben roles cruciales en los procesos de proliferación celular, diferenciación y embriogénesis (Miller y col., 1998b; Tulac y col., 2003). Seis miembros de ésta familia (Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt11 y Wnt16) se expresan en altos niveles en el útero durante el desarrollo (Hayashi y col., 2011; Kurita 2011). Durante la diferenciación postnatal, Wnt4, Wnt5a y Wnt16 se encuentran predominantemente en el estroma endometrial mientras que Wnt7a, Wnt7b y Wnt11 se expresan principalmente en el epitelio uterino. Ratones mutantes del gen Wnt4 no logran formar los conductos de Müller y mueren al nacer debido a numerosos defectos (Vainio y col., 1999). Por el contrario, ratones con delección del gen Wnt7a o Wnt5a son viables, pero presentan malformaciones en el TRF como útero hipoplásico, ausencia de glándulas uterinas e infertilidad (Mericskay y col., 2004; Miller y Sassoon 1998; Tulac y col., 2003). Además, en animales con ausencia de Wnt7a, el epitelio uterino se diferencia en un epitelio estratificado y demuestra una falta de respuesta al mesénquima, sugiriendo un rol importante de Wnt7a en las

interacciones epitelio-mesénquima y en el mantenimiento de la identidad del epitelio uterino (Kurita 2011; Miller y Sassoon 1998). En el mismo sentido, la ausencia de  $\beta$ -catenina que es un mediador intracelular crítico de la vía de señalización de Wnt, induce la formación de metaplasia escamosa en el epitelio luminal (Jeong y col., 2009), confirmando la importancia de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina en el mantenimiento del fenotipo epitelial columnar del útero. Por otro lado se ha observado que la exposición neonatal a compuestos con actividad estrogénica altera la expresión de Wnt7a y Wnt5a, causando un rango de defectos uterinos similares a los observados en modelos de delección (*knockout*) del gen (Hayashi y col., 2011; Mericskay y col., 2004).

El gen **p63** es un homólogo del gen supresor tumoral p53. Tras un año de haber sido descubierto (Yang y col., 1998), comenzaron a reportarse estudios en modelos de *knockout* para p63, en los que se demostraba que este gen cumplía roles importantes en el desarrollo y diferenciación epitelial (Mills y col., 1999; Yang y col., 1999). En mamíferos, el gen p63 está localizado en el brazo largo del cromosoma 3 (3q27–q28) y es expresado en al menos 10 isotipos (Kouwenhoven y col., 2015). El uso de dos promotores diferentes resultan en la transcripción de dos isoformas protéicas con distintos extremos N-terminal: la isoforma TA, que contiene los exones 1-3 en su extremo N-terminal, y la isoforma delta-N ( $\Delta N$ ), que contiene el exón 3' en su extremo N-terminal (figura 2).

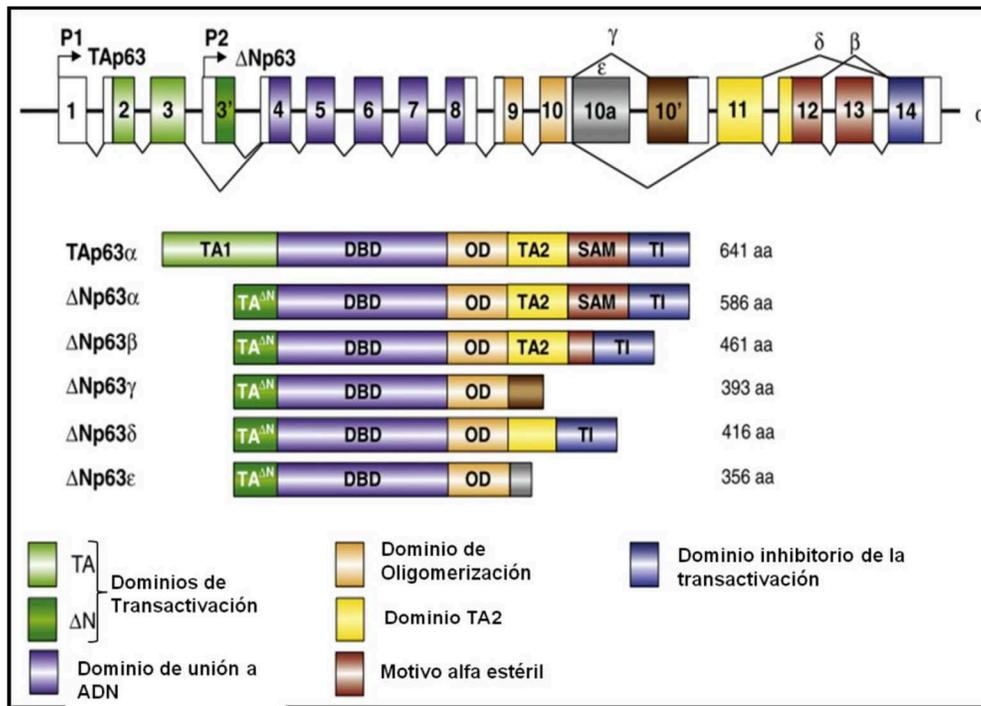


Figura 2: Representación esquemática de la estructura del gen p63 y de sus isoformas proteicas. Dos promotores (P1 y P2) dan lugar a las dos isoformas en el extremo N-terminal: TA y  $\Delta$ N, respectivamente. El empalme alternativo y la terminación prematura en el extremo C-terminal origina las isoformas p63  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Los exones que codifican los diversos dominios funcionales de p63 se esquematizan en diferentes colores. aa: aminoácidos; TA<sup>ΔN</sup> Dominio de transactivación de las isoformas  $\Delta$ Np63. Tomado y modificado de Kouwenhoven y col., (2015).

Durante mucho tiempo se pensó que la isoforma  $\Delta$ N carecía de un dominio de activación y actuaba como represor dominante de la isoforma TA. Sin embargo, se ha demostrado que  $\Delta$ N también exhibe actividad de transactivación y contiene un dominio de activación TA<sup>ΔN</sup> en su extremo N-terminal (Helton y col., 2006; Mangiulli y col., 2009). Por otro lado, el empalme (splicing) alternativo del ARNm da lugar a las isoformas  $\alpha$  (que se genera a partir de la transcripción y traducción de todos los exones codificantes),  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (figura 2) (Kouwenhoven y col., 2015). Además, como resultado de la terminación prematura de la transcripción en el exón 10, se genera la isoforma  $\epsilon$ , con distinto extremo C-terminal (figura 2).

Las variantes de la proteína p63 están compuestas por varios dominios funcionales (figura 2). Todas las isoformas presentan un dominio TA en el extremo N-terminal. Otro dominio de activación (TA2) se encuentra posicionado entre los aminoácidos 410 y 512, y está presente en las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  (Ghioni y col.,

2002). El dominio de unión a ADN (DBD) y el dominio de oligomerización están presentes en todas las isoformas y están conservados entre p63 y p53. Hacia el extremo C-terminal existe un dominio alfa estéril (SAM, presente en las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ ), que normalmente se encuentra en proteínas reguladoras del desarrollo en mamíferos y que está involucrado en las interacciones proteína-proteína (Bork y Koonin 1998). Por último, las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  presentan un dominio de inhibición de la transactivación (TI) (Ghioni y col., 2002).

El patrón de expresión de p63 es establecido durante la primera semana de vida postnatal. Experimentos de recombinación tisular han demostrado que el patrón de expresión de p63 es regulado por el mesénquima (Kurita y Cunha 2001). Inicialmente, p63 se expresa en las células epiteliales del conducto de Müller, que continúan siendo cilíndricas e indiferenciadas durante algunos días. El patrón de expresión de p63 posteriormente se estabiliza y las células del epitelio cervicovaginal (escamosas) continúan expresando p63 y se diferencian de las uterinas (cilíndricas) que no lo expresan (figura 3). Esta diferenciación epitelial se hace irreversible en la adultez (Kurita y col., 2004).

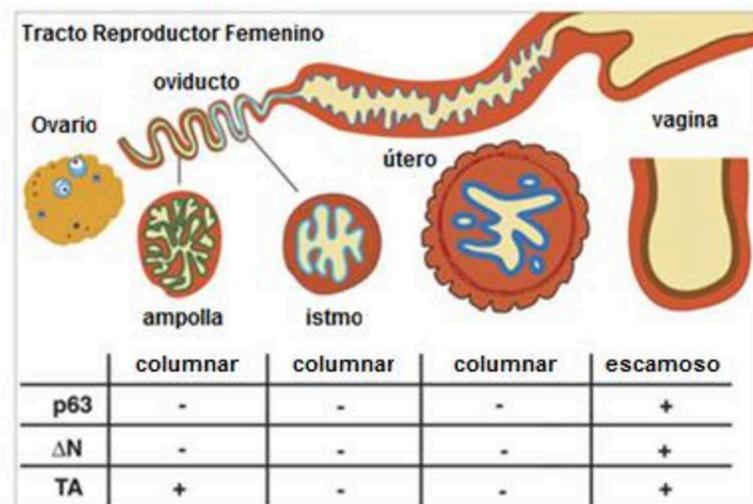


Figura 3: Patrón de expresión de p63 total y de las isoformas TA y  $\Delta N$  en el tracto reproductor de la hembra. Tomado y modificado de Kurita y col., (2005).

Koster y col., (2004) demostraron que la isoforma TA es la primera en expresarse durante la morfogénesis epidermal, y que es necesaria para el inicio de la estratificación epitelial de la epidermis. Además, la expresión ectópica de TA en un epitelio simple, *in vivo*, da como resultado la inducción de metaplasia escamosa, sugiriendo el rol de esta isoforma como un *switch* molecular (Koster y col., 2004). Por su parte la expresión de  $\Delta N$  se cree que podría estar involucrada en la maduración de los epitelios estratificados, permitiendo a las células responder a señales requeridas para la diferenciación y maduración de este tipo de epitelios. De esta manera p63 cumpliría un doble rol: iniciación de la estratificación del epitelio durante el desarrollo (mediado por la isoforma TA) y mantenimiento del potencial proliferativo en el epitelio maduro a través de la isoforma  $\Delta N$ . Como se comentó anteriormente, en el adulto, p63 es altamente expresado en células basales de epitelios estratificados como la vagina y el cérvix, pero no en el epitelio uterino (Kurita y Cunha 2001; Kurita y col., 2005). Sin embargo, una desregulación en el patrón de expresión de p63 puede traer consecuencias adversas en la diferenciación funcional del TRF. Se ha observado por ejemplo, que la exposición a químicos estrogénicos durante el desarrollo induce lesiones del TRF como adenosis vaginal y/o metaplasias escamosas en el útero (Kurita y col., 2004). Estas lesiones son caracterizadas por un cambio en el tipo de epitelio que involucra alteraciones en el patrón de expresión de p63 (Kurita y Cunha 2001; Kurita y col., 2004).

### **1.1.1. Adenogénesis**

El concepto de que las secreciones uterinas son esenciales para el éxito reproductivo se remonta a la época de Hipócrates (460-370 aC), que argumentaba que a medida que el útero crecía con el embarazo, el tracto reproductivo generaba presión contra los pechos y la leche materna era bombeada directamente desde las “arterias uterinas” (Revisado en Cooke y col., 2013). Muchos siglos más tarde, William Harvey (1578-1657) demostró que el embrión se alimentaba de sustancias especiales dentro del útero, y Walter Needham (1631-1691) argumentó que ésa sustancia, a la que llamó “leche uterina”, era muy importante para la nutrición fetal.

A principios del siglo XX, se demostró que las sustancias esenciales para el apoyo del embrión y el desarrollo fetal eran suministradas a través del útero, bien: (i) directamente de la sangre; o (ii) por la actividad biosintética del endometrio uterino. Evidencias empíricas demostraron que las secreciones uterinas provenientes de glándulas endometriales son necesarias para el establecimiento y mantenimiento del embarazo (Revisado en Cooke y col., 2013).

Actualmente se sabe que la morfogénesis y diferenciación de las glándulas uterinas o adenogénesis es uno de los eventos más importantes en el desarrollo neonatal del útero (Gray y col., 2001; Spencer y col., 2012). En roedores, la adenogénesis uterina procede desde el día postnatal (DPN) 9 hasta el DPN15, y se caracteriza por invaginaciones del epitelio luminal que representan la aparición de “yemas” de epitelio glandular (Gray y col., 2001), y formación de glándulas tubulares simples dentro del estroma, que, a diferencia de las glándulas endometriales en los seres humanos y los animales domésticos, no experimentan demasiado enrollamiento ni ramificación (Cooke y col., 2013; Gray y col., 2001). En la figura 4 se esquematiza el proceso de adenogénesis que tiene lugar en la mayoría de los mamíferos.

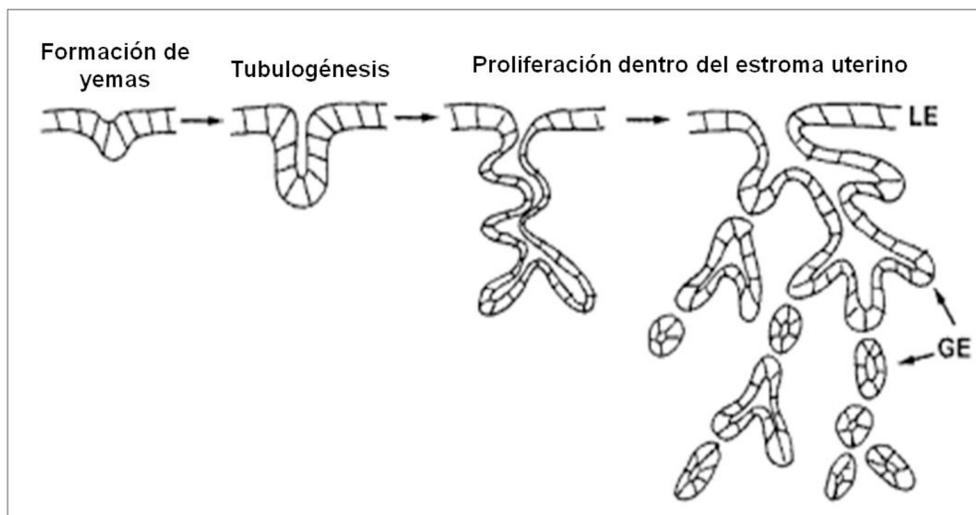


Figura 4: Proceso general de adenogénesis uterina. El primer paso es la formación de yemas de epitelio glandular (GE). Esto crea una protuberancia en una porción basal de las células epiteliales en el punto donde comenzará la invaginación del epitelio luminal (LE). El siguiente paso es la tubulogénesis, que implica divisiones celulares para convertir la yema en un tubo. Las glándulas tubulares simples luego comienzan a proliferar y penetran en el estroma subyacente. La etapa final de adenogénesis es el enrollamiento y ramificación del GE dentro del estroma hasta llegar a la

capa circular interna del miometrio, que en roedores prácticamente no se produce. Tomado y modificado de Gray y col., (2001).

Se ha demostrado en modelos animales de *knockout*, que los genes *Wnt7a* y *Wnt5a* cumplen un rol indispensable en la iniciación y progresión de la adenogénesis (Dunlap y col., 2011; Mericskay y col., 2004; Miller y Sassoon 1998). La ablación condicional de *Wnt4* en el útero después del parto genera una reducción en el número de glándulas uterinas (Franco y col., 2011) mientras que la ausencia de  $\beta$ -catenina también ocasiona perturbaciones en el proceso de adenogénesis (Jeong y col., 2009). Además, como se mencionó anteriormente, la expresión de *Wnt4* y *Wnt5a* ocurre principalmente en el estroma, mientras que *Wnt7a* se expresa predominantemente en el epitelio, demostrando que en ambos tipos celulares, las vías de señalización de los Wnt son necesarias para el desarrollo glandular (Mericskay y col., 2004).

Los mecanismos moleculares que gobiernan la adenogénesis aún no se conocen en su totalidad. Existen evidencias que indican que *Hoxa10* y *Hoxa11* también participarían en una vía morfogénica común con *Wnt7a* para dirigir el crecimiento a lo largo del eje radial del cuerno uterino y la subsiguiente diferenciación estroma-epitelial requerida para la adenogénesis (Miller y Sassoon 1998). Mericskay y col., (2004) sugirieron que para dar lugar al inicio de la adenogénesis durante el desarrollo postnatal, sería necesaria una disminución en la expresión de *Wnt7a* en las células epiteliales que comienzan a invaginarse para formar las glándulas. Además, la expresión de *Wnt5a* en el estroma uterino actuaría como un “promotor” de la disminución de *Wnt7a* en el epitelio, teniendo en cuenta que en ratones con ausencia de *Wnt5a*, no se observó esa disminución de *Wnt7a* en el epitelio, y por consiguiente, no hubo formación de glándulas uterinas (Mericskay y col., 2004). Alternativamente se ha propuesto que la ausencia de glándulas uterinas en modelos de *knockout* para *Wnt7a* podría ser una consecuencia directa de la diferenciación escamosa que se produce en el epitelio luminal de esos animales, que imposibilitaría el proceso normal de adenogénesis (Mericskay y col., 2004).

## 2. Diferenciación funcional uterina en la adultez

El aparato reproductor de la hembra está formado por los ovarios y el sistema conductor. Este último no solo recibe el óvulo expulsado por el ovario, y lo conduce al lugar de implantación en el útero, sino que recibe a los espermatozoides y los transporta hasta el oviducto, donde se realiza la fecundación. En sentido cráneo-caudal el sistema conductor de la hembra consta de las siguientes partes: los oviductos, el útero, el cérvix, la vagina y los genitales externos.

El **útero** es un órgano muscular, hueco, extraperitoneal, situado en la pelvis entre la vejiga y el recto. En la rata, a diferencia de la mujer, el útero adopta una forma bicornue (figura 5).

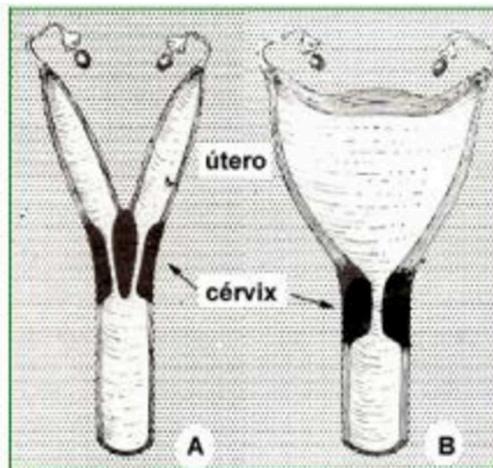


Figura 5: Esquema comparativo de la anatomía del útero y cérvix. A. Rata, B. Mujer. Tomado y modificado de Nalbandov (1969).

Histológica y funcionalmente, el útero de los roedores posee tres regiones o capas: 1) *Perimetrio*, 2) *Miometrio*, y 3) *Endometrio* (Geneser 2000) (figura 6).

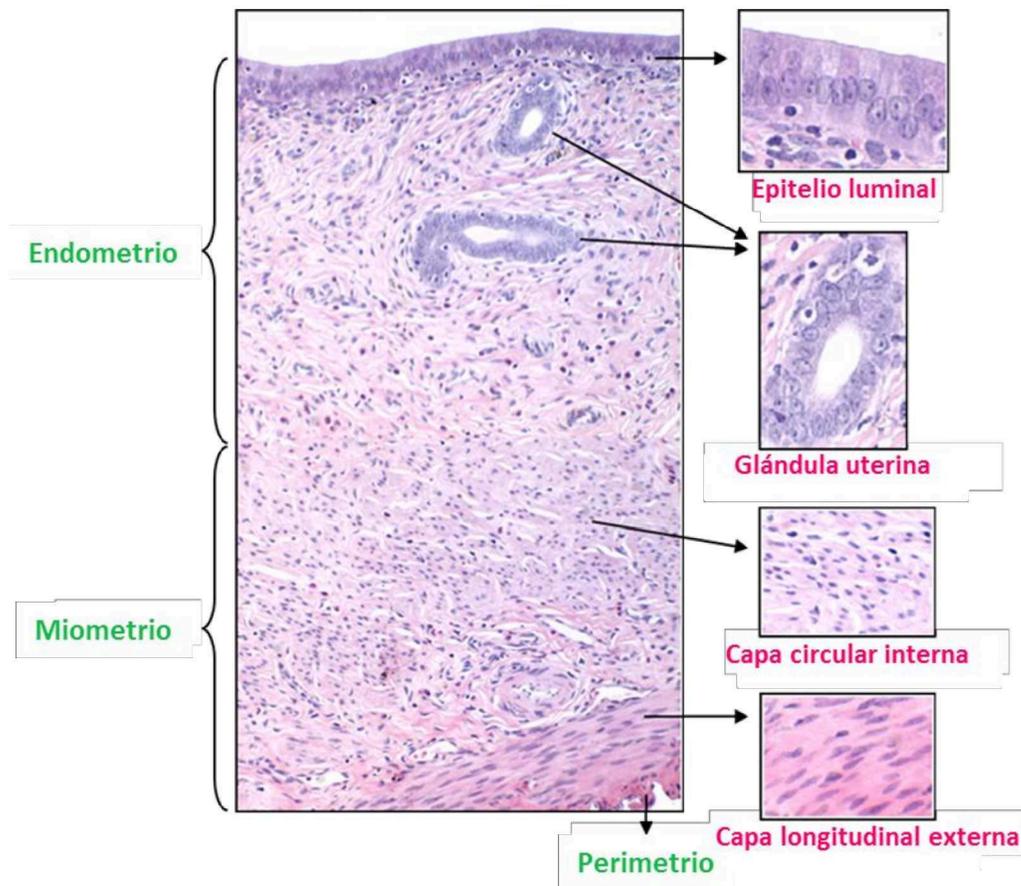


Figura 6: Fotomicrografía de una sección histológica de útero de rata. Observe las características tisulares de cada una de las capas. Coloración: Hematoxilina-Eosina. Magnificación: 20X (panel izquierdo) y 40X (panel derecho).

El perimetrio es la capa más externa que recubre al útero, está compuesto por mesotelio y una delgada capa de tejido conjuntivo laxo. Presenta abundantes vasos linfáticos, sanguíneos y fibras nerviosas, y está recubierto por la serosa peritoneal. El miometrio se encuentra subyacente al perimetrio, y está compuesto por dos capas de músculo liso: una capa circular interna y una longitudinal externa, separadas por tejido conectivo. Entre ambas capas existe también un gran estrato vascular. El endometrio está constituido por un epitelio cilíndrico simple que reviste el lumen del útero, cuyas células pueden ser ciliadas o secretorias. Por debajo de este epitelio y separado por una membrana basal, se localiza una capa de tejido conectivo laxo, el estroma, ocupado principalmente por fibroblastos y muy vascularizado. Dentro del estroma se encuentran las glándulas

uterinas, formadas por un epitelio cúbico simple. Además, alrededor del epitelio glandular existe una capa de células estromales de naturaleza fibroblástica, que expresan también alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), otorgándoles características de miofibroblastos (Czernobilsky y col., 1993). De este modo se ha propuesto que esas células colaboran en la función contráctil de las glándulas, así como en la regulación y respuesta de señales provenientes del estroma, necesarias para el mantenimiento de la arquitectura y función glandular (Czernobilsky y col., 1993).

Luego de la pubertad, el útero experimenta cambios funcionales cíclicos (proliferación, producción de proteínas de secreción, apoptosis, etc.) en respuesta a cambios en los niveles séricos de hormonas ováricas (Wood y col., 2007). Al igual que durante el periodo de desarrollo perinatal, las interacciones entre el estroma y el epitelio son críticas para mediar los efectos de estas hormonas, muchos de los cuales ocurren a través de sus receptores específicos (Cunha y col., 2004).

## **2.1. Ciclo estral**

La palabra *estro* fue utilizada por primera vez en el año 1900, como una adaptación latina de la palabra griega *oistros*, que significa picadura o frenesí, para describir el "período especial de deseo sexual femenino" (Freeman 1994). El *estro* es una manifestación externa que se identifica en el animal.

El inicio de la pubertad en la rata hembra resulta de una cascada de eventos que comienzan con el establecimiento de un patrón de liberación pulsátil de la hormona luteinizante (LH, del inglés: *Luteinizing Hormone*) después de la cuarta semana de vida postnatal, ocho o nueve días antes del inicio del ciclo estral (Westwood 2008).

El ciclo estral presenta una serie de eventos hormonales y de comportamientos altamente sincronizados y que se repiten en el tiempo. El ciclo estral de la rata, a diferencia del ciclo menstrual de la mujer, se caracteriza por una conducta de receptividad sexual en forma coincidente con la ovulación, lo que en presencia de un macho asegura la oportunidad para la fertilización y la preñez.

El ciclo estral de la rata tiene una duración de 4 o 5 días y se la considera poliestrica continua, es decir, los ciclos ocurren durante todo el año sin cambios estacionales en las colonias de laboratorio (siempre que los animales se mantengan en un esquema de luz-oscuridad y de temperatura controlados) (Ojeda y Urbanski 1994). Los ciclos estrales ocurren desde el comienzo de la pubertad hasta la senescencia y pueden dividirse en 4 etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. La duración del proestro es aproximadamente de 12 horas, mientras que el estro presenta un rango de 9 a 15 horas, el metaestro entre 14 y 18 horas, y el diestro tiene una duración de 60 a 70 horas (Lawson 2001).

El útero, al igual que los ovarios y la vagina, experimenta cambios morfológicos a lo largo del ciclo estral (Westwood 2008). Al comienzo del diestro, el útero es pequeño y carece de una vasculatura muy desarrollada. Está revestido por un epitelio cúbico o columnar bajo. Inicialmente hay pocas mitosis y las glándulas son particularmente inactivas, aunque la actividad mitótica aumenta con la progresión de la fase. Hacia el final del diestro, puede observarse edema del estroma subyacente al epitelio. Durante el proestro, las células del epitelio luminal pasan de ser cúbicas a cilíndricas, formando un epitelio columnar simple. Hay mitosis frecuentes y la degeneración de las células epiteliales glandulares y lumbinales es escasa o nula (la aparición de degeneración de las células epiteliales marca el final del proestro/inicio del estro) y hay poca infiltración de células inflamatorias. La vasculatura del endometrio se hace más prominente, y el estroma puede mostrar algo de edema. Los cambios en el epitelio definen el inicio del estro, con la aparición de degeneración celular y apoptosis en el epitelio glandular y luminal. Esto es acompañado por una pérdida de actividad mitótica y por la infiltración de leucocitos (Westwood 2008). Finalmente, durante el metaestro, el epitelio endometrial muestra continua degeneración y un retorno en la actividad mitótica.

Los cambios que experimenta el útero durante el ciclo estral responden a fluctuaciones en los niveles hormonales de  $17\beta$ -estradiol (E2) y Progesterona (Pg) (Wood y col., 2007), reguladas por las gonadotropinas LH y FSH (del inglés: *Follicle Stimulating Hormone*) secretadas por la hipófisis anterior. Los cambios

hormonales que se producen durante el ciclo estral de la rata se esquematizan en la figura 7. El pico de LH durante el proestro estimula al folículo preovulatorio a ovular y a formar el cuerpo lúteo. Dos picos de FSH periovulatorios estimulan el crecimiento de folículos más pequeños. Durante el metaestro el cuerpo lúteo secreta Pg que decae durante el segundo día del diestro cuando comienzan a aumentar los niveles de E2. El ciclo se completa durante el proestro cuando ocurre el pico de E2 que estimula la liberación de gonadotrofinas que llevan a la ovulación (Lohmiller y Swing 2006).

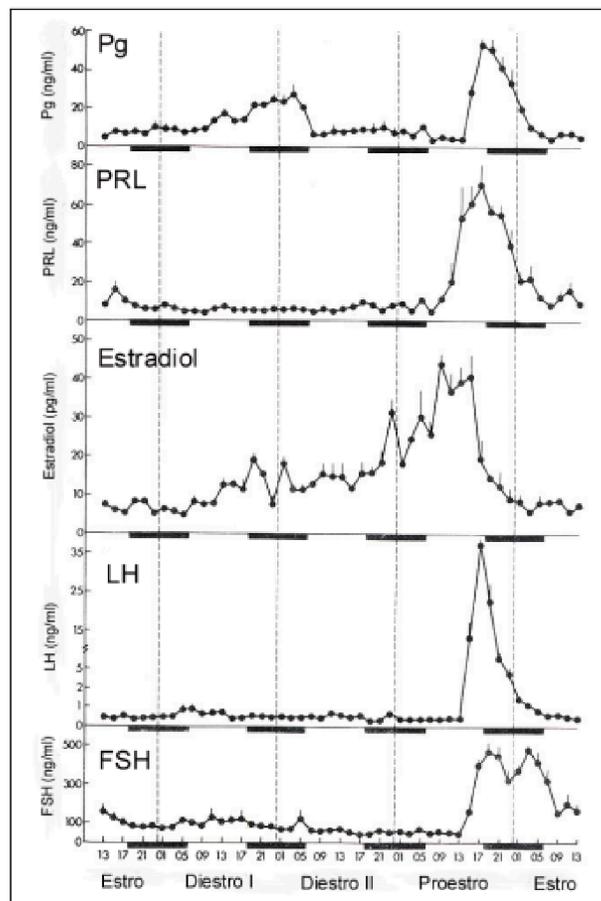


Figura 7: Niveles hormonales de progesterona (Pg), prolactina (PRL),  $17\beta$ -estradiol (E2), hormona leutinizante (LH) y hormona foliculo estimulante (FSH) durante el ciclo estral de la rata. Los números sobre el eje x representan distintos momentos del día considerando 24 horas de reloj. Las barras en negro representan el período de oscuridad. Las líneas de punto vertical señalan la medianoche. Cada punto representa el promedio de la concentración hormonal con su desviación estándar. Tomado y modificado de Smith y col., (1975).

### 2.1.1. Cambios en el ciclo estral en ratas de edad avanzada

La disminución de las funciones reproductivas durante la mediana edad es una característica general de los mamíferos adultos. En ratas, la variación en la longitud de los ciclos estrales se debe a diversos factores, entre ellos las condiciones sociales y medioambientales, y la edad. Las ratas por lo general no presentan un cese abrupto y permanente de la ciclicidad estral, sino que comienzan a manifestar una serie de cambios transitorios antes de entrar en anestro (ausencia del estro) permanente, la última etapa de la senescencia reproductiva (Lu y col., 1979; vom Saal y col., 1994). A partir de los nueve meses de edad, dependiendo de la cepa de rata, comienzan a observarse ciclos estrales irregulares y aumento en la longitud (en días) de los mismos (figura 8) (Lu y col., 1979; vom Saal y col., 1994).

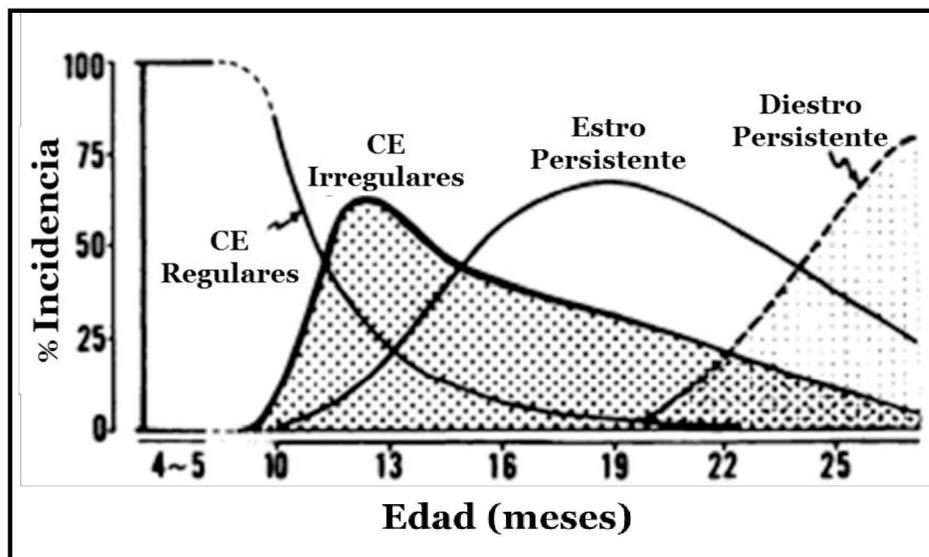


Figura 8: Cambios cronológicos en los patrones de periodicidad del ciclo estral de ratas hembra entre nueve y veintiséis meses de edad. La incidencia de ciclos estrales (CE) regulares se reduce vertiginosamente a partir de los nueve meses de edad aproximadamente. Obsérvese que la mayor incidencia de ratas con ciclos irregulares se produce alrededor de los doce meses de edad. Este período es seguido por una fase de estro persistente de varios meses de duración, y finalmente, la última fase de la senescencia reproductiva que es el diestro persistente. Tomado y modificado de Lu y col., (1979).

Alrededor de los doce meses de edad, la incidencia de ratas con ciclos irregulares es muy elevada (figura 8). Tras este periodo comienza un estadio en el

cual predominan las células epiteliales cornificadas (queratinizadas) en la citología vaginal. Este estadio puede durar varios meses y se lo denomina “cornificación vaginal persistente o “estro persistente” (figura 8) (Lu y col., 1979; vom Saal y col., 1994). Después del estro persistente, algunos animales suelen experimentar intervalos irregulares e intermitentes de diestro (de diez a catorce días de duración), sugerentes de una fase lútea prolongada. A este estado se lo denomina “pseudopreñez repetitiva” (Lu y col., 1979; vom Saal y col., 1994). Finalmente, la última etapa de la senescencia reproductiva es el “anestro o diestro persistente” (figura 8), en la cual se observa baja densidad de células epiteliales y leucocitos en la citología vaginal (vom Saal y col., 1994). En esta etapa, se produce la caída permanente en los niveles de E2 (con características similares a las observadas en ratas ovariectomizadas) y las ratas no presentan ovulación (vom Saal y col., 1994).

## **2.2. Expresión de Wnt en el útero**

Además de las numerosas evidencias acerca de la importancia de algunos miembros de la familia Wnt en la morfogénesis uterina (ver sección 1.1), cada vez son más los autores que sugieren que genes de la familia Wnt juegan un rol esencial en la funcionalidad del tracto reproductor femenino en la adultez (Kurita 2011; Miller y col., 1998b; Pavlova y col., 1994).

Para que se activen los mecanismos de acción intracelulares que gobiernan los Wnt, estas moléculas se unen en primera instancia a receptores de membrana celular de la familia Frizzled (Fz), que median la transducción de señales intracelulares (Clevers 2006). Luego de la unión Wnt-Fz, tres vías de señalización distintas pueden activarse (van der Horst y col., 2012): la canónica, que involucra la activación intracelular de  $\beta$ -catenina como principal mediador (Clevers 2006), la no canónica de polaridad celular planar (Katoh 2005), o la no canónica Wnt/Ca<sup>2+</sup> (Kohn y Moon 2005).

Se ha demostrado que Wnt7a, Wnt5a y Wnt4, se expresan en el útero durante la adultez y que su expresión está vinculada con los niveles de hormonas circulantes (Miller y col., 1998b). Los cambios en los patrones de expresión de los

genes Wnt observados durante el ciclo estral sugieren que la vía de señalización de Wnt podría cumplir un rol importante en las interacciones estroma-epitelio y en los cambios celulares que ocurren en el tracto reproductivo en respuesta a fluctuaciones hormonales (Miller y col., 1998b). En el útero, Wnt5a se expresa durante el diestro y el estro en el estroma y el epitelio endometrial, mientras que durante el proestro y metaestro la expresión se restringe al estroma. Se ha sugerido que el E2 podría reprimir la expresión de Wnt5a en el epitelio uterino a través de interacciones estroma-epitelio. Por su parte, se ha observado que la expresión de Wnt7a en el adulto se restringe a las células epiteliales del útero, y los mayores niveles de expresión se corresponden con las etapas del ciclo estral con altos niveles de Pg, sugiriendo que la Pg podría estar induciendo la expresión de Wnt7a en el epitelio uterino (Miller y col., 1998b). Por otro lado, y en relación con lo anteriormente mencionado que ratones *knockout* para Wnt7a presentan metaplasias escamosas en el epitelio del útero (sección 1.1), Kurita y Nakamura (2008) demostraron en ratones “*postaxial hemimelia*”, mutantes espontáneos para Wnt7a, que los estrógenos (Eg) cumplen un rol esencial en la formación de metaplasias escamosas uterinas. Cuando estos ratones fueron ovariectomizados en el DPN35, el epitelio uterino mantuvo su fenotipo normal (cilíndrico), mientras que el posterior tratamiento con E2 en el DPN60 indujo la expresión de p63 y la transformación del epitelio uterino en un epitelio escamoso, demostrando que los Wnt son importantes genes diana de la acción de los Eg y del mantenimiento del fenotipo epitelial uterino (Kurita y Nakamura 2008).

### **2.3. Interacciones estroma-epitelio reguladas por estrógenos**

Como se ha mencionado, los procesos de diferenciación funcional uterina en el adulto dependen de interacciones recíprocas entre el estroma y el epitelio, las cuales son mediadas por las hormonas esteroides ováricas en los distintos compartimientos del útero, a través de sus receptores específicos. En roedores, el E2 induce proliferación de las células epiteliales uterinas actuando a través del **receptor de estrógenos alfa** (RE $\alpha$ ) ubicado en el estroma. Se ha propuesto que el factor de crecimiento similar a insulina I (del inglés: *Insulin-like Growth Factor-I* -

IGF-I) podría ser el factor paracrino mediador del efecto del E2 sobre el epitelio uterino (figura 9) (Sato y col., 2002; Winuthayanon y col., 2010).

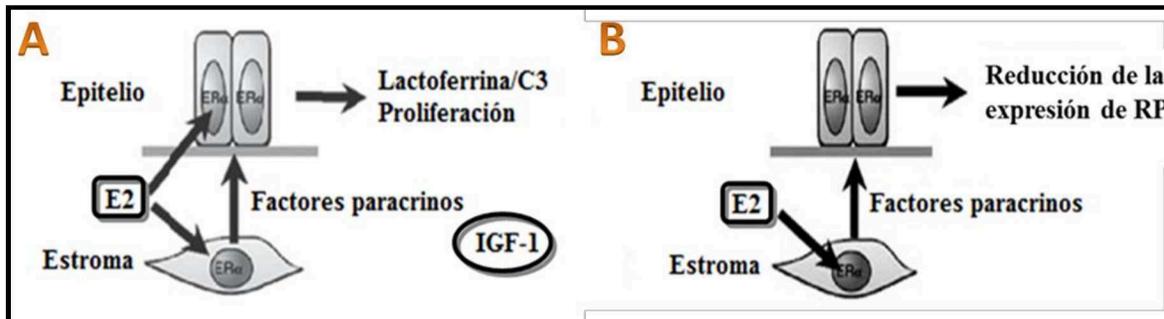


Figura 9: Esquema representativo de las interacciones estroma-epitelio en el útero, mediadas por acción del receptor de estrógenos  $\alpha$  en respuesta al estradiol (E2). Respuesta del epitelio a la producción de proteínas de secreción y proliferación (A), y a la expresión de receptor de progesterona (RP) (B). ER $\alpha$ : Receptor de estrógenos alfa, IGF-I: Factor de crecimiento similar a Insulina I. Tomado y modificado de Cunha y col., (2004).

Se ha observado que en ratones con delección específica del RE $\alpha$  epitelial, la expresión del ARNm de IGF-I aumentó luego de un tratamiento con E2 (Winuthayanon y col., 2010). Por otro lado, ratones transgénicos en los que se ha silenciado el gen del IGF-I muestran ausencia en la respuesta mitogénica al E2 en el epitelio uterino (Adesanya y col., 1999). Además, se ha demostrado que ratones expuestos perinatalmente a Eg desarrollan hiperplasia en el epitelio luminal y glandular vinculada con alteraciones en vías de señalización que involucran al IGF-I y su receptor (IGF-IR) (McC Campbell y col., 2008). De esta forma, se ha sugerido que el IGF-I podría ser un mediador crítico de las interacciones estroma-epitelio inducidas por Eg, teniendo en cuenta que el mismo es producido predominantemente en el estroma mientras que su receptor se localiza principalmente en el epitelio uterino (Sato y col., 2002).

La expresión de moléculas de diferenciación epitelial uterina también está controlada por las hormonas sexuales. El E2 regula la expresión y secreción de proteínas epiteliales tales como lactoferrina, CKs y componente del complemento C3, aunque esta regulación depende del RE $\alpha$  estromal y epitelial (figura 9 A). Esta dependencia indica que el E2 actuaría mediante efectos directos e indirectos

(paracrinos) para estimular la expresión de estas moléculas por el epitelio (Cunha y col., 2004).

Otro marcador importante de diferenciación uterina regulado por Eg es el **receptor de Pg (RP)** (Franco y col., 2012; Patel y col., 2015; Winuthayanon y col., 2010). Mediante estudios de Inmunoprecipitación de cromatina se ha demostrado que en ratones tratados con E2, el RE $\alpha$  es reclutado y se une a regiones reguladoras de los promotores de genes blanco en el útero, entre ellos el RP (Ray y Das 2006). Además, se ha observado en ratones que el tratamiento con E2 genera una disminución en la expresión de RP en el epitelio uterino (figura 9 B) y un aumento en el resto de los compartimientos (Cunha y col., 2004; Sahlin y col., 2006; Winuthayanon y col., 2010). Esta respuesta del RP al E2 depende de las acciones mediadas por el RE $\alpha$  ubicado en el estroma, y no del RE $\alpha$  epitelial (Winuthayanon y col., 2010).

#### 2.4. Receptores de hormonas esteroides

Los esteroides ováricos Eg y Pg, son reguladores claves del crecimiento, diferenciación y funciones fisiológicas de muchos tejidos, incluyendo el tracto reproductor. Estas hormonas ejercen su acción a través de sus receptores específicos, que forman parte de una superfamilia de receptores nucleares (RN) que actúan como factores de transcripción modificando la expresión génica en los tejidos sensibles para llevar a cabo la función biológica de las hormonas (Bjornstrom y Sjoberg 2005). Estructuralmente los receptores nucleares han sido divididos en varios dominios (figura 10) (Kumar y Thompson 1999).

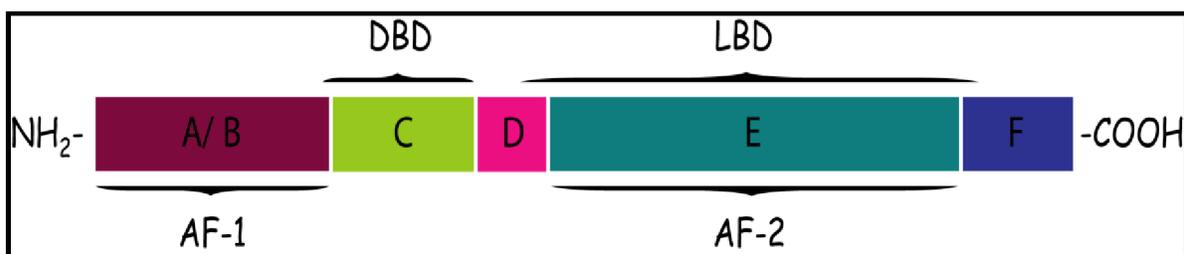


Figura 10: Organización estructural de los receptores nucleares. Esquema de las distintas regiones que comparten todos los receptores nucleares. AF-1: dominio de transactivación independiente de ligando; DBD: dominio de unión a ADN; D: región bisagra; LBD: dominio de unión a ligando; AF-2: dominio de transactivación dependiente de ligando.

Todos los receptores nucleares tienen una región NH<sub>2</sub>-terminal de longitud variable (100-500 aminoácidos) que contiene una función de transactivación (AF-1) que contribuye a la actividad transcripcional del receptor y es independiente del ligando. Adyacente, se encuentra el dominio de unión al ADN (DBD) que es la zona más conservada entre los distintos receptores nucleares. Este dominio posee un motivo de dos dedos de zinc coordinados por 8 residuos de cisteína estrictamente conservados. A continuación se localiza el dominio de unión a ligando (LBD) cerca del extremo COOH-terminal y contiene una función de transactivación 2 (AF-2), dependiente de la presencia del ligando.

La presencia de receptores para Eg (RE) en el útero fue descrita inicialmente en la década del 60 (Toft y Gorski 1966). Actualmente se conocen dos RE principales, codificados por genes diferentes: el RE $\alpha$  y el beta (RE $\beta$ ). Ambos tipos de receptores se expresan en una amplia variedad de tejidos, aunque existen notables diferencias en sus patrones de expresión.

El RE $\alpha$  es expresado mayoritariamente en el endometrio, glándula mamaria, células del estroma ovárico e hipotálamo, mientras que el RE $\beta$  es expresado mayoritariamente en riñones, cerebro, hueso, corazón, pulmones, mucosa intestinal, próstata y células del endotelio. Además de los receptores clásicos, existe una familia de receptores nucleares relacionados con los RE (ERR, del inglés: *Estrogen Receptor-related Receptors*), a la que pertenece el ERR gamma (ERR $\gamma$ ), codificado por un gen independiente y similar estructuralmente a los RE. Si bien hasta ahora no se han reportado ligandos fisiológicos para el ERR $\gamma$ , evidencias sugieren que algunos ligandos sintéticos podrían actuar como agonistas (Matsushima y col., 2007).

En las células diana, los Eg pueden actuar básicamente a través de 2 mecanismos, que se cree que son similares para los diferentes receptores (Bjornstrom y Sjoberg 2005) y se esquematizan en la figura 11:

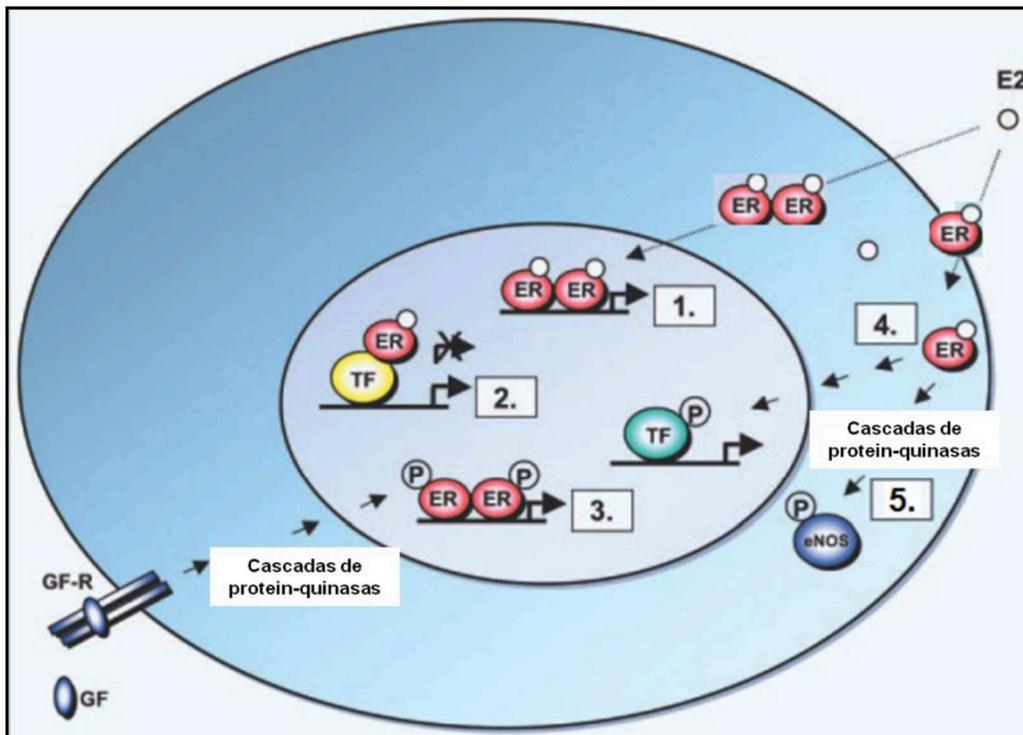


Figura 11: Representación esquemática de la vía clásica y no clásica de acción de los Estrógenos (Eg). Se muestran los distintos mecanismos de acción de los Eg según la vía clásica (1 y 2) y la no clásica (3, 4 y 5). E2; estradiol, GF; factores de crecimiento, ER; receptores de Eg; TF; factores de transcripción. Tomado y modificado de Bjornstrom y Sjoberg (2005).

La vía más estudiada es la vía clásica (genómica) en la que, en ausencia de la hormona, el receptor se encuentra unido a un complejo inhibitorio multiprotéico ubicado en el citoplasma de las células. La unión del ligando induce un cambio conformacional en el receptor que promueve su dimerización. Así el complejo Eg-RE se trasloca al núcleo celular donde puede interactuar ya sea directamente con secuencias específicas altamente conservadas denominadas elementos de respuesta a Eg (ERE, del inglés: *Estrogen Response Element*) localizados en la región promotora de los genes sensibles (figura 11-1). De manera indirecta, el complejo puede actuar a través de la unión a factores de transcripción que contactan con el promotor de genes diana (figura 11-2) (Bjornstrom y Sjoberg 2005). En este último caso, los RE pueden regular la expresión de genes diana que no contienen EREs, lo cual es muy interesante si se tiene en cuenta que un tercio de los genes regulados por RE en el humano no contienen EREs. Por ejemplo, el gen del IGF-I, la colagenasa, y la ciclina D1 son activados por E2 a

través de la unión del RE $\alpha$  con los factores de transcripción Fos y Jun en sitios de unión AP-1 de genes diana (Bjornstrom y Sjoberg 2005). Tanto en la vía clásica directa como en la indirecta, se activa la transcripción al formarse el complejo de iniciación de la transcripción que recluta diferentes coactivadores, corepresores y proteínas reguladoras de la transcripción.

La vía no clásica en cambio, involucra la activación de diferentes proteínas quinasas y puede estar mediada por mecanismos genómicos o no genómicos (Bjornstrom y Sjoberg 2005). El mecanismo genómico a su vez puede darse en ausencia de Eg, denominándose a esta variante “vía genómica independiente de ligando”, en la cual las proteínas quinasas fosforilan y activan a los RE a partir de la unión de factores de crecimiento a sus receptores en la membrana celular (figura 11-3). Este mecanismo se basa principalmente en la característica que poseen los factores de crecimiento polipeptídicos, tales como el factor de crecimiento epidermal EGF (del inglés, *Epidermal Growth Factor*), de activar al RE $\alpha$  e incrementar la expresión de los genes blanco de los mismos (Smith 1998). Otra variante del mecanismo genómico puede darse por unión del Eg a receptores de membrana, con la posterior activación de cascadas de quinasas que fosforilan factores de transcripción y modifican la transcripción de genes específicos (figura 11-4). Las acciones no genómicas del Eg, en cambio, incluyen movilización de calcio intracelular, fosforilación y activación de proteínas citoplasmáticas como eNOS y adenilato ciclasa, y dependen también de la unión del Eg a sus receptores de membrana (figura 10-5). La vía no genómica permite respuestas celulares mucho más rápidas que las genómicas, debido a que no requiere activación de la transcripción del ARN ni síntesis protéica (Bjornstrom y Sjoberg 2005).

Los receptores que unen específicamente Pg fueron caracterizados por primera vez en el útero de mamíferos en el año 1970 (Milgrom y col., 1970). A diferencia de los RE, un único gen codifica para la proteína del RP y puede producir 9 transcritos diferentes. Sin embargo, sólo se han reportado 4 isoformas proteicas en varias especies, siendo las dos más frecuentemente halladas las isoformas A (RP-A, con un peso de 81-83 kDa) y la B (RP-B, con un peso de 116-

120 kDa) (Funk y DeMayo 1999). Estas isoformas se originan como consecuencia de la activación de diferentes promotores que presentan diferentes sitios de inicio de la transcripción. RP-A es una isoforma naturalmente truncada de RP-B que funciona como un transactivador cuando actúa como homodímero y como represor de RP-B cuando ambas isoformas están presentes (Graham y Clarke 1997). El mecanismo de acción del RP unido al ligando es muy similar a la vía clásica de acción del RE, descrito anteriormente.

#### **2.4.1. Coreguladores**

El hallazgo de que la activación de un RN sobreexpresado indirectamente podía inhibir la actividad transcripcional de otro RN (Halachmi y col., 1994), y que un sistema *in vitro* consistiendo en RN purificados y factores de transcripción era ineficiente para activar la transcripción (Klein-Hitpass y col., 1990), sugirieron que se necesitaban moléculas adicionales para lograr una activación transcripcional inducida por hormonas. Hoy se sabe que la actividad de los RN depende de una gran variedad de moléculas que no se unen al ADN directamente pero son reclutados por los RN a las regiones promotoras de los genes diana, para colaborar en la regulación de la actividad transcripcional. Estas proteínas son denominadas colectivamente **coreguladores**. Estudios de *knockout* en ratones han demostrado distintos roles para diferentes coreguladores en el crecimiento y desarrollo, en patologías asociadas a la reproducción, trastornos metabólicos y cáncer (Dasgupta y col., 2014; Lonard y O'Malley 2012). Como se mencionó anteriormente, en muchos casos los RE se unen a EREs en sus genes diana e interaccionan con la maquinaria de transcripción y con los coreguladores. Éstos cooperan en reacciones de remodelación de la cromatina e intervienen en la asociación del complejo de la ARN polimerasa II con la maquinaria transcripcional en la región promotora del gen diana. Dependiendo del efecto de los coreguladores sobre el resultado de la expresión génica, ellos pueden ser divididos en **coactivadores y corepresores**. Los coactivadores se asocian a receptores unidos a agonistas y promueven la activación de la transcripción del gen diana, por ejemplo, mediante la activación de acetil-transferasas de histonas.

Los corepresores reprimen selectivamente la expresión génica por diferentes mecanismos como por ejemplo, mediante el reclutamiento de enzimas con actividad de histona deacetilasa (Hdac) hacia el complejo transcripcional (Dasgupta y col., 2014). Un modelo general de interacción de los coreguladores con el RE es presentado en la figura 12.

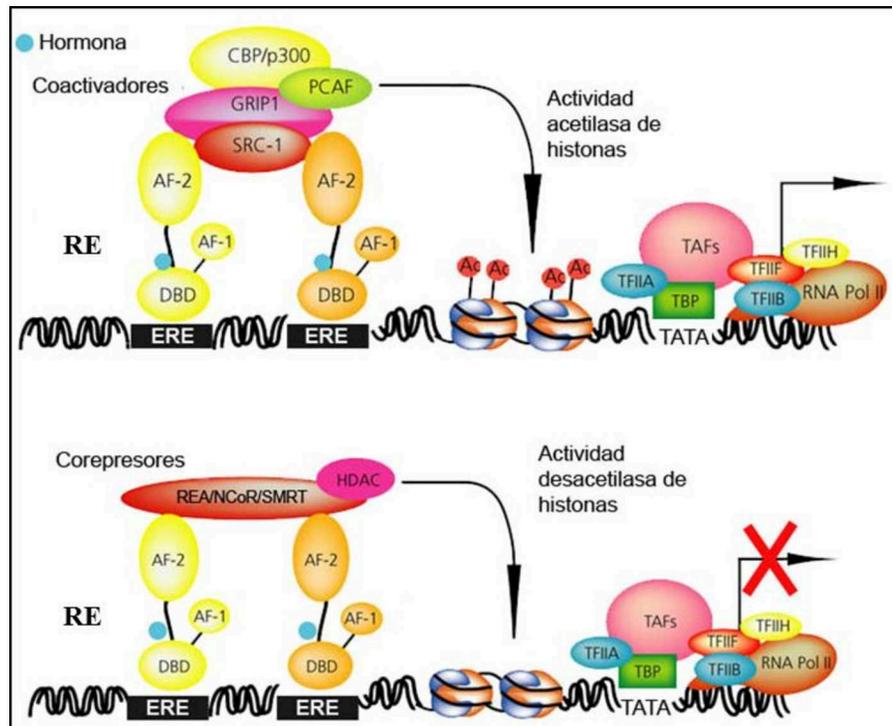


Figura 12: Reclutamiento de coactivadores y corepresores por el receptor de estrógenos (RE). El complejo receptor-coactivador activa acetiltransferasas de histonas; de esta forma, las histonas acetiladas se disocian de la cromatina y permiten que el complejo transcripcional se una a las regiones regulatorias de los genes. Cuando el receptor se asocia con corepresores estos reprimen la transcripción mediante la actividad histona deacetilasa del complejo. Esta actividad mantiene firme la unión entre las histonas deacetiladas y la cromatina resultando en la represión de la transcripción. Tomado y modificado de Monje (2009).

Desde el descubrimiento del coactivador 1 de receptores esteroides (SRC1, del inglés: *Steroid Receptor Coactivator 1*) hace dos décadas (Onate y col., 1995), más de 400 coreguladores han sido identificados ([www.NURSA.org](http://www.NURSA.org)). Además del SRC1, otros miembros de la familia SRC como el SRC2 y SRC3 han sido ampliamente implicados en la regulación de la acción de los receptores de hormonas esteroides. La expresión aberrante de SRC en diferentes tumores

malignos y enfermedades genéticas los ha distinguido como reguladores claves en diversas patologías humanas (Dasgupta y col., 2014; York y O'Malley 2010). La interacción de los SRC con el RE o el RP es promovida por agonistas e inhibida por antagonistas. La capacidad de los diferentes ligandos del RE (y, en general, de los RN) para actuar como agonistas o antagonistas, depende en gran medida de su habilidad para inducir cambios conformacionales en el dominio de unión a ligando y modular adecuadamente el reclutamiento de coreguladores.

La existencia de corepresores que moderen la actividad agonista provee un mecanismo adicional en el ajuste de la expresión de genes diana, atenuando el producto fisiológico en situaciones donde hay niveles crónicamente elevados de hormona (Hall y McDonnell 2005). En general, los receptores de esteroides tales como el RE, RP, receptor de andrógeno y receptor de glucocorticoides interactúan con los corepresores en presencia de sus antagonistas respectivos. La mayoría de los corepresores pueden controlar la actividad de los receptores por más de un mecanismo y es posible que la sinergia entre diferentes mecanismos cooperen en la inhibición de la actividad transcripcional (Dobrzycka y col., 2003).

#### **2.4.2. Mecanismos de regulación del RE $\alpha$**

Además de los mecanismos descritos para las acciones de los RN en general, el RE $\alpha$  contiene múltiples promotores transcripcionales ubicados corriente arriba del primer exón codificante (+1) que controlan su expresión en forma compleja y aún no dilucidada en su totalidad (Ishii y col., 2010; Kos y col., 2001). Estudios comparativos entre las secuencias de ADNc del RE $\alpha$  humano con el de gallina, el de rata y el de ratón demostraron que existe un alto grado de conservación en las secuencias codificantes del RE $\alpha$  de estas especies, pero que no ocurre lo mismo con sus extremos 5'. En la rata se han descrito 5 promotores para el RE $\alpha$ , asociados a exones no codificantes: OS, ON, O, OT y E1 (figura 13) que se expresan de manera tejido-específica (Kato y col., 1998). El splicing alternativo entre el exón codificante líder y el exón no codificante (transcripto a partir de los diferentes promotores) resulta en múltiples variantes de ARNm con

distintas regiones 5' no traducibles (5'UTR, del inglés: *5' Untranslated Region*) que codifican para la misma proteína (Ishii y col., 2010).

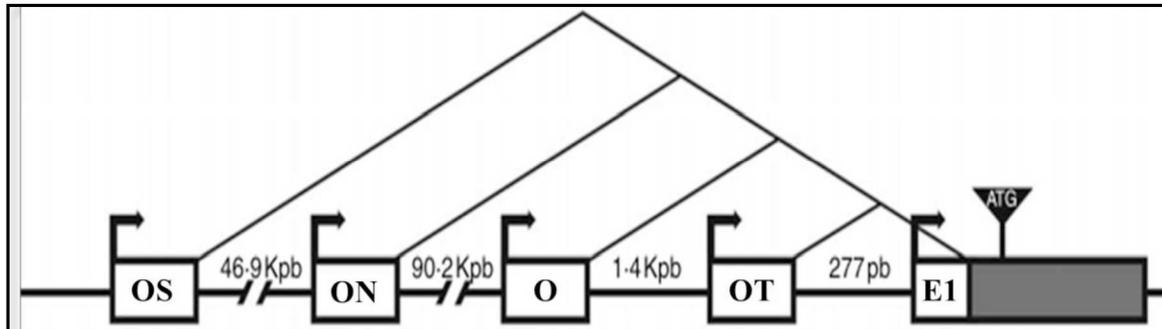


Figura 13: Representación esquemática de la región promotora del gen del RE $\alpha$ . Los recuadros blancos muestran la posición relativa de los exones 5' no traducibles RE $\alpha$ -OS, -ON, -O, -OT y -E1. El recuadro gris indica la región codificante. Tomado y modificado de Monje y col., (2007).

Las variantes 5'UTR del RE $\alpha$  tienen en general una actividad transcripcional baja, permitiendo solo un nivel basal de expresión en la célula. Esta regulación puede deberse a que, como se mencionó, diferentes tejidos utilizan mayoritariamente distintos promotores y además, los transcritos producidos a partir de los distintos promotores pueden someterse a splicing alternativo resultando en secuencias que codifican distintas isoformas de la proteína (Kos y col., 2001). Además, trabajos recientes han demostrado que estos promotores son capaces de ser diferencialmente regulados en situaciones fisiológicas particulares o mediante la acción de compuestos con actividad estrogénica (Ishii y col., 2010; Monje y col., 2007; Varayoud y col., 2005), aumentando la capacidad de regulación de la transcripción del RE $\alpha$ . Otra característica interesante del gen del RE $\alpha$  es su tamaño. Las grandes distancias que existen entre los promotores podrían ser necesarias para permitir modificaciones epigenéticas en secuencias regulatorias, que es otro importante mecanismo de regulación de la expresión del RE $\alpha$  (Kos y col., 2001). En este sentido, varios estudios han demostrado que ciertas regiones regulatorias del gen del RE $\alpha$  son susceptibles de sufrir modificaciones epigenéticas bajo condiciones particulares como ser la exposición a compuestos con actividad hormonal (Doshi y col., 2011; Monje y col., 2007). Se

ha observado por ejemplo que durante el desarrollo postnatal temprano, pequeñas diferencias en la concentración plasmática de Eg afectan de manera tejido-específica la expresión de RE $\alpha$  a través de distintos patrones de metilación de ADN en regiones regulatorias del gen (Furst y col., 2012).

## **2.5. Modificaciones epigenéticas**

El **epigenoma** es particularmente vulnerable a desregulación durante la embriogénesis debido a que los patrones de metilación o modificación de histonas necesarios para el normal desarrollo de los tejidos, se programan durante el desarrollo temprano (Bernal y Jirtle 2010; Doshi y col., 2011).

Una modificación epigenética de la cromatina involucra cambios heredables en la expresión génica, sin cambios en la secuencia de ADN. Entre las modificaciones epigenéticas conocidas podemos resaltar la acetilación de histonas, la metilación de histonas y la metilación del ADN (Bernal y Jirtle 2010). En el caso de la acetilación de histonas, los extremos N-terminales de cada histona sobresalen desde los nucleosomas permitiendo que la enzima histona acetiltransferasa adhiera covalentemente un grupo acetilo (cargado negativamente), generando repulsión de los fosfatos del ADN. En este estado, la acetilación permite al ADN separarse de los nucleosomas y ser accesible para la maquinaria transcripcional. Por el contrario, la eliminación de un grupo acetilo por una Hdac produce el efecto contrario, inhibiendo la transcripción (de Ruijter y col., 2003). Tres clases diferentes de Hdac, que se clasifican de acuerdo con la secuencia y la similitud funcional en homólogos de levadura, se han descrito hasta el momento (de Ruijter y col., 2003). Dentro de las Hdacs de clase I, las Hdac-1, -2 y -3 juegan un importante rol en la regulación de la expresión génica mediada por hormonas esteroideas, ya que interactúan con proteínas que son reclutadas por los receptores hormonales (Guenther y col., 2002; Liu y Bagchi 2004). La importancia de las Hdacs en la diferenciación endometrial ha sido demostrada por los efectos de inhibidores sobre los distintos compartimientos del útero. Estudios en ratones demostraron que los inhibidores de Hdacs como tricostatina A y butirato de sodio aumentaron la proliferación inducida por E2 y la

incidencia de glándulas uterinas anormales e hiperplasia endometrial atípica, asociado con cambios en la expresión de RE $\alpha$  y RP (Gunin y col., 2005).

Además de las modificaciones en las histonas, la metilación del ADN posee un profundo impacto epigenético. Este proceso actúa como una marca epigenética estable y heredable que es crítica para procesos celulares normales, incluyendo la regulación tisular, la expresión génica durante el desarrollo y la reparación del ADN. Al igual que como se mencionó para las Hdacs, los factores ambientales incluyendo las hormonas, tienen la capacidad de alterar los patrones de metilación, especialmente en momentos de desarrollo. La unión covalente de un grupo metilo a un residuo de citosina en dinucleótidos CpG (denominado sitio CpG) es realizada por la enzima ADN metiltransferasa (Dnmt, del inglés: *DNA Methyltransferase*). Los sitios CpG están comúnmente metilados a través de todo el genoma. Sin embargo, normalmente no están metilados en las llamadas islas CpG, las cuales son regiones que contienen grandes cantidades de CpG (>60%) en la región regulatoria 5', o promotora de un gen (Illingworth y col., 2008). Pequeños cambios en los niveles de metilación en determinados sitios CpG del promotor de un gen pueden tener un efecto significativo sobre la expresión génica. La metilación de los residuos de citosina es permanente, irreversible, y resultará en la represión transcripcional. El proceso de metilación del ADN impacta en la expresión génica y la estructura de la cromatina de varias maneras. Principalmente, las citosinas metiladas pueden ser usadas como sitios de acoplamiento para proteínas de unión a metilos las cuales luego reclutan complejos remodeladores de la cromatina que contienen enzimas Hdacs, resultando en el condensamiento de la estructura de la cromatina.

### **3. Perturbadores endocrinos**

La diferenciación perinatal del tracto genital de los mamíferos ocurre siguiendo una compleja serie de interacciones entre los receptores hormonales clásicos y las moléculas de señalización que en última instancia programan a las

células diana para responder apropiadamente al medio hormonal a lo largo de la vida. El organismo en desarrollo es sensible a las perturbaciones por químicos con actividad endocrina, los cuales pueden resultar en una respuesta hormonal anormal afectándose varios procesos fisiológicos.

En las últimas décadas se ha alcanzado un amplio consenso en relación a los efectos adversos que resultan de la exposición a químicos que poseen actividad hormonal y pueden interferir con el funcionamiento del sistema endocrino. Se ha sugerido como hipótesis que determinados efectos adversos sobre la salud humana y de poblaciones animales, como el incremento de algunos tipos de cánceres dependientes de hormonas, malformaciones y disfunciones reproductivas como infertilidad, problemas en el embarazo, abortos espontáneos, algunas formas de neurotoxicidad o el fracaso de la respuesta inmune, podrían deberse a la exposición a este tipo de sustancias llamadas **perturbadores endocrinos** (PE). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA- del inglés: *Environmental Protection Agency*) define a los PE como: “agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión a receptores, acción o degradación de las hormonas endógenas responsables de mantener la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o conducta” ([www.epa.gov](http://www.epa.gov)). Más recientemente, en 2012, la *Endocrine Society* definió a los PE como químicos exógenos o mezclas de químicos que interfieren con cualquier aspecto de la acción hormonal (Zoeller y col., 2012). Aunque estos compuestos no poseen una estructura química similar a la de las hormonas esteroides naturales (figura 14), muchos de ellos han demostrado tener actividad estrogénica, denominándose **xenoestrógenos** (National Research Council 1999).

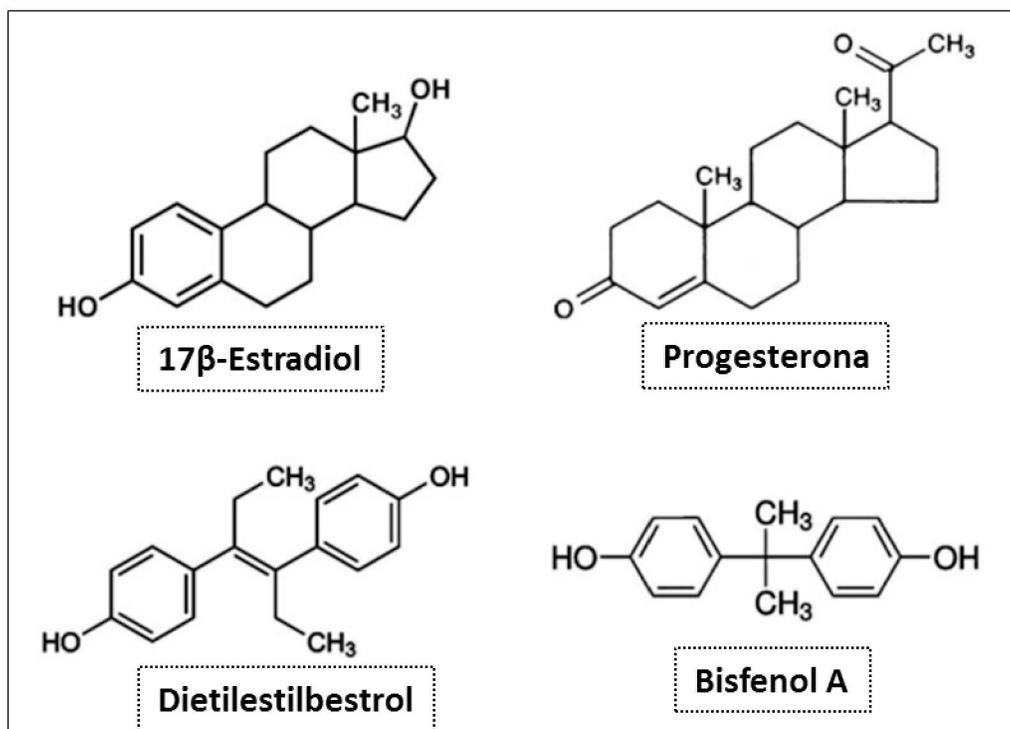


Figura 14: Estructura molecular de algunas hormonas esteroides y xenoestrógenos. Se pueden observar comparativamente las estructuras de las hormonas 17β-estradiol y progesterona, y de dos perturbadores endocrinos: el dietilestilbestrol y el bisfenol A. Tomado y modificado de Monje (2009).

Los xenoestrógenos se unen a los RE con diferentes afinidades y alteran su capacidad de activar la transcripción de genes dependientes de Eg (Delfosse y col., 2014; Delfosse y col., 2012). La expresión anormal de genes sensibles puede dar lugar a una desregulación permanente en las vías de señalización hormonal, con consecuencias adversas para la salud.

### 3.1. Bisfenol A

El Bisfenol A (BPA, di-(p-hidroxifenil) dimetilmetano) es un xenoestrógeno que está recibiendo marcada atención debido a su alto potencial para causar efectos adversos sobre la salud humana y de los animales. El BPA fue sintetizado por primera vez en 1891, aunque su uso no fue muy difundido hasta que se descubrió su capacidad de polimerización para generar policarbonatos plásticos. El enlace éster que une a los monómeros de BPA entre sí para formar el polímero

no es estable y en consecuencia, el polímero se debilita con el tiempo, liberando BPA al material con el que se encuentra en contacto. Además, el calentamiento a altas temperaturas (con fines de esterilización o de cocción en hornos de microondas) o la exposición a pH extremos, acelera la hidrólisis del enlace éster.

En la actualidad el BPA se encuentra ampliamente utilizado en la producción de productos de policarbonato, resinas epoxi y otros plásticos que incluyen polisulfonas, alquilfenoles, poliéster-estirenos y ciertas resinas de estireno. Además de la industria del plástico, el BPA se ha utilizado en la formulación de pesticidas (fungicidas), antioxidantes, gomas y estabilizantes (cloruros de polivinilos) (Takahashi y Oishi 2000; vom Saal y Hughes 2005). Su amplio uso crea una fuente de exposición incalculable debido a que también se encuentra presente en selladores dentales, recubriendo el interior de latas de conserva, recipientes plásticos para alimentos y bebidas, mamaderas y utensilios para usos en horno microondas. Otras exposiciones resultan del uso del BPA en láminas films, tuberías reforzadas, esmaltes y barnices, adhesivos, dentaduras artificiales, discos compactos y aislantes eléctricos (Takahashi y Oishi 2000). Las estimaciones actuales indican que más de ocho mil millones de libras de BPA son producidas anualmente y que aproximadamente 100 toneladas son liberadas a la atmósfera cada año (Rubin 2011; Vandenberg y col., 2012).

Una evidencia consistente de la exposición a BPA se demostró en un estudio realizado sobre muestras de orina de 394 personas de Estados Unidos analizadas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Atlanta, EE.UU.), donde el 93% de ellas poseían niveles detectables de BPA, sugiriendo una continua exposición humana a BPA, proveniente de múltiples vías (Calafat y col., 2008). Actualmente se asume que la vía más común de exposición a BPA en la población es a través de la dieta (Christensen y col., 2012; Rudel y col., 2011). Las dosis ingeridas estimadas de BPA por vía oral en humanos llegan a los  $\mu\text{g}/\text{día}$  (tabla 1). Concentraciones detectables de BPA también se han encontrado en el tejido placentario, líquido amniótico (Engel y col., 2006; Takahashi y Oishi 2000), y en leche materna (Ye y col., 2006), lo que sugiere que la exposición puede ocurrir tan pronto como durante el período de la periconcepción y lactancia.

Tabla 1: Niveles de BPA reportados en humanos.

Fuente de BPA	Dosis ingerida (vía oral)	Reportado por
Latas de conserva	3,8 µg/día	Miyamoto y Kotake (2006)
Envases plásticos	0,14 µg/día	Li y col., (2010)
Selladores dentales	3,98 ng/ml en saliva recolectada 3 h después de la aplicación de selladores dentales	Zimmerman-Downs y col., (2010)

En los años ochenta, la EPA concluyó que la mínima dosis de BPA con la cual se observaban efectos adversos (denominada “dosis LOAEL”, del inglés: *Lowest Observed Adverse Effect Level*) correspondía a 50 mg/kg de peso corporal/día (Environmental Protection Agency 1988). Según estos datos y diversos análisis realizados por la EPA y la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA, del inglés: *Food and Drug Administration*), la dosis LOAEL establecida se dividió por un factor de 1000 para proporcionar un margen de seguridad para los límites de exposición diarios permitidos. Así, se estableció como dosis de referencia o valor de exposición “**segura**” a BPA, a una dosis de 50 µg/kg de peso corporal/día (µg/kg/día) (Environmental Protection Agency 1988), es decir, 1000 veces menor que la LOAEL. Esta dosis de referencia continúa siendo el estándar de seguridad actual para exposiciones diarias a BPA (Rubin 2011).

Actualmente, numerosos estudios alertan sobre una amplia variedad de efectos adversos con exposición a dosis menores a las establecidas por la EPA como “dosis segura” (Peretz y col., 2014; Richter y col., 2007; Tyl 2014; Vandenberg y col., 2013; Varayoud y col., 2014). En estudios experimentales en roedores, se ha demostrado que el BPA afecta diversos índices reproductivos, tales como el peso de ovarios, útero y vagina, la tasa de fertilización, la distancia anogenital, el inicio de la pubertad (Cabaton y col., 2011; Fernandez y col., 2009; Nah y col., 2011), la esteroidogénesis en el ovario y la calidad de los ovocitos (Li y col., 2014; Peretz y col., 2014), alteraciones del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal y ciclos estrales irregulares (Fernandez y col., 2009; Nah y col., 2011; Rodriguez y

col., 2010). Además, en nuestro laboratorio, hemos observado una asociación entre la exposición a bajas dosis de BPA durante el desarrollo y alteraciones en las glándulas prostática y mamaria, el cerebro y el útero de roedores (Altamirano y col., 2015; Bosquiazzo y col., 2010; Durando y col., 2007; Kass y col., 2012; Monje y col., 2009; Muñoz-de-Toro y col., 2005; Ramos y col., 2007; Ramos y col., 2001; Rodríguez y col., 2010; Varayoud y col., 2008; Varayoud y col., 2014), efectos de reversión sexual en una especie de la fauna como el *Caiman latirostris* (Stoker y col., 2008; Stoker y col., 2003) y alteraciones en el desarrollo folicular y la esteroidogénesis en especies de interés zootécnico (Rivera y col., 2011; Rivera y col., 2015). En la figura 15 se muestran alteraciones en algunos tejidos de animales expuestos a BPA, reportadas por nuestro grupo de trabajo.

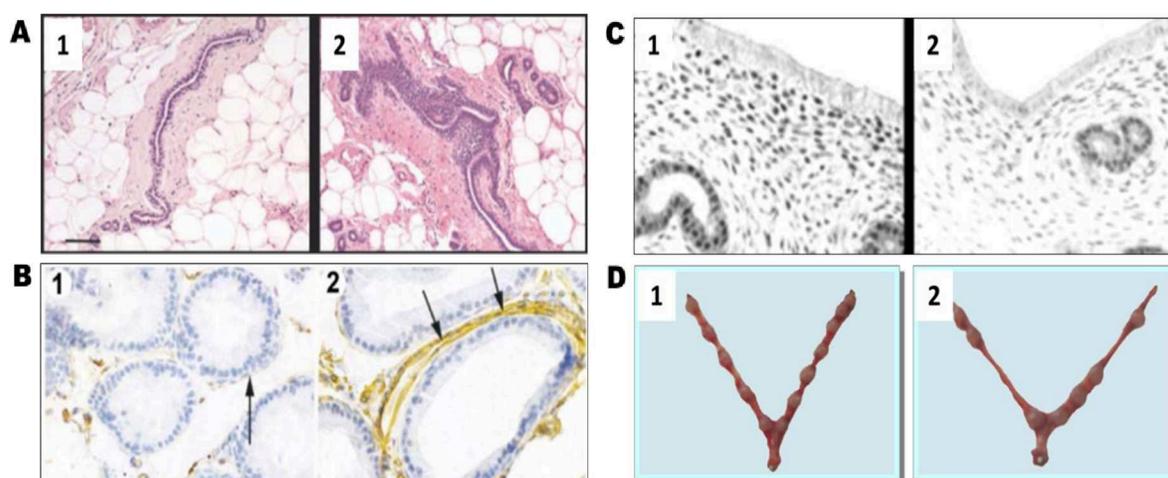


Figura 15: Efectos de la exposición temprana a BPA sobre la histoarquitectura y funcionalidad de distintos tejidos. A) Glándula mamaria de animales control (1) y expuestos a BPA (2). La exposición a BPA estuvo asociada con aumento de lesiones epiteliales pre-neoplásicas (hiperplasias ductales) y alteraciones en el estroma adyacente de la glándula mamaria. B) Próstata ventral de ratas control (1) y expuestas a BPA (2) presentando cambios en el fenotipo del estroma periductal de la próstata ventral con aumento de la expresión de vimentina alrededor del ducto (2, flechas). C) Estroma uterino de ratas adultas control (1) y expuestas a BPA (2). Se observa una disminución en la expresión de RE $\alpha$  en el estroma uterino de ratas expuestas a BPA. D) Cuernos uterinos de ratas control (1) y expuestas a BPA (2), en el día 9 de gestación. La exposición a BPA produjo una disminución del n° de sitios de implantación. Tomado y modificado de A) Durando y col., (2007), B) Ramos y col., (2001), C) Bosquiazzo y col., (2010), D) Varayoud y col., (2011).

Particularmente en el útero, diversos estudios utilizando modelos de exposición temprana a BPA han demostrado alteraciones histomorfológicas y en la

expresión de genes involucrados en el desarrollo y la diferenciación funcional uterina en roedores en diferentes etapas de la vida adulta (Suvorov y Waxman 2015). Newbold y col., (2009) demostraron alteraciones pre-neoplásicas como hiperplasia endometrial atípica y pólipos en el útero de ratones hembra adultas tratadas prenatalmente con BPA. En otros modelos de exposición temprana a BPA se observaron cambios morfológicos y en la expresión de RE $\alpha$  y RE $\beta$  en los compartimientos epitelial y estromal del útero de ratones (Markey y col., 2005; Schonfelder y col., 2004), y subfertilidad evidenciada por un menor número de sitios de implantación en ratas preñadas (Varayoud y col., 2014).

Aunque el mecanismo por el cual el BPA es capaz de inducir anormalidades en los tejidos sensibles a Eg es desconocida, actualmente está cobrando gran importancia la hipótesis de que el BPA podría estar interfiriendo con la regulación epigenética normal durante el desarrollo perinatal. Durante el desarrollo prenatal y postnatal temprano los órganos Eg-sensibles son particularmente susceptibles o vulnerables a la acción de Eg y/o andrógenos exógenos (o químicos con actividad hormonal), los cuales podrían provocar alteraciones epigenéticas que afecten la transcripción o la regulación de genes específicos con consecuencias adversas a lo largo de la vida (Cruz y col., 2014; Vaiserman 2014). Varios estudios en roedores han demostrado que el BPA puede actuar a través de diferentes mecanismos epigenéticos en varios órganos, incluyendo el útero (Bromer y col., 2010; Doherty y col., 2010; Doshi y col., 2011; Kundakovic y Champagne 2011). Los efectos de la exposición temprana a BPA podrían ponerse de manifiesto durante la adultez cuando los órganos hormono-dependientes son expuestos a situaciones endocrinas endógenas o exógenas particulares como la gestación o el tratamiento con hormonas. Conforme a esta hipótesis, recientemente hemos demostrado que ratas hembras recién nacidas expuestas a BPA, presentaron una respuesta uterina alterada frente a un tratamiento con hormonas ováricas en la adultez (Bosquiazzo y col., 2010; Varayoud y col., 2008). En estos animales demostramos cambios en la expresión de RE $\alpha$  y RP en el útero así como una menor proliferación de las células endoteliales y del estroma subepitelial del endometrio, asociada con una disminución de la expresión de sus mediadores

moleculares (factor de crecimiento del endotelio vascular -VEGF- y Hoxa10, respectivamente).

Teniendo en cuenta todos los antecedentes mencionados, estudiar los efectos de la exposición a BPA durante periodos críticos de la organogénesis y la diferenciación uterina, en distintas condiciones controladas por hormonas (i.e.: edad reproductiva, tratamiento exógeno con hormonas), aportaría evidencias sobre posibles mecanismos o desregulaciones responsables de alteraciones en el microambiente tisular que podrían favorecer el desarrollo de alteraciones pre-neoplásicas en el útero. Debido a que el avance científico y biotecnológico ha llevado a la utilización (y por lo tanto exposición) cada vez mayor de sustancias con actividad de PE con preocupantes consecuencias sobre los órganos reproductivos, creemos que los resultados a obtener ayudarán al desarrollo de políticas de prevención que eviten los efectos adversos sobre la salud.

#### ***4. Hipótesis de trabajo***

Nuestra hipótesis propone que la exposición a BPA durante periodos críticos de la organogénesis y diferenciación uterina modifica el microambiente tisular alterando la expresión de genes claves en el desarrollo y la posterior funcionalidad uterina en la adultez.

## **II- OBJETIVOS**

*"Nadie más que uno puede liberar su mente de la esclavitud..."*

*Bob Marley*

---

## **1. Objetivo General**

En el presente trabajo de tesis doctoral nos propusimos como objetivo general, estudiar los efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la diferenciación funcional uterina en ratas adultas en distintas edades reproductivas y en un modelo de rata ovariectomizada tratada con Eg. Además nos propusimos optimizar una metodología de cultivos en 3 dimensiones (3D) de células epiteliales endometriales, como herramienta para estudiar los efectos de la exposición *in vitro* a BPA.

### **1.1. Objetivos Particulares**

1. Estudiar los efectos de la exposición perinatal a BPA en distintas edades reproductivas:
  - a) en ratas adultas jóvenes (DPN90), evaluar la histomorfología uterina, la dinámica celular (proliferación y apoptosis) en los diferentes compartimientos del útero, y la expresión de marcadores de diferenciación estromal.
  - b) en ratas adultas (DPN360), realizar un exhaustivo análisis histomorfológico del útero y evaluar marcadores de diferenciación epitelial y estromal.
  
2. Evaluar los efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la respuesta del útero de ratas adultas frente a un tratamiento prolongado con E2:
  - a) estudiar las características histomorfológicas del útero y la expresión de moléculas involucradas en la respuesta epitelial uterina al E2 y en la diferenciación funcional de las glándulas uterinas (i.e.: RP, Wnt7a, Wnt5a,  $\beta$ -catenina).
  - b) estudiar la expresión de moléculas implicadas en la diferenciación funcional uterina y en las comunicaciones estroma-epitelio en respuesta a E2 (i.e.: receptores hormonales, coreguladores, IGF-I).
  - c) evaluar la expresión de enzimas involucradas en mecanismos de regulación epigenética (metilación de ADN, metilación/acetilación de histonas).

**3.** Desarrollar una metodología de cultivos en 3D de células epiteliales endometriales, para diseñar experimentos de exposición *in vitro* a bajas dosis de BPA. Estos experimentos permitirán investigar los mecanismos de acción del BPA sobre estructuras epiteliales glandulares formadas en 3D.

### **III- MATERIALES Y MÉTODOS**

*"El talento es el hombre en libertad, nace en cualquier persona que se sienta capaz de volar con sus ideas..."*

*Luis A. Spinetta*

---

## **1. Animales**

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar pertenecientes al bioterio del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL, CONICET-UNL), de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB). Los animales fueron mantenidos durante todo el experimento bajo condiciones reguladas de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y con fotoperíodo de 14 h de luz (desde las 05.00 h hasta las 19.00 h) y 10 h de oscuridad. La concentración de fitoestrógenos en la dieta no se evaluó; sin embargo, debido a que la ingesta de alimentos de las ratas control y las tratadas con BPA fue equivalente, asumimos que todos los animales fueron expuestos a los mismos niveles de fitoestrógenos (para mayor información sobre la composición del alimento ver Kass y col., (2012). Para reducir al mínimo la exposición a otros productos químicos con actividad estrogénica, las ratas fueron alojadas en jaulas de acero inoxidable con “cama” de viruta de madera de pino estéril (Instituto de Ciencias Veterinarias -ICIVET-, CONICET-UNL). Los animales tuvieron libre acceso al agua en botellas de vidrio con tapones de goma y al alimento balanceado en forma de pellets (Alimentos Cooperación, Rafaela, Santa Fe). Todos los animales utilizados fueron manipulados de acuerdo a la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio editada por la Academia Nacional de Ciencias (USA). Los experimentos llevados a cabo durante la ejecución de esta tesis fueron aprobados por el Comité de Ética de la FBCB, UNL.

### **1.1. Diseño experimental**

Ratas hembra fueron tratadas perinatalmente (gestación + lactancia) con BPA a través del agua de bebida, desde el día de gestación (DG) 9 hasta el día postnatal 21 (DPN21), que corresponde al destete de las crías. La vía oral fue escogida para la exposición a BPA debido a que es la vía más relevante de exposición en la población en general (Christensen y col., 2012; Rudel y col., 2011). Para la obtención de ratas preñadas, se alojó a la hembra en la jaula con un macho de fertilidad comprobada y se observó su comportamiento. Si la hembra presentaba conducta receptiva, evidenciada por el reflejo de lordosis, se la dejaba

toda la noche con el macho. A la mañana siguiente se procedía a hacer extendidos vaginales y la presencia de espermatozoides confirmaba la preñez del animal. Ese día se consideró como el DG1. En nuestra colonia la gestación tiene una duración de 23 días y el horario aproximado de parto es entre las 12 y 14 h. En el DG9, que corresponde al inicio de la organogénesis fetal, las ratas preñadas fueron pesadas y divididas aleatoriamente en 3 grupos experimentales de 10-14 madres por grupo: **Control**, con etanol al 0,001%; y **BPA** (99% pureza, Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) en dos dosis diferentes que se calcularon en base al peso promedio de las hembras y al consumo de agua durante la preñez y la lactancia.

En el presente trabajo de tesis nos propusimos exponer a los animales a la dosis segura de BPA establecida por la EPA, de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Environmental Protection Agency 1988). Teniendo en cuenta que el promedio del peso de nuestros animales es de 250 g aproximadamente, y el consumo de agua diario es de 50 ml/día, se preparó una solución de BPA de **250  $\mu\text{g}/\text{l}$** , de manera tal que los animales estuvieran expuestos a una dosis equivalente a la dosis segura establecida por la EPA, y se preparó también otra solución de BPA de **2,5  $\mu\text{g}/\text{l}$**  (100 veces menor a la dosis segura). Durante el tratamiento se midió dos veces por semana el consumo de agua por cada animal para posteriormente poder calcular la dosis promedio que efectivamente recibieron los animales. Después del parto, las crías se pesaron y se sexaron de acuerdo con la distancia anogenital; camadas de ocho crías (preferentemente cuatro machos y cuatro hembras) se dejaron con las madres durante el periodo de lactancia. En las crías hembra se determinó el inicio de la pubertad examinando diariamente el momento de la apertura vaginal (Ojeda y Urbanski 1994). Después de los 2 meses de edad, se evaluaron las características del ciclo estral mediante la realización diaria de extendidos vaginales (Montes y Luque 1988). Se seleccionaron para el trabajo experimental los animales que presentaron ciclos estrales regulares de 4 o 5 días.

Las hembras de todos los grupos (control y tratadas con BPA) se dividieron aleatoriamente en 2 experimentos principales (figura 16). Solo una cría de cada

camada se incluyó en cada punto evaluado. Las hembras restantes y todos los machos de cada camada fueron asignados a otros experimentos.

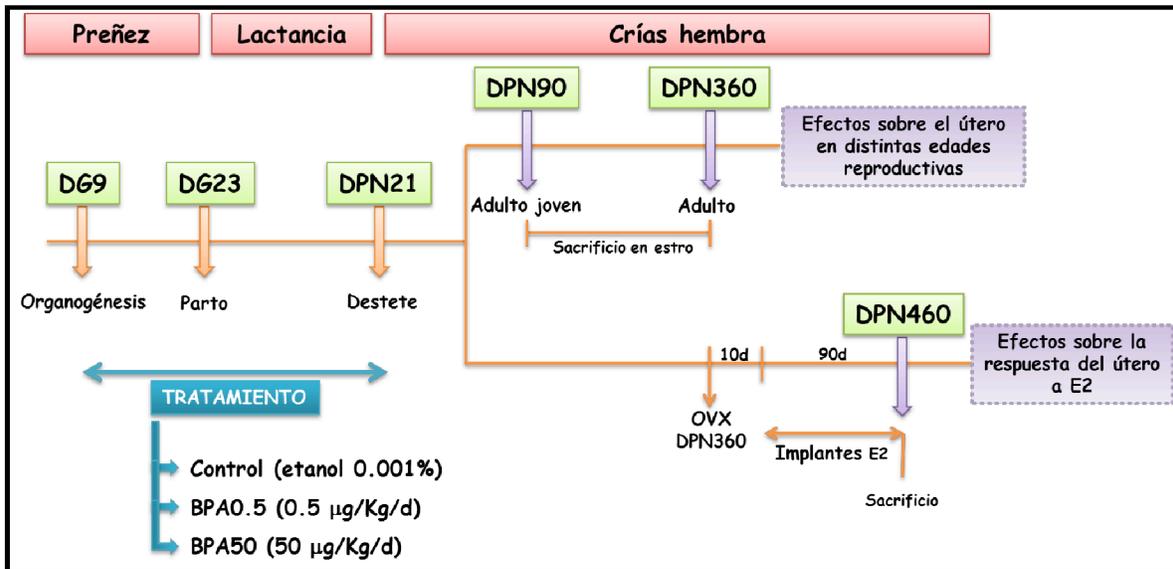


Figura 16: Diseño experimental principal. Protocolo utilizado para estudiar los efectos de la exposición perinatal (gestación + lactancia) a bisfenol A (BPA) sobre el útero de ratas en diferentes etapas reproductivas: jóvenes (DPN90) y adultas (DPN360); y la respuesta del útero a un tratamiento con 17β-estradiol (E2) en la adultez (DPN460). DG: días de gestación, DPN: día postnatal; OVX: ovariectomía.

Los 2 experimentos que se describen en la figura 16 fueron diseñados teniendo en cuenta los siguientes propósitos:

**A) Evaluar los efectos a largo plazo de la exposición perinatal a BPA en el útero de ratas en diferentes etapas reproductivas**, para lo cual, un grupo de ratas (n= 10-14 ratas/grupo experimental) fueron sacrificadas en estro a los 3 meses de edad (DPN90, adultas jóvenes) y otro grupo de animales (n= 10-14 ratas/grupo experimental) a los 12 meses de edad (DPN360, adultas). La identificación del estro se realizó mediante extendidos vaginales y evaluación de la conducta receptiva al macho (lordosis) en la tarde del proestro.

**B) Investigar si la exposición perinatal a BPA modifica la respuesta a un tratamiento crónico con E2 en la adultez**, para lo cual un grupo de ratas (n= 9-14 ratas/grupo experimental) fueron ovariectomizadas (OVX) en el DPN360 con el objetivo de disminuir al máximo los niveles de Eg endógenos. Diez días después

de la OVX los animales fueron tratados con E2 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) durante 3 meses. El tratamiento se realizó por vía subcutánea (sc) utilizando implantes de silastic (diámetro exterior: 3,18 mm, diámetro interior: 1,57 mm, 30 mm de longitud; Specialty Manufacturing, Midland, MI, USA) cargados con E2 (1 mg/ml) disuelto en aceite de maíz (Bottner y Wuttke 2005). Para su armado, los implantes fueron primero sellados con silicona en un extremo, luego se llenaron con la solución de E2 y posteriormente se selló el extremo restante. Se dejaron secar, se lavaron dos veces durante 15 min con alcohol 96° y se conservaron a temperatura ambiente hasta el momento de su colocación. 24 h previas a su colocación en el animal, los implantes se sumergieron en una solución de fosfato 0,05 M, pH 7,5 (PBS, del inglés: *Phosphate Buffer Solution*) a 37°C, con el objetivo de llegar a un equilibrio en la tasa de liberación de la hormona previo a la colocación en el animal de experimentación. Para asegurarnos una exposición constante a E2, los implantes fueron cambiados cada 30 días. Los animales se sacrificaron a los 90 días de comenzado el tratamiento (grupos Control+E2 y BPA+E2).

Todos los animales recibieron 2 h antes del sacrificio una inyección intraperitoneal de bromodeoxyuridina (BrdU, 6 mg/100 g de peso corporal -Sigma) para posteriormente evaluar la proliferación celular.

## 1.2. Experimentos complementarios

Para evaluar si los efectos observados en el útero de las ratas adultas tratadas con E2 se debieron: al tratamiento con E2, a la edad de los animales, o a una combinación de ambas variables, se realizaron dos experimentos complementarios (figura 17):

**a)** Evaluamos el efecto del tratamiento con E2 en ratas jóvenes (descartando en este caso la variable de la edad). Para ello ratas jóvenes de DPN90 (n= 6), fueron OVX y tratadas con E2 durante 3 meses (tal como se describió en la sección anterior) y se sacrificaron al final del tratamiento (**DPN190-E2**).

b) Evaluamos la variable edad de los animales (descartando en este caso la variable del tratamiento con E2). Para ello utilizamos ratas hembras adultas (n= 5) sin tratamiento alguno, que fueron sacrificadas en estro en el **DPN460**.

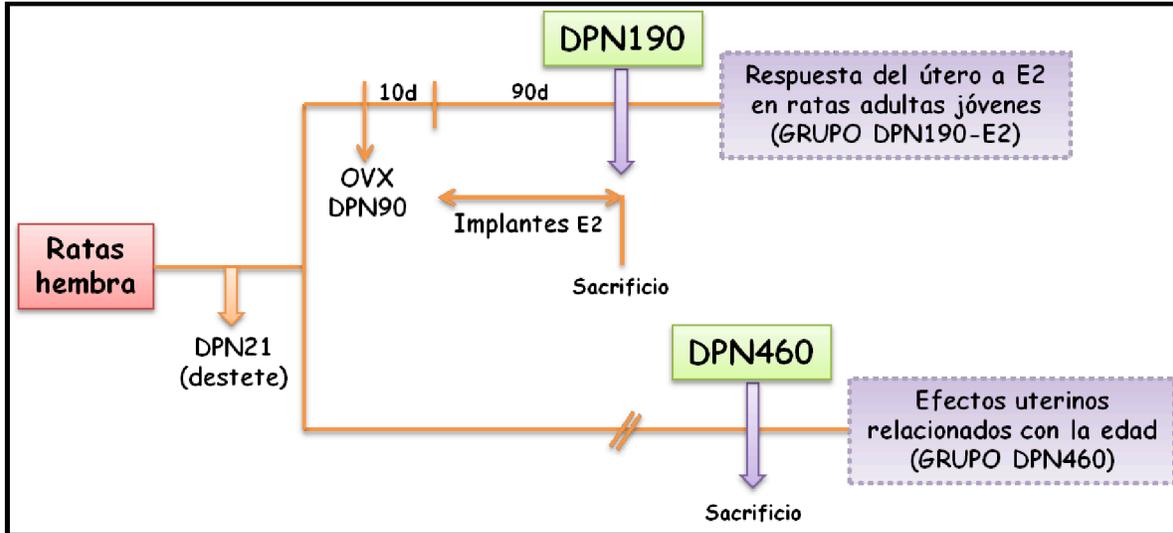


Figura 17: Diseño de experimentos complementarios. Protocolo utilizado en hembras no expuestas a Bisfenol A (BPA) para estudiar el tejido uterino en ratas jóvenes tratadas con  $17\beta$ -estradiol (E2) (DPN190-E2) vs. ratas adultas (DPN460) sin tratamiento con E2.

## 2. Cirugías y obtención de muestras

### 2.1. Ovariectomía bilateral

Antes de comenzar la cirugía se sumergió el instrumental en alcohol al 70% y se preparó el hilo de sutura. Se anestesió el animal con la mezcla de anestesia disociativa: ketamina (50 mg/ml, Holliday Scott, San Isidro, Buenos Aires, Argentina), Acepromacina maleato (ACEDAN. 10 mg/ml, Holliday Scott) y Xilazina (20 mg/ml, Koning LK, Avellaneda, Buenos Aires, Argentina) en una relación 50:5:1, y se lo colocó en la tabla de cirugía con el abdomen hacia abajo, sujetándolo por sus extremidades. Se desinfectó el campo de cirugía con alcohol al 70% y se procedió a practicar una incisión de 1,5 cm en la línea media de la piel dorsal. Se divulsionó el tejido subcutáneo para separar la piel del tejido muscular subyacente. Para ingresar a la cavidad abdominal se debe atravesar la pared

muscular y el peritoneo, para lo cual se realizaron dos incisiones, una a la izquierda y otra a la derecha, a una distancia de 0,5 cm de la columna vertebral y a 0,5 cm de la última costilla. Con pinza anatómica de punta roma se localizaron los órganos genitales internos, manipulando con pinzas la grasa circundante para evitar lesionar los órganos. Una vez localizado el ovario se lo expuso tomándolo por la grasa circundante, para evitar cualquier tipo de presión. Se ligó el hilio ovárico a nivel de la unión útero-tubárica asegurando la obstrucción completa de la arteria principal ovárica y se seccionó por arriba de la ligadura, extrayendo el ovario y oviducto. Se introdujo el resto del material expuesto en la cavidad abdominal y se procedió a suturar el peritoneo junto con el tejido muscular con sutura continua. Por último, se suturó la piel con puntos discontinuos. La hembra operada se dejó en jaula individual para su recuperación.

## **2.2. Colocación de implantes**

Para la colocación de cada implante, se anestesió al animal y se lo colocó sobre una tabla de disección exponiendo la parte dorsal. Se embebió con alcohol al 70% la zona donde se practicaría la incisión (región próxima a la unión de la cabeza con el tronco) y se realizó un corte en la piel (de 10 mm aproximadamente) en sentido vertical cráneo-caudal. Con tijera de punta roma, se divulsionó separando la piel del tejido muscular de forma tal de crear una cavidad para alojar el implante. Se colocó el implante y luego se procedió a suturar la herida con 1 ó 2 puntos discontinuos. Luego de 30 días, se realizó la misma maniobra quirúrgica para reemplazar el implante por uno nuevo. Se realizó un corte en la piel de la misma forma que como se explicó anteriormente, luego se extrajo cuidadosamente el implante del animal y se divulsionó hacia otra zona para crear una nueva cavidad donde se colocó el nuevo implante. Este procedimiento se realizó nuevamente a los 30 días.

## **2.3. Disección de cuernos uterinos**

Una vez concluido el experimento, los animales se anestesiaron en cámara de CO<sub>2</sub>, se sacrificaron por decapitación y se recogió la sangre para la posterior

obtención de suero. Luego se colocaron en la tabla de disección sujetándolos de sus extremidades, con el abdomen hacia arriba. Se procedió a levantar la piel con pinza de punta "diente de ratón" a unos 1,5 cm del orificio vaginal y con la tijera de punta roma se practicó una incisión en ángulo de 45° hacia los laterales hasta la altura de las últimas costillas, quedando expuestos los músculos abdominales en los que se practicó la misma maniobra quirúrgica. De esta manera quedó expuesta la cavidad abdominal. Con pinza anatómica de punta roma se separaron las asas intestinales y la grasa mesentérica hacia un lado, visualizando el tracto genital. Con tijera de punta fina se procedió a disecar ambos cuernos uterinos.

En este trabajo, uno de los cuernos fue destinado para su procesamiento histológico mientras que el otro rápidamente se congeló en nitrógeno líquido para estudios de biología molecular.

### ***3. Procesamiento de las muestras***

Las muestras obtenidas fueron procesadas de diferentes maneras de acuerdo a los siguientes propósitos:

**a)** para determinación de niveles séricos de E2 las muestras de sangre obtenidas al momento del sacrificio fueron recolectadas en tubos de vidrio y, luego de retraído el coágulo, fueron centrifugadas separándose el suero que se conservó a -50°C hasta su uso.

**b)** para estudios por microscopía óptica, los cuernos uterinos se fijaron en formol al 4% tamponado a pH 7,5 con una solución de PBS durante 6 h respetando la proporción recomendada de fijador/muestra (20:1) para mantener de forma definitiva las estructuras histológicas y citológicas del tejido. Luego se realizaron dos lavados con PBS de 10 min cada uno y se mantuvieron los tejidos en una solución de alcohol 70° a 4°C. Se procesaron por técnicas histológicas de rutina hasta su inclusión en parafina (Junqueira y Junqueira 1983). Durante el protocolo de procesado, las muestras son deshidratadas en alcoholes de graduación creciente, que luego es sustituido por xilol (un solvente no acuoso

miscible en parafina fundida). La inclusión en parafina consta de colocar la muestra dentro de un frasco que contiene parafina fundida en estufa a 60°C. El calor provoca la evaporación de los restos del solvente (xilol) y de esta forma, los espacios ocupados por éste son impregnados por la parafina. Luego se coloca la muestra en un recipiente con parafina fundida y se deja solidificar a temperatura ambiente. Esto permite obtener un bloque de parafina denominado “taco” con el tejido en su interior. Obtenido el taco, se realizan cortes histológicos seriados de 5 µm de espesor en micrótopo (Leica, Jung RM2025, Leica Instruments GMT, Nussioch, Alemania) que se montan en portaobjetos pretratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxysilano, Sigma) y se secan en estufa a 37°C durante 24 h. Estas muestras fueron utilizadas para estudios histológicos mediante la coloración con hematoxilina-eosina (H&E) e Inmunohistoquímica (IHQ) para la determinación de la expresión de diferentes proteínas.

c) Para extracción de ARN los cuernos uterinos fueron disecados en condiciones estériles, congelados rápidamente en N<sub>2</sub> líquido y conservados a -80°C hasta su posterior procesamiento.

## ***4. CAPÍTULO I: Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre el útero de ratas en diferentes etapas reproductivas***

### **4.1. Evaluación del tejido uterino en ratas de DPN90 (adultas jóvenes)**

Con el objetivo de evaluar parámetros relacionados con el desarrollo y funcionalidad del tejido uterino en ratas adultas jóvenes expuestas perinatalmente a BPA, se sacrificaron hembras de 3 meses en estro, se disecaron los cuernos uterinos (sección 2.3) y se procesaron para su análisis por microscopía óptica (sección 3). Se determinaron los siguientes parámetros:

- ✓ Proliferación y apoptosis en los distintos compartimientos uterinos
- ✓ Área periglandular ocupada por células vimentina-positivas
- ✓ Perímetro glandular ocupado por células α-SMA positivas

La determinación de estos parámetros se realizó por IHQ. La técnica de IHQ permite identificar *in situ* un antígeno celular mediante una reacción antígeno-anticuerpo, que se visualiza gracias a una molécula marcadora. Para la inmunomarcación se siguió un protocolo previamente publicado que utiliza el calentamiento de la muestra en horno microondas como método de recuperación antigénica, extravidina-biotina peroxidasa como sistema de revelado y Diaminobencidina (DAB) como cromógeno (Muñoz de Toro y col., 1998). El protocolo general empleado se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Protocolo general de la técnica de IHQ.

<b>Desparafinización e hidratación</b>	
Xilol 1, 2 y 3 Alcohol 100º, 96º, 70º PBS	Pasajes de 3 min c/u Pasajes de 3 min c/u 5 min
<b>Recuperación Antigénica</b>	
Calentamiento en Horno microondas utilizando Buffer Citrato 0,01 M, pH 6  PBS	Calentar el buffer 3 min a 100% de potencia, agregar las muestras y calentar 1 min a 100%, 14 min a 40%. Dejar 20 min apagado. 5 min
<b>Bloqueo de actividad de peroxidasa endógena</b>	
Agua oxigenada al 3% en metanol PBS	15 min 15 min
<b>Bloqueo de uniones no específicas</b>	
Suero normal de cabra 1/20 disuelto en PBS con 1,5% de leche en polvo descremada	30 min (en cámara húmeda)
<b>Anticuerpo Primario</b>	
Incubación con el anticuerpo específico  PBS	14-16 h (en cámara húmeda) a 4°C 15 min
<b>Sistema de Revelado</b>	
Anticuerpo secundario biotinilado PBS Extravidina-peroxidasa PBS Sustrato enzimático (5 µl de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 vol) + cromógeno (2,3 mg de DAB) disueltos en 3,3 ml de Tris-HCl 0,05 M pH 7,5). Agua destilada	30 min (en cámara húmeda) 5 min 30 min (en cámara húmeda) 5 min 10 min  5 min
<b>Contracoloración con hematoxilina de Mayer (opcional). Deshidratar y montar con medio de montaje permanente (Eukitt, Sigma, Aldrich)</b>	

**Controles negativos y positivos.** En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad sustituyendo el anticuerpo primario con un suero no inmune. Los controles positivos consistieron en tejidos cuya reacción positiva fue comprobada con anterioridad.

Los anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ y las condiciones de los reactivos se detallan en la tabla 3.

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ para evaluar Vimentina,  $\alpha$ -SMA y BrdU.

Anticuerpo primario utilizado	Dilución empleada	Anticuerpo secundario biotinilado	Extravidina - peroxidasa (Sigma, Aldrich)	Proveedor
<b>Anti-Vimentina (clon V9)</b>	1/50	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/150	Novocastra, (Newcastle upon Tyne, UK)
<b>Anti-<math>\alpha</math>-SMA (clon asm-1)</b>	1/100	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/150	Novocastra, UK
<b>Anti-BrdU (clon 85-2C8)</b>	1/100	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/100	Novocastra, U.K.

#### 4.1.1. Proliferación celular

La incorporación de nucleótidos modificados al ADN durante la división celular es una metodología muy utilizada para la determinación de células que están proliferando (Woosley 1991). La BrdU cumple con este requisito ya que es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo de división celular. Para poder evaluar la incorporación de BrdU, los animales recibieron 2 h antes del sacrificio una inyección de BrdU como se señaló en la sección 1.1.

Sobre cortes histológicos se aplicó la técnica de IHQ descrita en la tabla 2, incorporando al procedimiento un paso fundamental de hidrólisis ácida (utilizando HCl 2 N durante 30 min a 37°C) en el que se desnaturalizan las hebras de doble cadena del ADN del tejido, previo al bloqueo de uniones inespecíficas. Posteriormente, los cortes de tejido deben ser neutralizados por incubación durante 10 min en una solución 0,1 M de bórax (pH 8). Para esta determinación,

además de los controles habituales de la técnica, se debe realizar un control negativo adicional que consiste en efectuar la reacción en un corte histológico de un animal que no haya sido inyectado con BrdU antes del sacrificio.

Las muestras se contracoloraron con hematoxilina de Mayer y se montaron con medio de montaje permanente (Eukitt, Sigma). El índice de proliferación se evaluó en todos los compartimientos celulares del útero (epitelio luminal y glandular, estroma y miometrio) utilizando un microscopio Olympus BH2 con una objetiva de 100X.

En el epitelio luminal y glandular, la proliferación se determinó calculando el porcentaje de células que incorporaron BrdU, contando un total de 2000 células en cada compartimiento. En el estroma y miometrio la cuantificación se realizó utilizando una grilla cuadrada de 0,8 mm x 0,8 mm colocada en el ocular del microscopio. En estos compartimientos la proliferación se determinó calculando la densidad de volumen (en 20 campos representativos de cada compartimiento) aplicando la fórmula descrita por Weibel (1969):  $V_v = P_i/P$  donde  $V_v$  es la fracción de volumen estimada del objeto en estudio (por ejemplo el estroma),  $P_i$  es el número de puntos de la grilla incidentes sobre las células positivas (inmunomarcadas con BrdU), y  $P$  es el número de puntos incidentes sobre el total de células en la población estudiada (por ejemplo, el estroma). Los resultados fueron expresados como  $V_v \times 100$ .

#### **4.1.2. Detección *in situ* de la apoptosis celular**

Para evaluar la apoptosis, se analizaron secciones de 5  $\mu\text{m}$  de útero sobre las cuales se realizó la técnica de TUNEL (del inglés: *Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy Uridine triphosphate Nick End Labeling*) para la detección *in situ* de células con fragmentación del ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante (ApopTag Kit; Intergen Co, Purchase, Nueva York, EE.UU.) y publicaciones previas (Ramos y col., 2002). Las secciones de tejido se incubaron con una mezcla conteniendo desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) marcados con digoxigenina, dNTP no marcados, y la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT, del inglés: *Terminal deoxynucleotidyl transferase*). Durante la

incubación, la TdT incorpora a los fragmentos de ADN que se generan durante el proceso de apoptosis, los dNTP marcados. Posteriormente, las secciones se incubaron con antidigoxigenina-peroxidasa y una mezcla de sustrato-cromógeno (DAB; Sigma). Las muestras se contracoloraron y se montaron. Los controles negativos se realizaron utilizando exactamente los mismos procedimientos, excepto que se añadió agua destilada en lugar de TdT. Como control positivo, se procesó un corte histológico de próstata de rata en involución después del segundo día de castración (Ramos y col., 2002).

La cuantificación del número de células en apoptosis en cada compartimiento celular se realizó de la misma manera que como se describió en la sección anterior para evaluar la proliferación celular.

#### **4.1.3. Área periglandular ocupada por células vimentina-positivas**

La vimentina es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular. Su función principal es la de proveer un ancla para el soporte de los orgánulos intracelulares y mantener la integridad física de la célula. La expresión de vimentina fue empleada para determinar el inmunofenotipo de naturaleza fibroblástica en el estroma periglandular del útero, mediante ensayos de IHQ siguiendo el protocolo descrito en las tablas 2 y 3.

La expresión de vimentina se evaluó en el estroma periglandular, definido como el área de 10  $\mu\text{m}$  de ancho alrededor de las glándulas (desde la membrana basal hacia las capas externas). Los ensayos de IHQ no se contracoloraron para evitar interferencia en la cuantificación. La cuantificación se realizó mediante análisis digital de imágenes como se describe a continuación. Para la obtención de las imágenes se utilizó una cámara de video color Spot Insight V3.5 acoplada a un microscopio Olympus BH2 (iluminación: lámpara halógena de 12 voltios, 100W, equipado con una fuente de luz estable; Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japón), con una objetiva Dplan de 40X. Previa a la captura de imágenes el microscopio fue acondicionado para la iluminación Koehler. Correcciones de iluminación desigual (corrección de sombras) y la calibración espacial del sistema fue realizada con imágenes de las celdillas de una cámara de Neubauer. Las

imágenes obtenidas fueron evaluadas usando el software Image-Pro Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Se obtuvieron al menos 15 imágenes por sección y 2 secciones de tejido por animal. Luego, usando el lenguaje de programación Auto-Pro, se crearon rutinas automatizadas para medir el porcentaje del área periglandular ocupada por células vimentina-positivas. En este proceso de análisis automatizado, las imágenes de los cortes histológicos inmunoteñidos fueron primero convertidas a escala de grises. Luego se midió el área periglandular total y el área periglandular positiva. Así, se calculó el área relativa ocupada por células vimentina-positivas, dividiendo el área positiva por el área periglandular total (Ramos y col., 2001).

#### **4.1.4. Perímetro glandular ocupado por células $\alpha$ -SMA positivas**

El recubrimiento de las células del epitelio glandular con células musculares lisas refleja un cierto grado de organización de la histoarquitectura glandular, y pueden estar implicadas en la función de contracción que tiene la glándula (Czernobilsky y col., 1993). La identificación de células  $\alpha$ -SMA positivas en el perímetro glandular se realizó por IHQ siguiendo el protocolo descrito en las tablas 2 y 3.

La cuantificación de la expresión de  $\alpha$ -SMA se realizó sobre los cortes histológicos contracolorados, usando un sistema de análisis de imágenes similar al descrito en la sección anterior para la determinación de vimentina. La expresión de  $\alpha$ -SMA se midió como la proporción del perímetro glandular ocupado por células  $\alpha$ -SMA positivas (Kass y col., 2004). Los resultados se expresaron como densidad lineal ( $\mu\text{m}$ ).

#### **4.2. Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados mediante test no paramétricos y expresados como el promedio  $\pm$  SEM y se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis seguido por un post-test de Dunn de comparaciones múltiples, para comparar cada grupo experimental con el grupo control. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### **4.3. Evaluación histológica del tejido uterino en ratas de DPN360 (adultas)**

Con el objetivo de evaluar parámetros relacionados con la diferenciación funcional del tejido uterino en ratas adultas de edad avanzada expuestas perinatalmente a BPA, se sacrificaron hembras de DPN360 en estro, y se disecaron los cuernos uterinos (sección 2.3). Éstos fueron procesados para su análisis por microscopía óptica (sección 3). Se determinaron los siguientes parámetros:

- ✓ Análisis de la histomorfología uterina
- ✓ Inmunofenotipo de glándulas uterinas

#### **4.3.1. Histomorfología uterina**

Muestras de útero de 5 µm embebidas en parafina se colorearon con H&E para el análisis por microscopía óptica (Olympus BH2, Tokio, Japón). Para la coloración con H&E los cortes histológicos se desparafinaron e hidrataron en soluciones de alcoholes de graduación decreciente, se colorearon con hematoxilina de Mayer (1 min) y eosina (30 s) y posteriormente se deshidrataron. Las secciones de tejido coloreadas se montaron usando un líquido de montaje permanente (Eukitt, Sigma). Se realizó un exhaustivo análisis histológico y se identificaron distintas alteraciones uterinas previamente descritas (Bosquiazzo y col., 2013). La incidencia de esas alteraciones se cuantificó determinando el porcentaje de animales que presentaban al menos una alteración histológica (Bosquiazzo y col., 2013).

#### **4.3.2. Inmunofenotipo de glándulas uterinas**

Se evaluó cualitativamente la expresión de RE $\alpha$ , RP, BrdU, CK8, pan CK basal (CK34 $\beta$ E12) y p63. La determinación de estas moléculas se realizó por IHQ siguiendo el protocolo detallado en la tabla 2. Los anticuerpos utilizados y condiciones del ensayo se detallan en la tabla 4.

Tabla 4: Anticuerpos empleados para caracterizar el inmunofenotipo de glándulas uterinas por IHQ.

Anticuerpo primario utilizado	Dilución empleada	Anticuerpo secundario biotinilado	Extravidina-peroxidasa (Sigma)	Proveedor
<b>Anti-REa</b> (clon 6F-11)	1/200	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/150	Novocastra, UK
<b>Anti-RP</b> (clon A0098)	1/500	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/150	Dako Corp. (Carpinteria, CA, USA)
<b>Anti-CK8</b>	1/1600	Anti-oveja 1/200 (Sigma)	1/150	The Binding Site Limited, (Birmingham, UK)
<b>Anti-pan-CK basal</b> (clon 34βE12)	1/100	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/150	Novocastra, UK
<b>Anti-p63</b> (clone 4A4)	1/100	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/150	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
<b>Anti-BrdU</b> (clon 85-2C8)	1/100	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/100	Novocastra, U.K.

#### 4.3.3. Co-localización de proteínas in situ: IHQ doble

Esta técnica consiste básicamente en dos IHQ sucesivas. En una primera instancia se realiza la inmunomarcación de una de las moléculas en estudio tal como se describió en la tabla 2. Luego del revelado con DAB (marcación marrón) los cortes histológicos se sumergen en PBS y se continúa con una segunda IHQ para la detección de una segunda proteína (tabla 5). En este caso el ensayo se revela utilizando  $\text{NiCl}_2$  como intensificador de la marcación de la DAB, que otorga color negro. Así, los distintos colores de marcación en estos ensayos dobles permiten identificar en una misma célula la co-expresión de dos proteínas. En este trabajo se evaluó la co-expresión de p63 y de marcadores de diferenciación epitelial luminal (CK8) y basal (pan-CK basal) en las glándulas uterinas.

Tabla 5: Protocolo básico de la segunda parte de una IHQ doble.

<b>Lavado y recuperación antigénica</b> Calentamiento en horno microondas Buffer Citrato 0,01 M pH 6 PBS	Calentar 5 min a 100%, agregar las muestras y calentar 1 min a 100%, 4 min a 40%. Dejar 10 min apagado. 5 min
Suero normal de cabra 1/20, disuelto en PBS con 1,5% de leche en polvo descremada	30 min

<b>Segundo Anticuerpo primario</b> PBS	14-16 h (en cámara húmeda) a 4°C 15 min
<b>Sistema de revelado</b>	
<b>Anticuerpo secundario</b>	30 min
PBS	15 min
Extravidina-Peroxidasa	30 min
PBS	5 min
Sustrato enzimático (3,3 $\mu$ l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 vol) + cromógeno (1,65 mg DAB + 39,72 mg NiCl <sub>2</sub> disueltos en 3,3 ml Tris-HCl pH 7,5)	10 min
H <sub>2</sub> O destilada	5 min

#### 4.4. Análisis estadístico

La incidencia de anomalías uterinas en cada grupo experimental fue comparada con el grupo control usando el test de la probabilidad exacta de Fisher. Los resultados fueron expresados como el número de ratas afectadas con cada tipo de anomalía uterina vs. el total de ratas por grupo experimental. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### 5. CAPÍTULO II: Respuesta uterina al tratamiento crónico con E2 en ratas adultas (DPN460) expuestas perinatalmente a BPA

En este segundo capítulo de tesis nos propusimos evaluar la respuesta uterina al E2 en ratas de edad avanzada expuestas perinatalmente a BPA. Para ello, hembras adultas (DPN360) fueron tratadas con E2 durante 3 meses como se detalló en la sección 1.1 y sacrificadas en el DPN460, obteniéndose los animales de los grupos de **DPN460-E2: Control+E2** y **BPA+E2**. Al momento del sacrificio se obtuvo suero, y se disecaron los cuernos uterinos (sección 2.3) que fueron procesados para su análisis por microscopía óptica o para extracción de ARN total (sección 3).

Además, para poder dilucidar si los efectos observados en el útero de ratas de DPN460-E2 estuvieron asociados específicamente al tratamiento con E2, a la edad avanzada de los animales, o a una combinación de ambas variables, se realizaron dos experimentos complementarios, cuyo diseño experimental se

detalló en la sección 1.2, obteniéndose los animales de los grupos **DPN190-E2** y **DPN460**. Al momento del sacrificio se disecaron los cuernos uterinos (sección 2.3) y fueron procesados para su análisis por microscopía óptica (sección 3).

Estos dos grupos experimentales (DPN190-E2 y DPN460) junto con el grupo Control+E2 fueron analizados y comparados realizando un exhaustivo análisis de la histomorfología uterina mediante cortes coloreados con H&E según se describió en la sección 4.3.1.

Una vez concluido el análisis antes mencionado, procedimos a estudiar los efectos de la exposición perinatal a BPA en respuesta al tratamiento con E2. Para ello, en los grupos Control+E2 y BPA+E2 se estudiaron los parámetros que se detallan a continuación.

### **5.1. Niveles séricos de E2**

Los niveles séricos de E2 fueron medidos por radioinmunoensayo después de la extracción con etil éter (Merk, Buenos Aires, Argentina) (Kass y col., 2004). El anticuerpo fue provisto por el Dr. G.D. Niswender, y se utilizó E2 radioisotópicamente marcado con tritio [2,4,6,7,16,17-3H(N)]E2 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA). La sensibilidad del ensayo fue de 4 pg/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 3,2% y 11% respectivamente.

### **5.2. Evaluación histológica del tejido uterino**

#### **5.2.1. Histomorfología uterina**

Muestras de útero de 5 µm procesadas para análisis por microscopía óptica (sección 3) se colorearon con H&E (sección 4.3.1). Se realizó un exhaustivo análisis histomorfológico y se evaluó la incidencia de las anomalías uterinas encontradas de la misma manera que se detalló en la sección 4.3.1.

#### **5.2.2. Morfometría de glándulas uterinas**

En los casos en que la incidencia de algún tipo de alteración glandular fue cercana al 100%, se evaluó la multiplicidad de dicha alteración por animal (en 3

secciones de tejido por animal). Para ello se calculó la densidad de volumen de la alteración aplicando la fórmula dada por Weibel (1969) como se describió en la sección 4.1.1. En este caso,  $P_i$  fue el número de puntos incidentes sobre el tipo glandular analizado y  $P$  el número de puntos incidentes sobre todas las células en la población estudiada (estroma uterino). Los resultados se expresaron como  $V_v \times 1000$ .

### **5.3. Expresión de p63 y sus isoformas TA y $\Delta N$**

La expresión de p63 total se evaluó mediante ensayos de IHQ (tabla 2). El anticuerpo y las condiciones del ensayo se mostraron en la tabla 4. Las muestras se contracoloraron y se montaron. La cuantificación de la expresión de p63 en glándulas uterinas se realizó mediante el cálculo del porcentaje de células p63-positivas por glándula.

La expresión de las diferentes isoformas de p63 se evaluó mediante PCR en tiempo real como se detalla a continuación:

#### **5.3.1. Extracción de ARN total y transcripción reversa**

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo comercial TRIzol (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), que se fundamenta en el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi 1987). Básicamente, en el contenedor del homogeneizador Ultra Turrax<sup>®</sup> T25 Basic (IKA - Werke GMBH & Co.KG, Staufen, Germany) se agregaron 1000  $\mu$ l del reactivo TRIzol por cada 50-100 mg de tejido congelado, y se homogeneizó suavemente. Durante la homogeneización de la muestra el reactivo preserva la integridad del ARN. El agregado de cloroformo y posterior centrifugación separa la solución en una fase acuosa y otra fase orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, de donde es recuperado por precipitación con alcohol isopropílico, lavado con etanol al 80% y solubilizado en agua libre de ribonucleasas. La concentración de ARN total en las muestras procesadas se determinó mediante la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm. Se usó como

referencia de la pureza del ARN extraído, la relación entre las absorbancias obtenidas a 260 nm (punto de máxima absorción de ácidos nucleicos) y 280 nm (punto de máxima absorción de proteínas), utilizándose solamente aquellas muestras con una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1,9. Los ARN obtenidos fueron conservados a -80°C hasta su utilización. A partir de cada ARN extraído se realizó una transcripción reversa (RT) con el fin de obtener el correspondiente ADN copia (ADNc).

La reacción de RT se llevó a cabo empleando cantidades iguales (1 µg) del ARN total y utilizando la enzima *M-MLV* transcriptasa reversa (del inglés: *Moloney Murine Leukemia Virus*, 10U, Promega, Madison, WI, USA). Se emplearon oligonucleótidos hexaméricos (200 pmol, Promega) como cebadores. Al tubo de reacción se le adicionaron 20U de inhibidor de ARNasa (RNAout, Invitrogen) y 100 nmol de una mezcla de dNTPs, y se alcanzó un volumen final de 30 µl con la solución amortiguadora de la reacción provista por el fabricante de la enzima. La reacción de RT se realizó a 70°C por 5 min y 30 s con la mezcla de los ARN y cebadores, luego se agregó el resto de los reactivos y se continuó la reacción a 37°C por 90 min y 42°C por 15 min. La reacción finalizó calentando a 80°C por 5 min y a 94°C por 30 s para posteriormente efectuar un enfriamiento a 25°C. Las reacciones de RT se llevaron a cabo en un termociclador Rotor-Gene Q (Quiagen, Tecnolab; Buenos Aires, Argentina). Seguidamente se diluyó el ADNc generado llevándolo a un volumen final de 60 µl con agua libre de ARNasas. Como control negativo de la reacción se utilizó el ARN incubado en condiciones idénticas, pero sin transcriptasa reversa.

### **5.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real**

Luego de realizada la extracción del ARN total y posterior RT, se determinó la expresión del ARN mensajero (ARNm) de las isoformas de p63, TA y ΔN, mediante ensayos de PCR en tiempo real. Esta metodología se basa en la detección y cuantificación ciclo a ciclo de una molécula fluorescente (en este caso se empleó Eva Green) que se intercala a las hebras de ADN doble cadena. La

fluorescencia es detectada y leída por un fluorómetro acoplado al termociclador a medida que transcurre la reacción de PCR.

Para amplificar las diferentes isoformas del gen p63, se diseñaron oligonucleóticos (tabla 6) utilizando el software Vector NTI Suite Versión 6.0 (Infomax Inc., North Bethesda, MD, USA). Como control interno (gen de referencia) se utilizó la determinación de ARNm del gen ribosomal L19 (tabla 6). La temperatura de hibridación para cada amplicón se obtuvo a partir del análisis *in silico* usando el software Vector NTI (tabla 6).

Tabla 6: Oligonucleótidos empleados para amplificar las isoformas de p63 y L19.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	T° hibridación (°C)
<b>TA</b>	5'-AGCACCCAGACAAGTGAGTTC-3'	5'-GGTCACTGAGGTCTGAGTCTTG-3'	190	55
<b><math>\Delta N</math></b>	5'-GTACCTGGAAAGCAATGCC-3'	5'-GTAGATGAGGAGCCGTTCTG-3'	105	54
<b>L19</b>	5'-AGCCTGTGACTGTCCATTCC-3'	5'-TGGCAGTACCCTTCCTCTTC-3'	99	60

Cada par de oligonucleótidos fue diseñado específicamente para amplificar una única isoforma del gen p63 (figura 18). A su vez para cada isoforma, se eligieron oligonucleótidos sentido que hibridaran en un exón diferente a su correspondiente antisentido, evitando así la amplificación de ADN genómico (figura 18). La especificidad de los oligonucleótidos fue cotejada por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de *Rattus norvegicus* mediante el uso de la herramienta BLAST disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

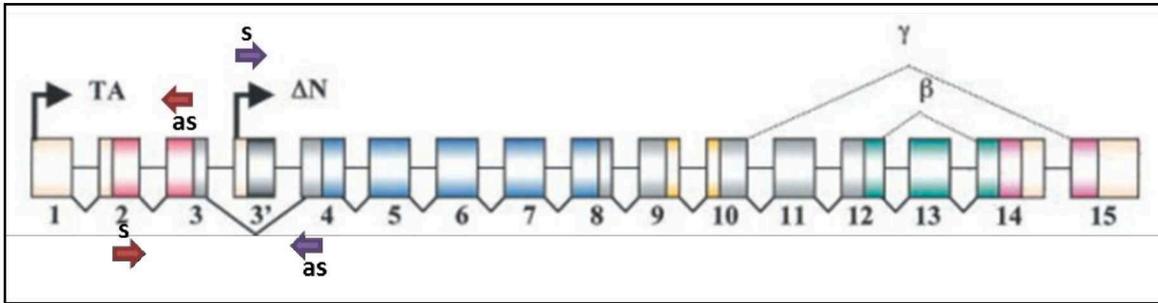


Figura 18: Representación esquemática de la secuencia del gen p63. Las flechas negras indican el comienzo de la transcripción para las isoformas TA y  $\Delta N$ . Las flechas de colores corresponden a los sitios de hibridación de los oligonucleótidos (s: sentido; as: antisentido) usados para amplificar TA (flechas rojas) y  $\Delta N$  (flechas violetas). Tomado y modificado de Ghioni y col., (2002).

Los tubos de reacción para la PCR en tiempo real se constituyeron con 5  $\mu$ l de ADNc que se combinaron con HOT-FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; Biocientífica; Rosario, Argentina) y 10 pmoles de cada oligonucleótido en un volumen final de 20  $\mu$ l. El protocolo general de ciclado utilizado se muestra en la tabla 7. La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación.

Tabla 7: Protocolo general de ciclado de PCR en tiempo real.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	15 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95	15 s	40
<b>Hibridación</b>	específica para cada amplicón (ver tabla 6)	15 s	
<b>Extensión</b>	72	15 s	
<b>Lectura</b>	81	4 s	
<b>Incubación</b>	10	10 min	1

El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct) (Higuchi y col., 1993). El valor de Ct para cada muestra se calculó utilizando el software Rotor-Gene Q Series (Versión 1.7,

Quiagen; Tecolab) con un umbral de ajuste de fluorescencia automática (Rn). La eficiencia (Ef) de la reacción de PCR para cada gen estudiado y para el gen de referencia (L19) fue calculada mediante curvas estándar. Estas curvas se construyen a partir de la amplificación de cada gen en diluciones seriadas de los ADNc. Luego, graficando el logaritmo de las diluciones de los ADNc vs. su correspondiente Ct, se obtiene la fórmula de la recta por regresión lineal a partir de la cual se calcula la Ef ( $Ef = 10^{(-1/pendiente)} - 1$ ). Dependiendo de las condiciones específicas de PCR, la Ef varió entre 98% y 102%. El posterior cálculo de los niveles de expresión relativa de cada gen en los animales tratados con respecto a los controles se realizó utilizando el método de la curva estándar relativa (Cikos y col., 2007). Para todas las muestras experimentales, la cantidad relativa del gen de interés y del gen L19 fue determinada a partir de la curva estándar previamente realizada para cada gen. La cantidad obtenida correspondiente al gen de interés fue normalizada con la cantidad relativa del gen L19 en cada grupo experimental.

#### **5.4. Generación de anticuerpos contra Wnt7a y Wnt5a**

Para estudiar la expresión de las proteínas Wnt7a y Wnt5a mediante ensayos de IHQ, generamos previamente los anticuerpos policlonales como se detalla a continuación.

##### **5.4.1. Obtención de antígenos recombinantes en células procariotas**

###### **5.4.1.1. Diseño bioinformático, amplificación y clonado de la secuencia nucleotídica necesaria para la expresión de los antígenos de Wnt7a y Wnt5a**

La región de la secuencia del gen de Wnt7a y Wnt5a que se utilizó para generar el antígeno fue seleccionada utilizando la herramienta BioPlot del programa bioinformático Vector NTI, capaz de identificar zonas proteicas con alta antigenicidad teórica. Para la producción del antígeno se utilizó una estrategia de clonado direccional EcoRI-XhoI, amplificando por PCR las secuencias nucleotídicas de las regiones antigénicas seleccionadas. Para las amplificaciones por PCR, se empleó ADNc obtenido de una muestra de útero de rata y se utilizaron oligonucleótidos diseñados específicamente con el agregado de sitios de

corte para enzimas de restricción (XhoI: CTCGAG, EcoRI: GAATTC) que se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8: Oligonucleótidos utilizados para amplificar y clonar las secuencias de Wnt7a y Wnt5a.

gen	Oligonucleótidos *	Tamaño (pb)
<b>Wnt7a (sentido)</b>	gtcg <b><u>GAATTC</u></b> TGAGAACATGAAACTGGAGTG	278
<b>Wnt7a (antisentido)</b>	ttt <b><u>CTCGAG</u></b> TGAGCAGTAATTGGGTGACTTCTC	
<b>Wnt5a (sentido)</b>	gtcc <b><u>GAATTC</u></b> CGCCAAGGGCTCCTATGAGA	293
<b>Wnt5a (antisentido)</b>	gtt <b><u>CTCGAG</u></b> TGAGGTGGTTGGGGAGTTGAAGCG	

\* En minúsculas se muestran los extremos 5' no específicos de los oligonucleótidos. Subrayado se resalta la secuencia de corte de las enzimas EcoRI y XhoI (Promega) utilizadas para el clonado direccional en el vector de expresión pGEX4T-3.

El producto de PCR obtenido se purificó a partir de un gel de agarosa utilizando el kit Wizard SV Gel and Clean-up System (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Luego cada producto de PCR se digirió con las enzimas EcoRI y XhoI en buffer H (Promega) durante 2 h a 37°C. Los productos de los cortes de restricción fueron purificados y ligados al vector pGEX-4-T3 (figura 19, Stratagene Corp., La Jolla, CA) digerido con las mismas enzimas, durante toda la noche a 4°C utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Promega). Así, se logró el clonado direccional en el vector de expresión pGEX-4T-3.

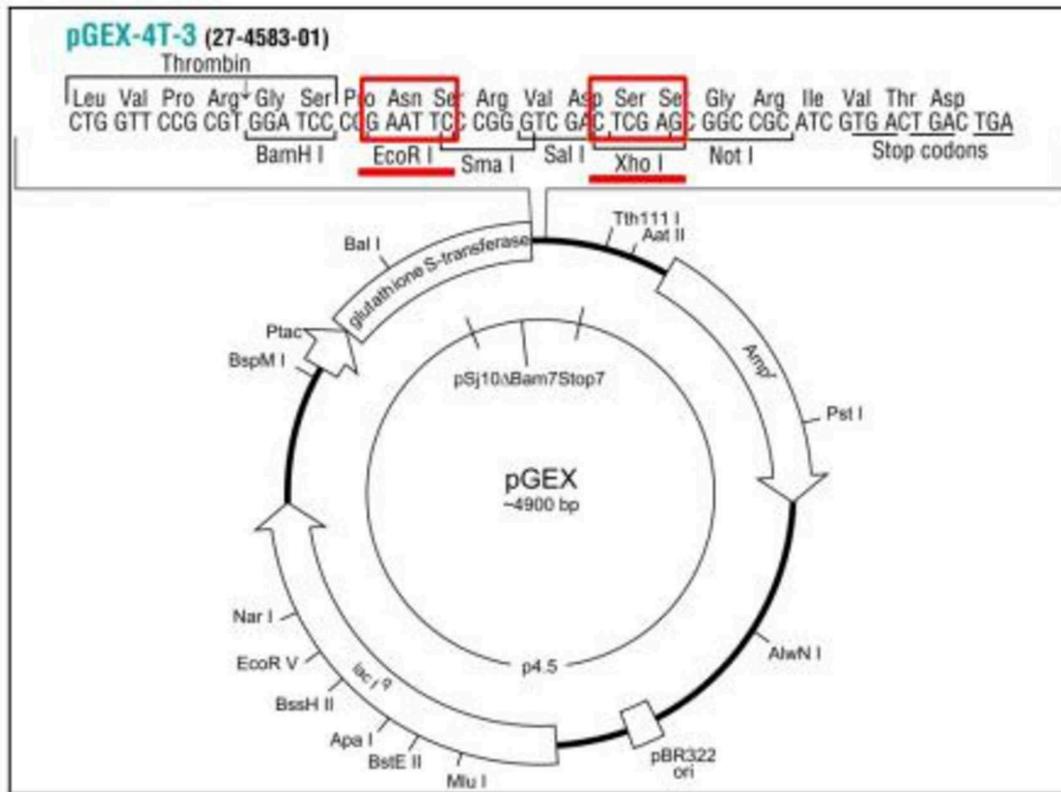


Figura 19: Plásmido pGEX-4T-3 y estrategia de clonado direccional utilizada para la expresión de los antígenos de Wnt7a y Wnt5a como una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST-Wnt7a/Wnt5a). Tomado y modificado de GE Healthcare Life Sciences (2014).

De esta forma, el marco de lectura de Wnt7a o Wnt5a queda en fase con el de la glutatión-S-transferasa (GST, figura 19). Así, los constructos pGEX-4T-3/Wnt7a o pGEX-4T-3/Wnt5a dirigen la síntesis de la proteína de fusión GST-Wnt7a y GST-Wnt5a respectivamente. Con los plásmidos recombinantes obtenidos se transformaron bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α (Stratagene) por el método del CaCl<sub>2</sub> (Sambrook y Russell 2001). Se seleccionaron clones de bacterias transformadas al azar y se chequeó por PCR que efectivamente habían sido transformadas con el vector recombinante. Se generaron stocks de esas bacterias y se almacenaron a -80 °C.

#### 5.4.1.2. Expresión y purificación de los antígenos recombinantes

Para expresar en forma soluble las proteínas recombinantes, células de *E. coli* JM109 (Stratagene) fueron transformadas con el vector pGEX-4T-3/Wnt7a o

pGEX-4T-3/Wnt5a y cultivadas en medio Luria Bertoni (1% peptona de carne, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl). La expresión de las proteínas de fusión se indujo con el agregado de Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Promega) en una concentración final de 250 nM. Luego de la inducción, el cultivo de células fue sonificado en baño de hielo (High Intensity Ultrasonic Processor, Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc., Newton, CT, USA) y centrifugado a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y la proteína de fusión fue purificada a partir del mismo utilizando una columna cromatográfica GSTrap™ (GE Healthcare, Buenos Aires, Argentina). Se recogieron las fracciones de elución, cuya concentración de proteína se estimó determinando la absorbancia a 280 nm. Las fracciones obtenidas fueron sembradas y corridas en un gel de poliacrilamida del 5 al 20% para evaluar su pureza relativa. Se juntaron todas las fracciones que contenían proteína y se las concentró utilizando tubos de filtración forzada (Centricon, límite de paso 10 kDa, Millipore, Billerica, MA).

#### **5.4.2. Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales mono-específicos de conejo**

a) Inoculación de los conejos: Una vez obtenidas las proteínas de fusión purificadas (GST-Wnt7a y GST-Wnt5a) se procedió a la inoculación de dos conejos (pertenecientes al bioterio del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral -ICIVET-Litoral UNL-CONICET), uno para cada antígeno, de acuerdo al siguiente protocolo (Harlow y Lane 2014; Vaitukaitis y col., 1971):

- se tomó una muestra de sangre de la cual se obtuvo el suero basal y luego se inoculó cada antígeno,
- se inyectó por vía sc una preparación de 300  $\mu$ l de cada antígeno en una concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l disuelto en PBS con 300  $\mu$ l de adyuvante completo de Freund,
- 15 días después se realizó una nueva inoculación de la misma preparación antes descripta, pero esta vez utilizando adyuvante incompleto de Freund. Este procedimiento se repitió dos veces cada 15 días, finalizando el proceso de

inoculación a los 60 días de la primera inoculación. Dos semanas luego del último estímulo los conejos fueron sacrificados y los sueros se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**b) Purificación de los anticuerpos específicos:** Se realizó mediante dos cromatografías de afinidad sucesivas, utilizando columnas cuya matriz se componía de agarosa unida a radicales N-hidroxisuccinimida (NHS) activados (Hi-Trap NHS activated HP, GE Healthcare). Estas columnas permiten adherir a la matriz activada, antígenos específicos de los anticuerpos que se desean aislar. En la primera cromatografía nos propusimos separar del antisuero los anticuerpos que pudieran haberse generado contra el péptido de GST (que formaba parte de los antígenos recombinantes inoculados a los conejos). Para ello se adhirió a la columna cromatográfica el péptido de GST obtenido a partir de la expresión en células *E. coli JM109* transformadas con el plásmido pGEX-4T-3 vacío, es decir, sin ninguna proteína fusionada a la GST. Para ello, 5 mg de proteína GST purificada se concentraron con tubos Centricon (Millipore) a un volumen final de 1 ml. Esta solución se adicionó a la columna de 1 ml de lecho activado y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se desactivaron los grupos NHS activos remanentes y la columna se lavó con PBS, luego con solución de elución (glicina 100 mM pH 3) y finalmente se equilibró con PBS. Una vez preparada la columna se sembró el antisuero y se lavó con PBS. En esta columna quedan retenidos los anticuerpos contra GST, pasando al percolado la fracción de antisuero que contiene los anticuerpos específicos contra Wnt7a o Wnt5a. De esta manera el percolado se conserva hasta la siguiente cromatografía. La columna luego se eluye con buffer de elución, y se descarta el eluato que contiene los anticuerpos contra GST.

En la segunda cromatografía nos propusimos purificar los anticuerpos específicos contra la proteína de interés (Wnt7a o Wnt5a), descartando otros anticuerpos o moléculas contaminantes del antisuero. Por lo tanto para estas cromatografías se emplearon las mismas columnas Hi-Trap NHS activated HP pero adicionando a la columna de 1 ml de lecho activado, 5-7 mg de proteína recombinante GST-Wnt7a o GST-Wnt5a purificada y concentrada. En este caso el

percolado se descartó y los anticuerpos de interés retenidos en la columna se eluyeron y se recogieron fracciones de 1 ml con 60  $\mu$ l de Tris-HCl 1,5 M pH 8,6 para neutralizar el eluido. Luego se leyó la absorbancia de cada fracción en espectrofotómetro a 280 nm. Las fracciones con absorbancias mayores a 0,2 se juntaron, homogeneizaron y posteriormente se concentraron con tubos Centricon (límite de paso 30 kDa, Millipore) y se almacenaron a -20°C hasta ser utilizadas para los inmunoensayos.

**c) Caracterización de los anticuerpos generados por Western Blot e IHQ:**

Para caracterizar los anticuerpos producidos (anti-Wnt7a y anti-Wnt5a) por Western blot, se usaron extractos protéicos de útero y de testículo (como control positivo de la expresión de Wnt7a) (Kirikoshi y Katoh 2002). Cantidades equivalentes de proteína (100  $\mu$ g) de cada tejido se sembraron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en gradiente 4-20%, fueron corridos en cubas electroforéticas, y luego se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% disuelta en buffer Tris-salino Tween (Tris 25 mM, NaCl 0,14 M, Tween-20 0,05% v/v, pH 7,4) durante toda la noche a 4°C para prevenir uniones inespecíficas. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con solución tampón Tris con Tween (TBST) y se incubó con el anticuerpo anti-Wnt7a o anti-Wnt5a (dilución 1/200) en TBST-leche 2% durante 1:30 h. Luego, la membrana se lavó con TBST y se incubó con anticuerpo secundario (anti-conejo conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido 1/400 en TBST-leche 2%) durante 1 h. La membrana se lavó 3 veces con TBST y la reacción se visualizó utilizando como cromógeno DAB 0,5 mg/ml (Sigma). El peso molecular de las proteínas fue determinado utilizando marcadores de peso estándar (Broad Range Protein Markers, Promega, Madison, WI, USA).

Por otra parte, para confirmar la reactividad y especificidad de los anticuerpos generados, se realizaron ensayos de IHQ en tejidos embebidos en parafina usando secciones de útero y testículo de rata, siguiendo el protocolo descrito previamente (tabla 2). Para evaluar la especificidad de los anticuerpos generados, los péptidos antigénicos GST-Wnt7a y GST-Wnt5a fueron utilizados para

preadsorber el anticuerpo correspondiente, incubando 1 µg de anticuerpo con 10-20 µg de antígeno durante 24 h a 4°C. Estas mezclas antígeno-anticuerpo fueron utilizadas en ensayos de IHQ.

### 5.5. Cuantificación de Wnt7a, Wnt5a, β-catenina y RP en glándulas uterinas

Para investigar la expresión de estas moléculas en nuestro experimento se empleó la técnica de IHQ previamente descrita (tabla 2). Los anticuerpos y las condiciones de los ensayos se muestran en la tabla 9.

La expresión de estas moléculas en las glándulas uterinas se cuantificó sobre ensayos de IHQ sin contracoloración, mediante análisis digital de imágenes de manera similar a como se describió en la sección 4.1.3. En este caso, utilizando el software Image-Pro Plus se determinó el área glandular total evaluada, luego se midió el área de marcación positiva para cada una de las moléculas evaluadas y el promedio de la intensidad de la marcación. Con estas determinaciones se calculó la densidad óptica integrada (DOI) como una combinación lineal entre el promedio de intensidades de grises y el área relativa ocupada por células positivas. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias.

Tabla 9: Anticuerpos utilizados para evaluar la expresión de Wnt7a, Wnt5a, β-catenina y RP.

Anticuerpo primario utilizado	Dilución empleada	Anticuerpo secundario biotinilado	Extravidina-peroxidasa (Sigma)
<b><i>Anti-Wnt7a</i></b>	1/400	anti-conejo 1/200 (Sigma)	1/150
<b><i>Anti-Wnt5a</i></b>	1/200	anti-conejo 1/200 (Sigma)	1/150
<b><i>Anti-β-catenina (clon E-5, Santa Cruz Biotechnology Inc.)</i></b>	1/1600	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/150
<b><i>Anti-RP (clon A0098, Dako Corp. USA)</i></b>	1/500	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/150

### 5.6. Expresión de REα, REβ y RP en el estroma uterino

La cuantificación de los niveles de expresión de los receptores hormonales en el estroma uterino se realizó sobre ensayos de IHQ (tabla 2) sin

contracoloración. Los anticuerpos y las condiciones de los ensayos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Anticuerpos utilizados para evaluar la expresión de receptores hormonales.

Anticuerpo primario utilizado	Dilución empleada	Anticuerpo secundario biotinilado	Extravidina-peroxidasa (Sigma)	Proveedor
<b>Anti-RE<math>\alpha</math></b> (clon 6F-11)	1/200	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/150	Novocastra, UK
<b>Anti-RE<math>\beta</math></b> (clon EMRO2)	1/100	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/150	Novocastra, UK
<b>Anti-RP</b> (clon A0098)	1/500	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/150	Dako Corp. USA

La cuantificación de la expresión de receptores hormonales se determinó mediante análisis digital de imágenes (sección 4.1.3). En este caso se delimitó el compartimiento estromal (un área de 300  $\mu\text{m}$  de espesor, desde la membrana basal del epitelio hacia las capas más externas). Utilizando el software Image-Pro Plus se determinó el área del estroma total evaluado, se midió el área de marcación positiva para cada uno de los receptores en el estroma uterino y el promedio de la intensidad de la marcación de cada receptor. Con estas determinaciones se calculó la DOI. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias.

### 5.7. Expresión del ARNm de RE $\alpha$ y sus promotores transcripcionales OS, ON, O, OT y E1

La expresión del ARNm del RE $\alpha$  total y de sus variantes transcripcionales se determinó por PCR en tiempo real tal como se describió en la sección 5.3.2, empleando oligonucleóticos diseñados específicamente mediante el software Vector NTI (tabla 11). Para evaluar la expresión de las variantes 5'UTR generadas a partir del uso de promotores alternativos, se diseñaron oligonucleóticos sentido específicos de cada exón no traducible (OS, ON, O, OT y E1), y un oligonucleótido común que hibridó en el exón 1 codificante, común para todas las variantes (figura

20). El cálculo de los niveles de expresión relativa se realizó utilizando el método de la curva estándar relativa (sección 5.3.2).

Tabla 11: Oligonucleótidos empleados para amplificar RE $\alpha$  y sus promotores transcripcionales.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	T° hibridación (°C)
RE $\alpha$	5'-ACTACCTGGAGAACGAGCCC-3'	5'-CCTTGGCAGACTCCATGAT-3'	153	60
RE $\alpha$ -OS	5'-CCCTCCTCTGCCATTGTCTA-3'	5'-ATTCCCGAGGCTTTGGTGT-3'	166	58
RE $\alpha$ -ON	5'-TCTGGGGCATCTCCTTCAA-3'	5'-ATTCCCGAGGCTTTGGTGT-3'	193	57
RE $\alpha$ -O	5'-AGCACATTCTTCTCCG-3'	5'-ATTCCCGAGGCTTTGGTGT-3'	196	58
RE $\alpha$ -OT	5'-TCCAGCAGGTTTGCATGT-3'	5'-ATTCCCGAGGCTTTGGTGT-3'	164	59
RE $\alpha$ -E1	5'-TAACCTCGGGCTCTACTCTT-3'	5'-ATTCCCGAGGCTTTGGTGT-3'	133	57

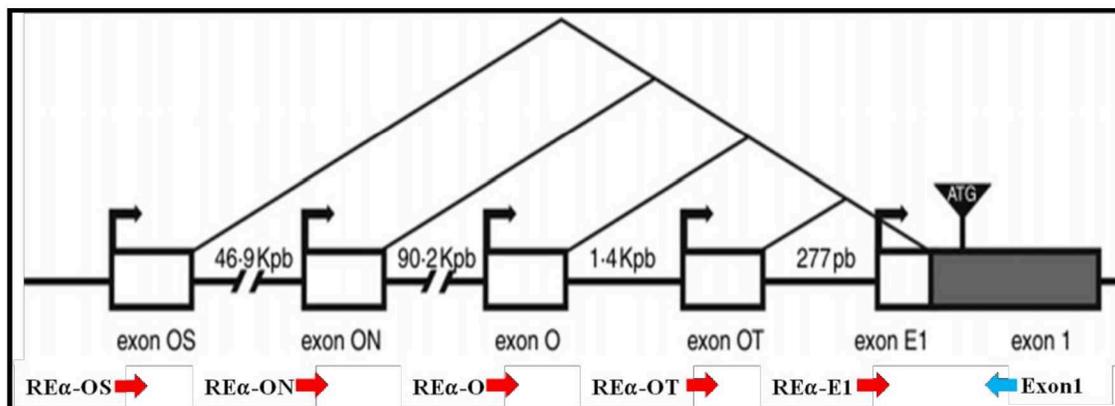


Figura 20: Organización genómica de la región promotora del gen de RE $\alpha$ . La posición relativa y la orientación de los oligonucleótidos sentido diseñados para ser utilizados en las PCR específicas de cada promotor se indican con flechas rojas. La región común a todos los exones 5' no traducibles se indica con una caja gris, y el oligonucleótido antisentido común para todas las PCR se indica con una flecha azul. Tomado y modificado de Monje y col., (2007).

## 5.8. Expresión de coactivadores de la acción de los receptores de hormonas esteroideas: SRC1 y SRC3 en el estroma uterino

La cuantificación de los niveles de expresión de los coactivadores en el estroma uterino se realizó sobre ensayos de IHQ (tabla 2) sin contracoloración. Los anticuerpos y las condiciones de los ensayos se encuentran en la tabla 12.

Tabla 12: Anticuerpos utilizados para evaluar la expresión de coactivadores de receptores hormonales.

Anticuerpo primario	Dilución empleada	Anticuerpo secundario biotinilado	Extravidina-peroxidasa (Sigma)	Proveedor
<b>Anti-SRC1 (clon 128E7)</b>	1/3200	Anti-ratón 1/80 (Sigma)	1/150	Dako Corp. USA
<b>Anti-SRC3</b>	1/150	Anti-conejo 1/200 (Sigma)	1/150	Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (Santa Fe, Argentina)*

\* El Anti-SRC3 fue generado y testeado en nuestro laboratorio por Varayoud y col., (2008).

La expresión de coactivadores fue cuantificada mediante análisis digital de imágenes (sección 4.1.3), evaluando la DOI de la expresión positiva en el estroma uterino, como se describió en la sección 5.6 para determinar la expresión de los receptores hormonales.

### 5.9. Expresión del ARNm de IGF-I e IGF-IR

La determinación de IGF-I y su receptor IGF-IR en el útero fue cuantificada por PCR en tiempo real, como se detalló en la sección 5.3.2, empleando oligonucleótidos diseñados específicamente utilizando el software Vector NTI (tabla 13). La cuantificación de los niveles de expresión relativa se realizó utilizando el método de la curva estándar relativa (sección 5.3.2).

Tabla 13: Oligonucleótidos empleados para amplificar IGF-I e IGF-IR.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	T° hibridación (°C)
<b>IGF-I</b>	5'-ACTTCAACAAGCCCACAGG-3'	5'-AGCGGAGCACAGTACATCTC-3'	121	55
<b>IGF-IR</b>	5'-CTCAAGGATGGCGTCTTCAC-3'	5'-GAACTTGCTCGTTGGACAGG-3'	115	57

### 5.10. Expresión de enzimas involucradas en mecanismos epigenéticos: Dnmt3a y 3b, Hdac-1, -2, -3 y Enhancer of zeste homolog 2 (EZH-2)

La expresión de estas moléculas se determinó mediante PCR en tiempo real (sección 5.3.2), empleando oligonucleótidos diseñados específicamente mediante

el software Vector NTI (tabla 14). La cuantificación de los niveles de expresión relativa se realizó utilizando el método de la curva estándar relativa (sección, 5.3.2).

Tabla 14: Oligonucleótidos empleados para amplificar Dnmt3a y 3b, Hdac-1, -2, -3 y EZH-2.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	T° hibridación (°C)
<i>Dnmt3a</i>	5'-GCTGAAGGACCTGGGCATCC-3'	5'-GGCCCCACTCCTGGATATGC-3'	152	61
<i>Dnmt3b</i>	5'-ACCAGAGGCCGAGATCAAG-3'	5'-GAGCCATCTCCATCATCCGC-3'	116	58
<i>Hdac-1</i>	5'-CAATGAAGCCTCACCGAATC-3'	5'-TTGGTCATCTCCTCAGCGTT-3'	112	53
<i>Hdac-2</i>	5'-AGGGACGGTATAGATGACGA-3'	5'-ACAGTTAGGTTGAAGCAGCC-3'	149	55
<i>Hdac-3</i>	5'-CAACTGGGCTGGTGGTCTAC-3'	5'-CGAGGGTGGTACTTGAGCAG-3'	108	55
<i>EZH-2</i>	5'-GATTTTCCAGCACAAATCAT-3'	5'-AACAGTTTCATCTTCCACCA-3'	114	52

### 5.11. Análisis estadístico

La incidencia de anomalías uterinas en cada grupo experimental fue comparada con el grupo control usando el test de la probabilidad exacta de Fisher como se detalló en la sección 4.4. de Materiales y Métodos (M&M). El resto de los resultados fueron analizados mediante test no paramétricos y expresados como la media  $\pm$  SEM. La expresión de las variantes 5'UTR del RE $\alpha$  fue analizada mediante *t* test. El resto de variables estudiadas fueron analizadas mediante el test de Kruskal-Wallis seguido por un post-test de Dunn. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## 6. CAPÍTULO III: Establecimiento de cultivos en tres dimensiones (3D) de células epiteliales endometriales para estudiar los efectos de la exposición in vitro a Bisfenol A

1) Desarrollo de cultivos en 3D: Se siguió el protocolo de cultivos en 3D descrito y desarrollado por Eritja y col., (2010). Para ello, se extrajeron los cuernos uterinos de ratones de la cepa C57BL6 (pertenecientes al bioterio del

Instituto de Recerca Biomédica de Lleida) de 3 a 4 semanas de vida y se lavaron con solución salina balanceada de Hank (Invitrogen). Cada cuerno uterino se fragmentó en 3 partes y se digirieron con Tripsina al 1% (Invitrogen) en solución de Hank durante 1:45 h. Se bloqueó la acción de la tripsina adicionando medio DMEM (del inglés: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con 10% de suero fetal bovino (SFB, Invitrogen) y se separaron cuidadosamente las células epiteliales del útero presionando suavemente desde un extremo con bisturí. Las láminas epiteliales se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 min y se lavaron con PBS. Luego se resuspendieron en medio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado con 1 mmol/L de HEPES (Sigma), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma) y Fungizona (Invitrogen) (medio que se denominó BASAL). Las células luego fueron separadas mecánicamente por pipeteo hasta visualizar al microscopio grupos de 4-8 células. Se cultivaron en medio BASAL conteniendo 2% de suero preadsorbido con carbón activado (HyClone Laboratorios, Logan, UT) y se cultivaron en placas de 96 pocillos (cultivo en 2D) en incubadora a 37 °C con saturación de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 24 h, las placas fueron lavadas con PBS y tripsinizadas. Se colectaron las células en tubos falcon de 15 ml y se centrifugaron a 1000 rpm durante 4 min. Se resuspendieron en medio BASAL conteniendo 3% de Matrigel (BD Biosciences) y se cultivaron en placas de 96 pocillos previamente cubiertas con una base ("cama") de Matrigel al 100% (cultivo en 3D). A las 24 h se reemplazó el medio BASAL por medio BIE (medio BASAL suplementado con 10 ml/l de insulina/transferrina/selenito de sodio 100X y 5 ng/ml de EGF), con 3% de Matrigel. Este medio de cultivo permite a las células polarizarse y formar las estructuras glandulares (Eritja y col., 2010). Cada 2-3 días se realizaron los cambios de medio BIE.

**2) Exposición a BPA:** Los cultivos fueron expuestos a DMSO al 0,1% (Control) o a distintas dosis de BPA: 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup> M, durante 12 días. El experimento se realizó por triplicado para comprobar la reproducibilidad del mismo. Se evaluaron los siguientes parámetros:

**a) Proliferación de las estructuras glandulares:** Durante el tratamiento, cada 3 días se tomaron fotomicrografías de los cultivos y se cuantificó el perímetro de las estructuras glandulares utilizando el software Image-Pro Plus. En algunos casos, para corroborar el grado de proliferación de las glándulas, se evaluó por Inmunofluorescencia (IF) la incorporación de BrdU, siguiendo el protocolo descrito por Eritja y col., (2010). Brevemente, los cultivos se incubaron con 3 ng/ml de BrdU (Sigma) durante 15 h y luego se fijaron con 4% de paraformaldehído. Las hebras de ADN se desnaturalizaron con HCl 2 M por 30 min y posteriormente se neutralizó el medio con 0,1 M de Borax. Posteriormente se incubaron con anti-BrdU (dilución 1/100, Dako Corp.) durante toda la noche y luego 1 h con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (1/500, Invitrogen). Los núcleos se marcaron con Hoechst 33258 (5 µg/ml) y las células se visualizaron en microscopio confocal. Los núcleos positivos fueron divididos por el número total de núcleos y los resultados se expresaron como porcentaje de células BrdU-positivas. Los resultados fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis, seguido por el post-test de Dunn. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

**b) Polaridad apicobasal:** se evaluó a los 3 días de comenzado el tratamiento. Se analizó la expresión de marcadores específicos por IF: Faloidina, que determina el posicionamiento del citoesqueleto de actina, normalmente ubicado en la superficie apical de las células; GM130, marcador del aparato de Golgi (posicionado adyacente al núcleo, hacia la cara luminal de la células en condiciones normales); y  $\beta$ -catenina, para evaluar uniones célula-célula y célula-matriz extracelular. Se empleó el protocolo anteriormente descrito (Eritja y col., 2010). Brevemente, los cultivos fueron primero fijados con formalina durante 5 min. Las células se permeabilizaron con 0,2% de Triton X-100 en PBS y luego se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios anti-GM130 o anti- $\beta$ -catenina (diluídos 1/250). Después se incubaron con una mezcla de Hoechst (5 µg/ml) y una dilución 1/500 de anticuerpo secundario Alexa Fluor. Para el caso de la IF doble (faloidina/GM130) las células luego se incubaron con el anticuerpo anti-faloidina (dilución 1/500) conjugado con fluorocromo.

## ***IV- RESULTADOS***

*"Diariamente el sol fue mi testigo y la luna, la que me regaló el camino..."*

*Calle 13*

---

## 1. Dosis de BPA recibida por los animales durante el tratamiento

Durante el tratamiento perinatal con BPA (desde el DG9 hasta el DPN21), se midió el consumo de agua y se pesaron los animales dos veces por semana para calcular un promedio de la dosis que efectivamente recibieron (tabla 15).

Tabla 15: Consumo de agua y dosis de BPA recibida por los animales de cada grupo experimental.

Grupo	Concentración de BPA en el agua de bebida	Dosis que se pretende estudiar	Consumo de agua durante el tratamiento (promedio)	Peso de las ratas durante el tratamiento (promedio)	Dosis recibida (promedio)
Control	0µg/l	-	68,2 ml/día	256,5g	-
BPA0.6	2,5µg/l	0,5 µg/kg/día	70,3 ml/día	254,7g	0,6 µg/kg/día
BPA60	250µg/l	50 µg/kg/día	60,6 ml/día	251,1g	60,3 µg/kg/día

Como se puede observar en la tabla anterior, las dosis de BPA que recibieron los animales durante el tratamiento fueron similares a las que se pretendían estudiar (0.5 µg/Kg/d y 50 µg/Kg/d). No obstante, decidimos nombrar a los grupos experimentales de BPA según las dosis promedio que efectivamente recibieron los animales, es decir, como “BPA0.6” y “BPA60”.

## 2. Efectos de la exposición a BPA sobre parámetros reproductivos en madres y crías

La exposición perinatal a BPA no produjo signos de embriotoxicidad. Las madres tuvieron partos normales en el DG23, el n° de crías por camada fue similar entre los grupos, no se observaron comportamientos maternos anormales ni cambios en la ganancia de peso o consumo de agua durante la preñez y lactancia. Por otra parte, la supervivencia de la camada no se modificó durante la lactancia. El inicio de la pubertad en las crías no mostró diferencias significativas entre los grupos. Todas las hembras expuestas a BPA exhibieron ciclos estrales regulares (5 días) en DPN90. En DPN360 y DPN460, se observaron algunos periodos

intermitentes de diestro prolongado o de proestro/estro sin mostrar diferencias entre los grupos experimentales. Estos datos se resumen en la tabla 16.

Tabla 16: Parámetros generales evaluados en madres y crías expuestas a BPA en el agua de bebida.

	<b>Control</b>	<b>BPA0.6</b>	<b>BPA60</b>
<b>N° de crías/camada</b>	10.33±0.89	10.25±1.11	9.75±1.70
<b>Peso de las crías al nacer (g)</b>	6.00±0.14	5.89±0.15	6.18±0.21
<b>Peso de las crías al destete (DPN21)(g)</b>	34.51±1.16	33.85±1.50	33.38±0.90
<b>Relación hembras/machos (%)<sup>1</sup></b>	50/50	50/50	55.13/44.87
<b>Inicio de la pubertad (días)<sup>2</sup></b>	48.00±1.21	48.86±1.20	47.50±0.87
<b>Longitud de los ciclos estrales en DPN90<sup>3</sup></b>	5.20±0.15	5.39±0.19	5.60±0.32
<b>Longitud de los ciclos estrales en DPN360<sup>3</sup></b>	6.15±0.45	5.90±0.59	6.57±0.47
<b>Longitud de los ciclos estrales en DPN460<sup>3</sup></b>	7.84±0.5	7.29±0.62	7.80±0.61

Los parámetros fueron evaluados determinando la distancia anogenital<sup>1</sup>, apertura vaginal<sup>2</sup> y extendidos vaginales<sup>3</sup>. Los valores se expresaron como la media ± SEM.

## **CAPÍTULO I**

### ***Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre el útero de ratas en diferentes etapas reproductivas***

#### **3. Evaluación del tejido uterino en ratas de DPN90 (adultas jóvenes)**

Todos estos animales fueron sacrificados en estro, por lo tanto, el tejido uterino presentó características histológicas de esta etapa del ciclo (Westwood 2008): epitelio luminal cilíndrico simple, presencia de numerosas glándulas uterinas formadas por un epitelio simple cúbico, y alto porcentaje de células

apoptóticas en el epitelio luminal y glandular (figura 21, flechas). No se observaron diferencias entre los grupos control y tratados con BPA.

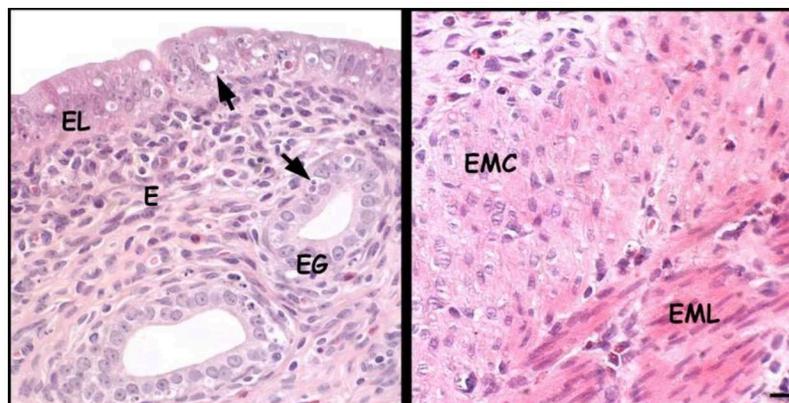


Figura 21: Fotomicrografías representativas del tejido uterino de un animal control de DPN90. Las flechas indican células apoptóticas en el epitelio luminal (EL) y glandular (EG). E: estroma, EMC: estroma muscular circular interno, EML: estroma muscular longitudinal externo. Barra: 50  $\mu$ m.

### 3.1. Proliferación y apoptosis celular

Se evaluó la dinámica celular (proliferación y apoptosis) en cada compartimiento celular del útero de las hembras de DPN90 expuestas a BPA. En el epitelio luminal, el estroma y la región muscular, la incorporación de BrdU y los índices apoptóticos no mostraron diferencias entre los grupos. En el epitelio glandular se observó una disminución significativa de la actividad proliferativa en los animales expuestos a BPA0.6 y a BPA60, mientras que los índices apoptóticos no se modificaron (figura 22).

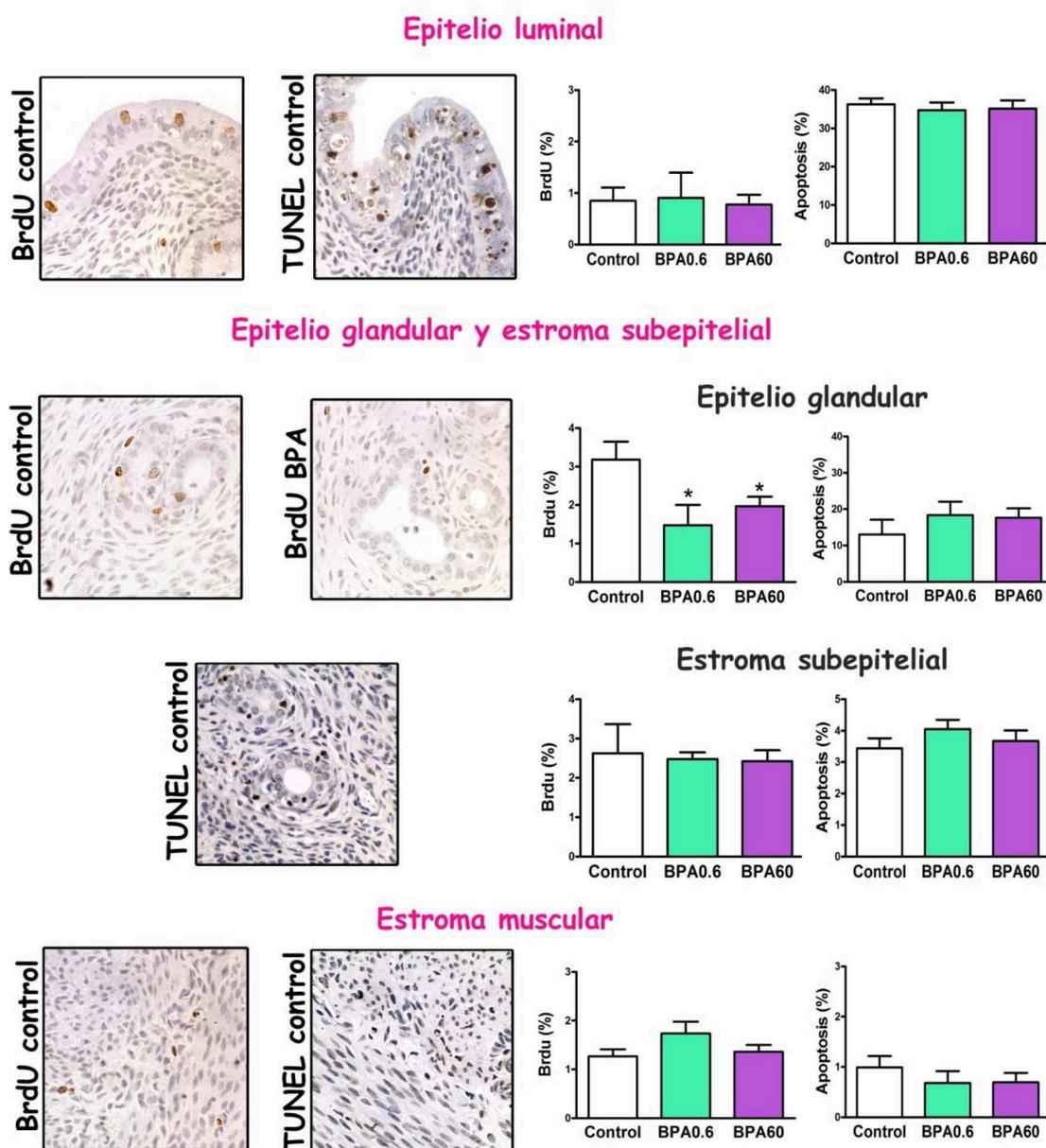


Figura 22: Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre el índice proliferativo y apoptótico en el útero de ratas de DPN90. A la izquierda, fotomicrografías representativas de la marcación positiva de BrdU y TUNEL (magnificación 40X). A la derecha, cuantificación de la proliferación y apoptosis mediante la incorporación de BrdU y TUNEL respectivamente, en los distintos compartimentos uterinos. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  vs. el grupo control.

### 3.2. Expresión de vimentina y $\alpha$ -SMA

Las células del estroma que rodean el epitelio glandular cumplen un rol muy importante en el mantenimiento de la arquitectura y función glandular. Como se mencionó en la Introducción de esta tesis (sección 2) estas células expresan

marcadores de naturaleza fibroblástica y muscular, como lo son las proteínas vimentina y  $\alpha$ -SMA, respectivamente. Para cuantificar la expresión de estas proteínas en las ratas expuestas a BPA, se realizaron ensayos de IHQ sobre secciones de útero de los animales de DPN90. Nuestros resultados demostraron que el área periglandular ocupada por células vimentina-positivas no se modificó por el tratamiento con BPA (figura 23). Sin embargo, los animales expuestos a BPA60 presentaron una disminución en el porcentaje del perímetro glandular ocupado por células  $\alpha$ -SMA-positivas (figura 23).

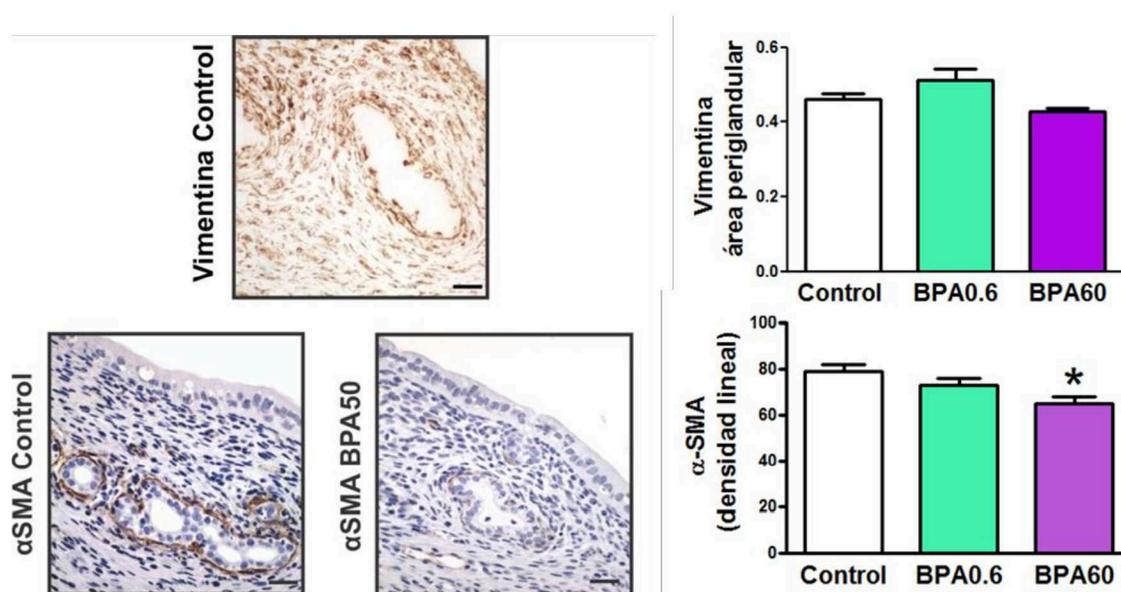


Figura 23: Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre el estroma periglandular del útero de ratas de DPN90. A la izquierda, fotomicrográficas representativas de la inmunomarcación de vimentina y  $\alpha$ -SMA. Barras: 50  $\mu$ m. A la derecha, cuantificación de  $\alpha$ -SMA y vimentina. La inmunomarcación de  $\alpha$ -SMA se expresó como densidad lineal, mientras que la de vimentina se expresó como área periglandular positiva ( $\mu$ m). Cada columna representa la media  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  vs. el grupo control.

### 3.3. Evaluación histológica del tejido uterino en ratas de DPN360 (adultas)

La histología uterina de estos animales mostró características similares a las observadas en las hembras jóvenes de DPN90. Sin embargo, en algunos animales control se observaron zonas del epitelio luminal que presentaban células cúbicas, evidenciándose en consecuencia una reducción en la altura del epitelio

(figura 24 B). También se observaron regiones del epitelio luminal con células anómalas que presentaban núcleos hipocrómicos, bordes citoplasmáticos poco definidos y/o disposición atípica (figura 24 C). Posteriormente cuantificamos estas alteraciones del epitelio luminal, y demostramos que la incidencia de las mismas fue mayor en las hembras que habían sido expuestas a BPA (Control: 12,5% vs. BPA0.6: 58,3% y BPA60: 60%,  $p < 0,05$ ).

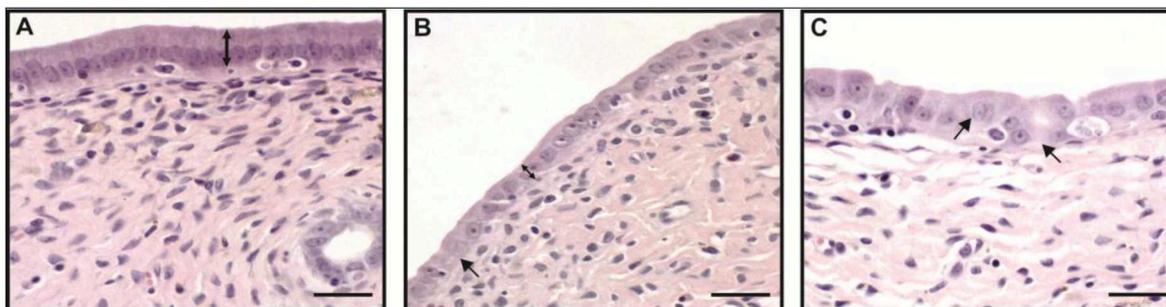


Figura 24: Fotomicrografías que muestran alteraciones en el epitelio luminal observadas en ratas de DPN360. A) Altura epitelial normal de un animal en estro (flecha doble). B) y C) Se observan regiones epiteliales con una reducción en la altura epitelial (flecha doble), y células con núcleos hipocrómicos, bordes citoplasmáticos poco definidos y/o disposición atípica (flechas). Barras: 50  $\mu\text{m}$ .

Además de los cambios encontrados en el epitelio luminal, observamos diferentes tipos morfológicos de glándulas uterinas que fueron clasificados siguiendo los criterios tomados por Gunin y col., (2001) y McLachlan y col., (1980) como: a) **glándulas normales**, caracterizadas por presentar forma redondeada, ovalada o alargada con epitelio cúbico simple (figura 25 A, punta de flecha); b) **glándulas con metaplasia escamosa** (que de aquí en adelante abreviaremos como **GME**), caracterizadas por poseer dos o más capas de células constituyendo una estratificación del epitelio glandular (figura 25 A, flecha); c) **glándulas quísticas**, usualmente de gran tamaño, amplia luz y epitelio plano (figura 25 B); y d) **glándulas con anomalías celulares**, caracterizadas por poseer células cilíndricas, relación núcleo/citoplasma baja, bordes citoplasmáticos pocos definidos, núcleos con la cromatina más laxa y/o disposición atípica de las células (figura 25 C y D).

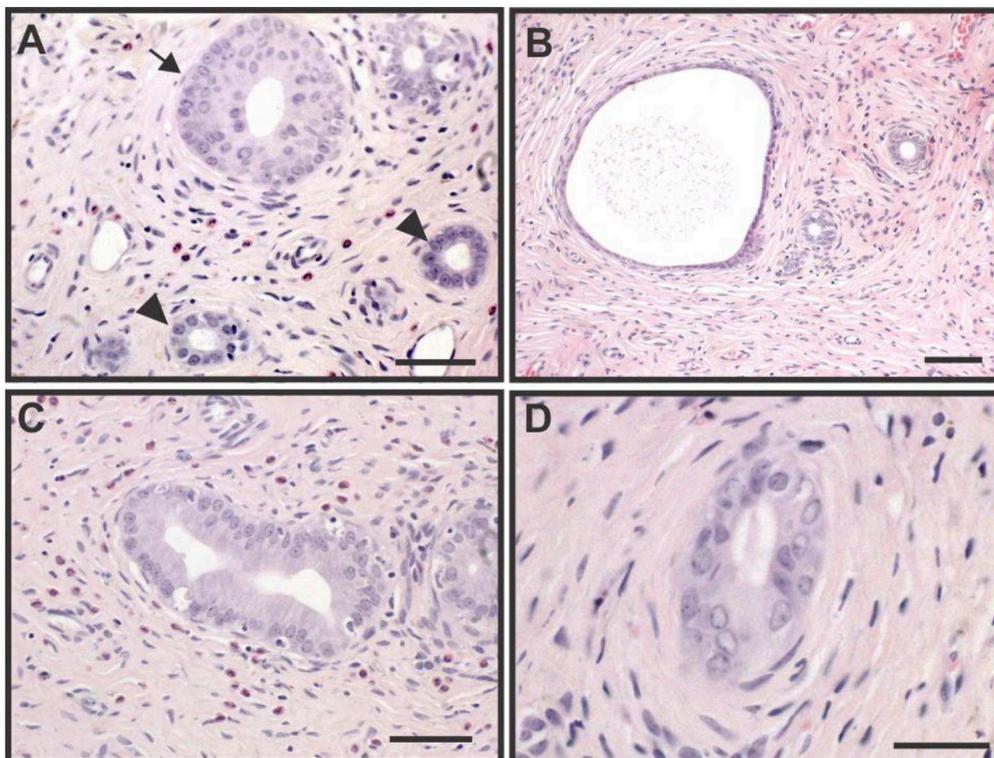


Figura 25: Fotomicrografías representativas de los diferentes tipos de glándulas observadas en ratas de DPN360. A) glándulas normales (punta de flecha) y glándula con metaplasia escamosa (GME, flecha). B) glándula quística. C) y D) Glándulas con anomalías celulares: Células cilíndricas (C), núcleos hipocrómicos, bordes citoplasmáticos poco definidos y disposición atípica de las células (D). Barras: A, C y D 50  $\mu\text{m}$ ; B 75  $\mu\text{m}$ .

Al cuantificar estas alteraciones en los diferentes grupos experimentales, observamos que la incidencia de glándulas con anomalías celulares fue mayor en las hembras expuestas perinatalmente a BPA60 con respecto a las controles (Tabla 17).

Tabla 17: Incidencia de alteraciones glandulares histológicamente diagnosticadas en ratas de DPN360 expuestas perinatalmente a BPA.

	Control	BPA0.6	BPA60
<b>Glándulas con metaplasia escamosa (GME)</b>	9/16 (56.3%)	10/12 (83.3%)	5/10 (50%)
<b>Glándulas con anomalías celulares</b>	5/16 (31.3%)	7/12 (58.3%)	9/10 (90%)*
<b>Glándulas quísticas</b>	10/16 (62.5%)	8/12 (66.7%)	7/10 (70%)

Los resultados son expresados como número de ratas afectadas con una determinada alteración vs. el total de ratas por grupo. Entre paréntesis se indica el porcentaje de animales que presentó cada lesión glandular. \*,  $p < 0,05$  comparado con el grupo control.

### **3.4. Caracterización inmunofenotípica de la histología uterina**

A continuación nos interesó conocer el fenotipo de estos epitelios. La caracterización de las células del epitelio luminal y glandular se realizó mediante ensayos de IHQ de los marcadores descritos en la sección 4.3.2 de M&M.

En DPN360, tanto el epitelio luminal como todos los tipos glandulares descritos en el útero, excepto las GME, presentaron inmunomarcación positiva para RE $\alpha$ , CK8 (marcador de células epiteliales luminales) y negativa para RP, pan-CK basal (CK34 $\beta$ E12), y p63 (figura 26). Las GME presentaron un patrón diferente ya que, además de expresar RE $\alpha$  y CK8, fueron positivas para CK34 $\beta$ E12 y además mostraron una alta expresión de p63 en más de un estrato celular. La inmunodetección de CK34 $\beta$ E12 se correspondió con las capas de células más basales de las GME, disminuyendo la marcación hacia las capas más luminales. La exposición a BPA no afectó el patrón de expresión de las moléculas evaluadas.

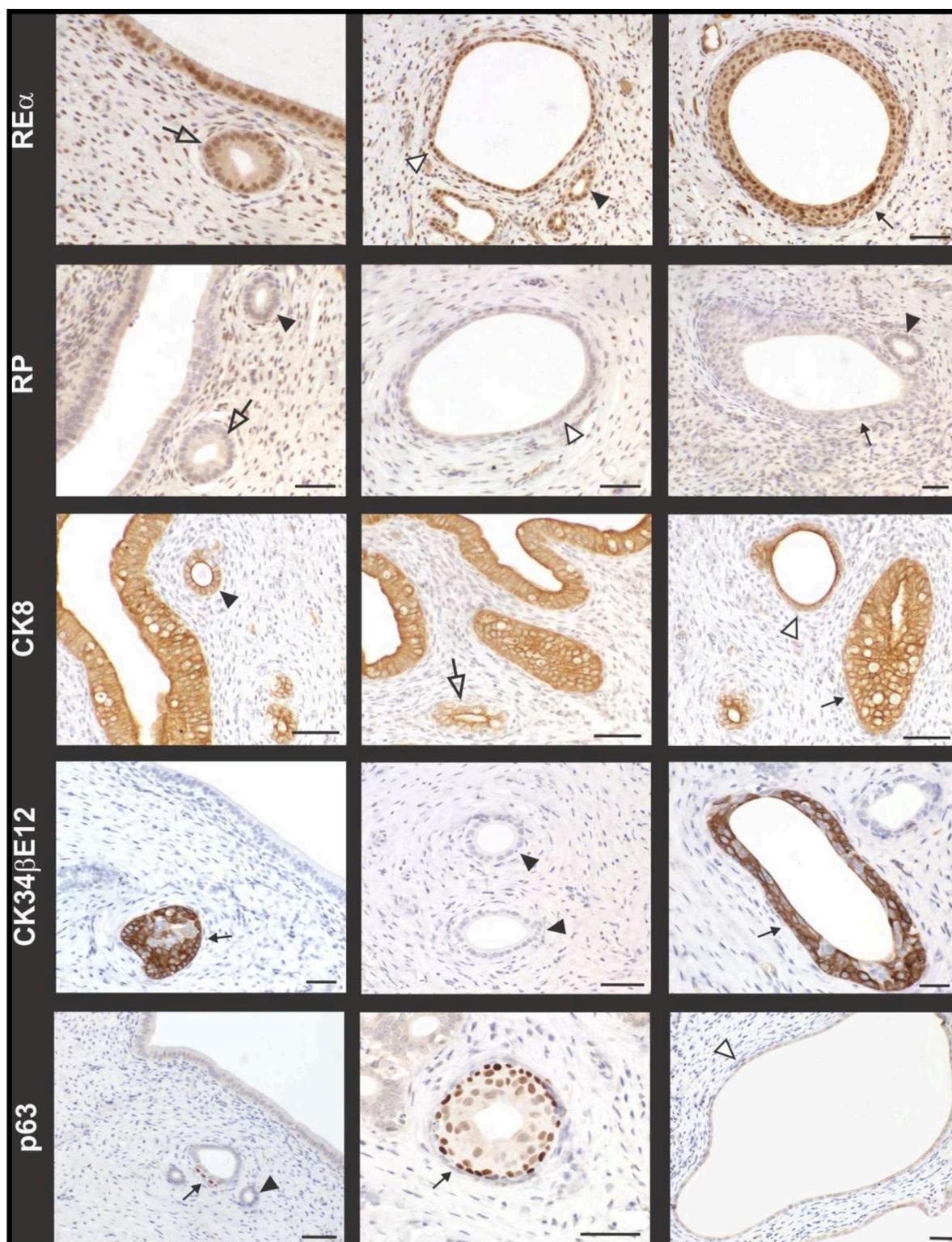


Figura 26: Caracterización inmunofenotípica del epitelio luminal y glandular del útero de ratas de DPN360. Fotomicrografías que muestran la inmunodetección de RE $\alpha$ , RP, CK8, pan-CK basal (CK34 $\beta$ E12) y p63 en el epitelio luminal y en los diferentes tipos de glándulas uterinas de ratas de DPN360. Glándulas normales (punta de flecha negra), glándulas quísticas (punta de flecha blanca),

glándulas con anomalías celulares (flecha blanca) y glándulas con metaplasia escamosa (GME, flecha negra). Barra: 50  $\mu$ m.

### 3.4.1. Co-localización de proteínas en las GME

Seguidamente nos propusimos caracterizar las células que fueron p63 positivas en las GME. Para ello realizamos ensayos dobles de IHQ: p63/CK34 $\beta$ E12 y p63/CK8 (figura 27). Observamos que no solo las células CK34 $\beta$ E12-positivas expresaron p63 (figura 27 B), sino que algunas células que fueron positivas para la CK8 también expresaron p63 (figura 27 B y D, flechas), demostrando una alteración en su fenotipo.

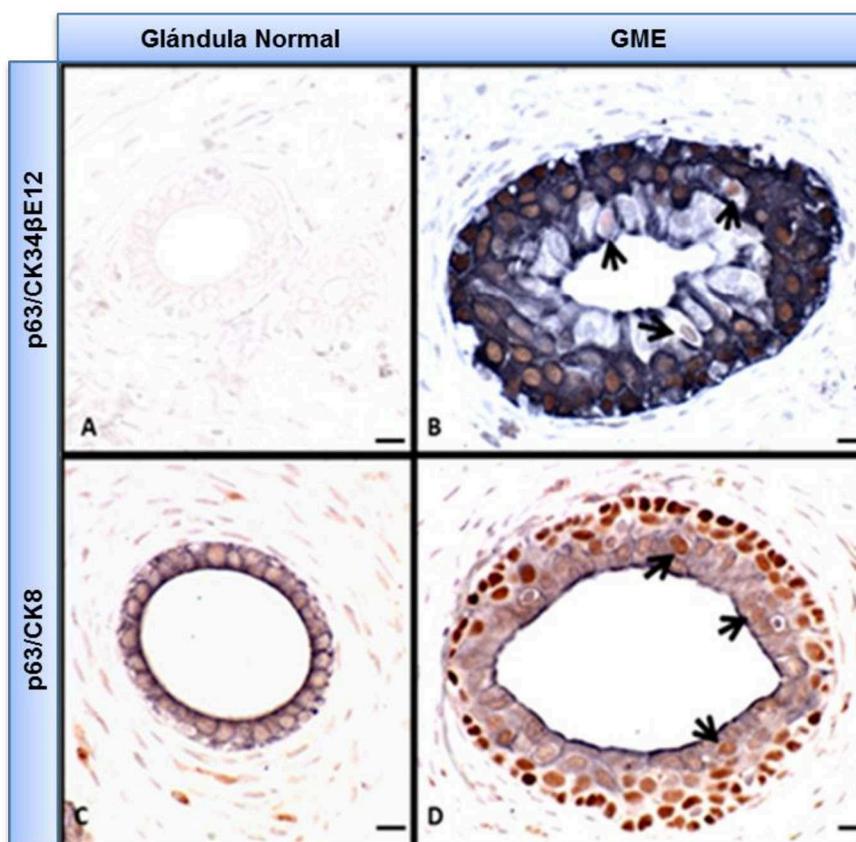


Figura 27: Caracterización de las células p63 positivas en glándulas con metaplasia escamosa (GME), en el útero de ratas de DPN360. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica doble: p63/CK34 $\beta$ E12 y p63/CK8 en glándulas normales (A, C) y en GME (B, D). Las flechas señalan células CK8 positivas expresando p63. Las imágenes fueron obtenidas a partir de ensayos sin contracoloración. Barras: 50 $\mu$ m.

---

## CAPÍTULO II

### ***Respuesta uterina al tratamiento crónico con E2 en ratas adultas (DPN460) expuestas perinatalmente a BPA***

#### **4. Niveles séricos de E2**

Las hembras OVX sin ningún tratamiento mostraron niveles de E2 por debajo del límite de detección del ensayo. No se observaron diferencias en los niveles de E2 entre los grupos experimentales (Control: 19,22 pg/ml  $\pm$  4,2; BPA0.6: 19,3 pg/ml  $\pm$  9,8; BPA60: 11,3 pg/ml  $\pm$  7,03,  $p > 0.05$ ).

#### **5. Evaluación histológica del tejido uterino en ratas de DPN460-E2**

##### **5.1. Histomorfología uterina de ratas Control+E2**

El análisis histológico del tejido uterino de las ratas control de edad avanzada tratadas con E2 (Control+E2) mostró la presencia de las mismas alteraciones glandulares que las observadas en DPN360 (es decir, GME, glándulas con anomalías celulares y glándulas quísticas). Además, en estas hembras de DPN460-E2 se observó la presencia de **glándulas con glándulas hijas** (que serán abreviadas como **GGH**), clasificadas como tales de acuerdo al criterio tomado por Gunin y col., (2001). Estas estructuras tienen varias formas (redondas, elongadas, tortuosas, estrelladas) y tamaños. Se observan glándulas dentro del epitelio de la glándula madre, o bien en la superficie externa de la glándula madre (como glándulas en ciernes) (figura 28 A). También se observaron glándulas formando conglomerados que, según se ha reportado (Gunin y col., 2001), podrían representar un estadio más avanzado de las GGH, que proliferan y se separan de la glándula madre quedando agrupadas, con muy poco estroma entre ellas (figura 28 B). Es interesante remarcar que no se observaron GGH en las hembras de DPN360.

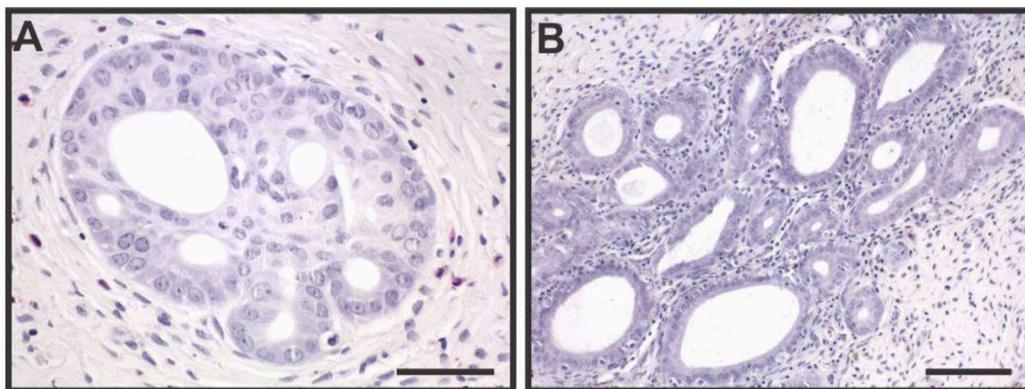


Figura 28: Fotomicrográficas que muestran alteraciones glandulares en ratas de DPN460-E2. Se observan glándulas con glándulas hijas (GGH, A) y glándulas formando conglomerados (B). Barras: (A) 50  $\mu\text{m}$  y (B) 75  $\mu\text{m}$ .

Para poder dilucidar si la presencia de GGH observadas en el útero de ratas tratadas con E2 se debía al tratamiento con E2, a la edad avanzada de los animales, o a una combinación de ambas variables, diseñamos 2 experimentos complementarios, descritos en la sección 1.2 de M&M. Así, para investigar si las GGH se debieron específicamente al tratamiento crónico con E2, evaluamos la histología uterina de animales jóvenes de DPN90 tratados con E2 durante 3 meses (**DPN190-E2**). En estos animales no observamos GGH ni conglomerados de glándulas. Por otro lado, para investigar si la edad avanzada de las hembras inducía la aparición de este tipo de glándulas, se analizaron muestras de útero de ratas de **DPN460**, es decir, de la misma edad que las de los grupos de DPN460-E2, pero esta vez sin ningún tipo de tratamiento. El análisis de la histología en esas hembras mostró la presencia de GGH, con una incidencia similar a la observada en las ratas de DPN460-E2 (Control+E2: 14,3% vs. DPN460: 20%).

## 5.2. Histomorfología uterina de ratas BPA+E2

En respuesta a E2, las hembras que habían sido expuestas a BPA (grupos BPA+E2) presentaron los mismos tipos morfológicos de glándulas uterinas que el grupo control+E2, sin diferencias en el inmunofenotipo. Sin embargo, la incidencia de anomalías glandulares en el tejido uterino aumentó significativamente en los animales de BPA+E2 (Tabla 18). Específicamente, en el grupo de BPA60+E2

se observó mayor incidencia de glándulas con anomalías celulares mientras que la incidencia de GGH fue mayor en las ratas de BPA0.6+E2 en comparación con el grupo control+E2 (Tabla 18).

Tabla 18: Incidencia de alteraciones glandulares histológicamente diagnosticadas en ratas de DPN460-E2 expuestas perinatalmente a BPA.

	<b>Control+E2</b>	<b>BPA0.6+E2</b>	<b>BPA60+E2</b>
<b><i>Glándulas con metaplasia escamosa (GME)</i></b>	10/14 (71.4%)	9/9 (100%)	8/9 (88.9%)
<b><i>Glándulas con anomalías celulares</i></b>	9/14 (64.3%)	8/9 (88.9%)	9/9 (100%)*
<b><i>Glándulas quísticas</i></b>	9/14 (64.3%)	8/9 (88.9%)	8/9 (88.9%)
<b><i>Glándulas con glándulas hijas</i></b>	2/14 (14.3%)	6/9 (66.7%)*	3/9 (33.3%)

Los resultados son expresados como número de ratas afectadas con una determinada alteración vs. el total de ratas por grupo. Entre paréntesis se indica el porcentaje de animales que presentó cada lesión glandular. \*,  $p < 0,05$  comparado con el grupo control.

Como puede observarse en la tabla 18, el porcentaje de ratas que exhibió GME fue muy elevado en todos los grupos experimentales sin observarse diferencias significativas. Por lo tanto, decidimos evaluar la densidad de volumen de estas glándulas (como se describió en la sección 5.2.2 de M&M) por cada animal. Los resultados de este análisis mostraron un aumento significativo de la densidad de GME en el grupo de BPA60+E2 comparado con el grupo control+E2 (figura 29).

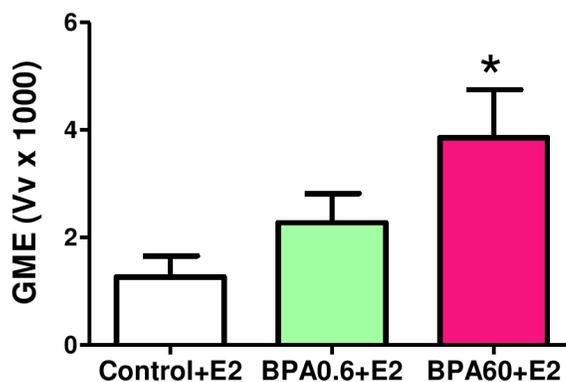


Figura 29: Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la densidad de glándulas con metaplasia escamosa (GME) en el útero de ratas de DPN460 tratadas con E2. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM de la densidad de volumen (Vv)  $\times$  1000. \*,  $p < 0,05$  vs. el grupo control+E2.

## 6. Expresión de p63 y sus isoformas TA y $\Delta$ N

Como se describió anteriormente, las GME presentaron un inmunofenotipo diferente al del resto de glándulas uterinas, ya que expresaron p63, un marcador que se expresa en células basales de epitelios estratificados (Koster y col., 2004; Kurita y col., 2005). Para estudiar si la expresión de p63 en las GME se producía a expensas de alguna isoforma en particular de esta proteína, se evaluaron por PCR en tiempo real las isoformas TA y  $\Delta$ N, que se generan a partir del uso de promotores alternativos, y que han sido diferencialmente implicadas en los procesos de iniciación y mantenimiento de epitelios estratificados (Koster y col., 2004). Nuestros resultados demostraron que ambas isoformas se expresaron en el útero de las hembras de DPN460-E2. Sin embargo, la expresión de TA fue significativamente menor en las ratas del grupo de BPA0.6+E2 y mayor en las del grupo de BPA60+E2 (figura 30 A).

Posteriormente decidimos estudiar si los cambios en los niveles de ARNm de TA se reflejaban en cambios en la expresión de la proteína. Para ello, se cuantificó por IHQ la expresión de la proteína p63 total. Teniendo en cuenta que p63 solo se expresa en las GME, la cuantificación se realizó en estas glándulas determinando el porcentaje de células p63-positivas. Los resultados mostraron que el porcentaje de células p63-positivas por cada GME fue significativamente menor en las

hembras del grupo de BPA0.6+E2 en comparación con el control+E2 (control+E2: 63,8% vs. BPA0.6: 50,9%,  $p < 0,05$ ) (figura 30 B).

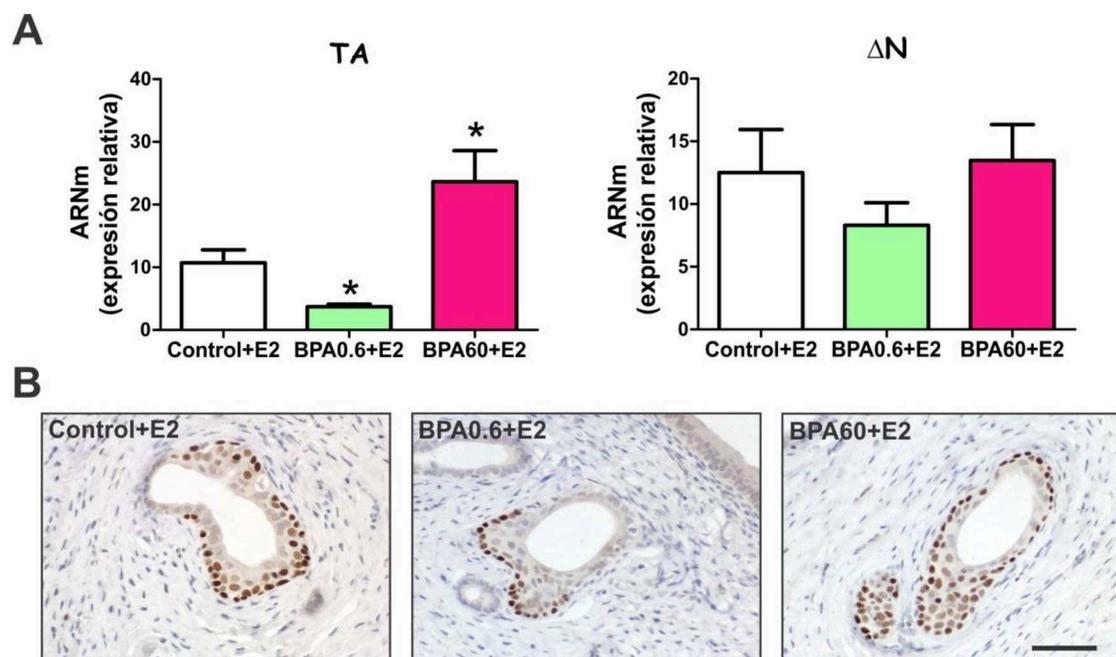


Figura 30: Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de p63 en el útero de ratas de DPN460 tratadas con E2. A) Expresión relativa del ARNm de las isoformas TA y ΔN evaluadas mediante PCR en tiempo real. Las muestras fueron normalizadas con la expresión del gen L19 y las cantidades relativas del ARNm fueron calculadas mediante el método de la curva estándar relativa. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  vs. el grupo control+E2. B) Expresión de la proteína p63 en las glándulas con metaplasia escamosa (GME) de los diferentes grupos experimentales. Barra: 50  $\mu$ m.

## 7. Desarrollo de anticuerpos policlonales para la detección de Wnt7a y Wnt5a por IHQ

Teniendo en cuenta el rol fundamental de la vía de señalización de la familia de moléculas Wnt en el útero, y específicamente las proteínas Wnt7a y Wnt5a en el desarrollo y funcionalidad de las glándulas uterinas, nos propusimos estudiar la expresión de estas moléculas en los distintos tipos de glándulas observadas en las hembras de DPN460-E2.

### 7.1. Diseño y obtención de antígenos específicos

Mediante el estudio bioinformático de la secuencia aminoacídica reportada para Wnt7a y Wnt5a, se detectó una región de alta antigenicidad teórica (en la figura 31 se muestra el análisis de la secuencia de Wnt7a; el procedimiento para seleccionar la secuencia antigénica de Wnt5a fue el mismo). Teniendo en cuenta esta región se seleccionó, en la secuencia nucleotídica correspondiente de cada proteína, el fragmento a ser amplificado por PCR para generar los antígenos. Dicho fragmento abarcó la región comprendida entre los aminoácidos 194–283 de la secuencia de Wnt7a de rata (Nro. Genbank: EDL91365.1) (figura 31) y la región comprendida entre los aminoácidos 207-300 (Nro. Genbank: AAV69750) de la secuencia de Wnt5a de rata. El fragmento seleccionado para cada molécula fue traducido y comparado *in silico* con el resto del genoma de la rata utilizando la herramienta BLAST protein-protein del sitio web del National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), sin observarse alineamientos significativos con otras proteínas de rata.

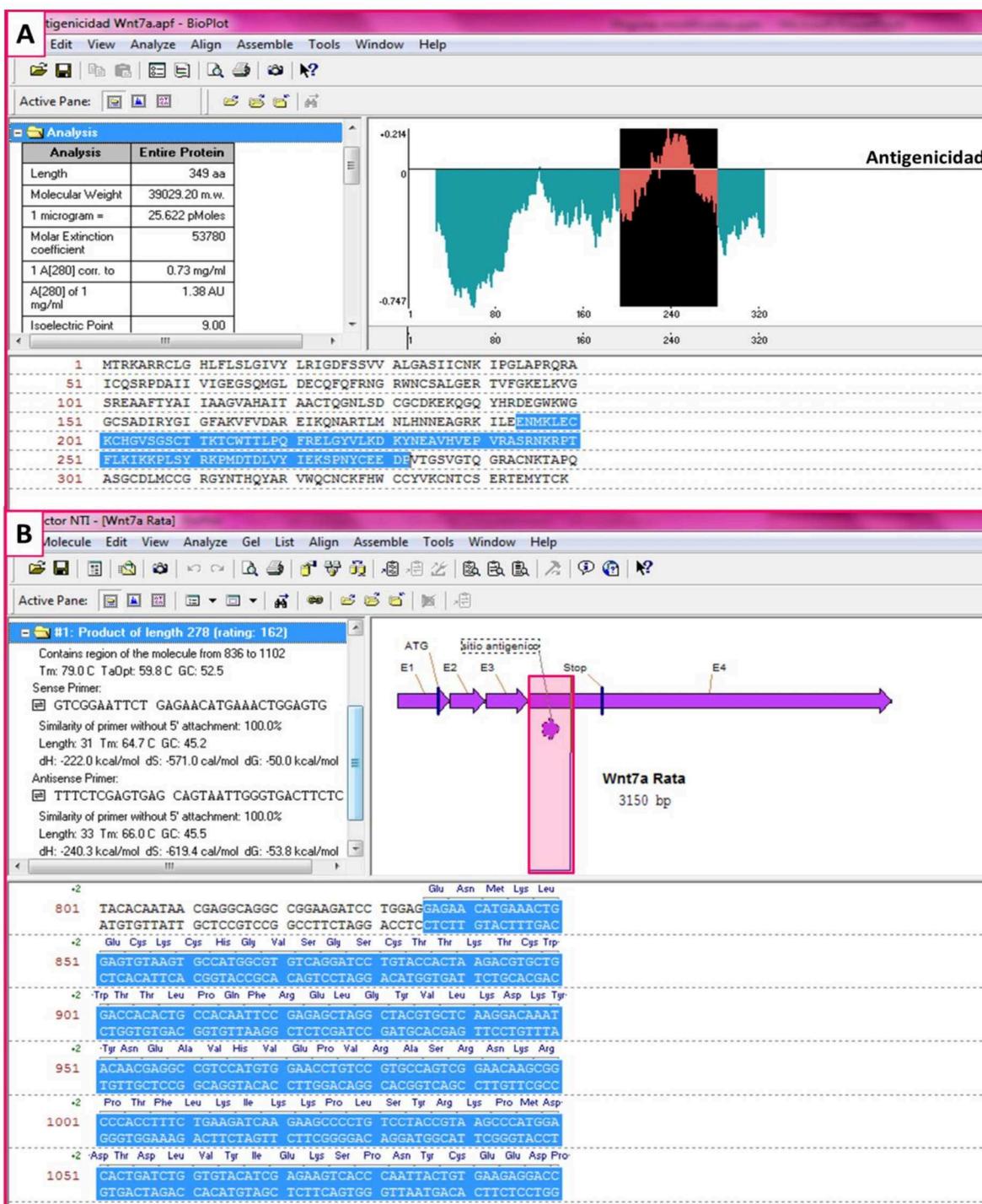


Figura 31: Selección del fragmento de la secuencia de Wnt7a para ser utilizado como antígeno en la producción de un anticuerpo policlonal específico. A) Análisis de la antigenicidad teórica de la proteína Wnt7a. En negro y rojo se muestra la antigenicidad correspondiente al polipéptido codificado por la secuencia seleccionada. B) Salida del programa informático Vector NTI. Se observa la secuencia codificante completa del gen de Wnt7a de rata (flechas violetas indican los distintos exones), y en un recuadro rosado se marca la secuencia utilizada para generar el antígeno por PCR. La flecha dentro del recuadro indica la ubicación del sitio antigénico teórico de Wnt7a.

Siguiendo la estrategia de clonado direccional detallada en la sección 5.4.1.1 de M&M, se obtuvieron los plásmidos recombinantes pGEX-4T-3/Wnt7a y pGEX-4T-3/Wnt5a, los cuales fueron expresados en bacterias *E. coli JM109* y las proteínas de fusión GST-Wnt7a y GST-Wnt5a resultantes fueron purificadas mediante columnas cromatográficas GSTrap™. Las fracciones obtenidas durante la elución se separaron mediante SDS-PAGE y el gel fue teñido con Coomassie Blue (figura 32).

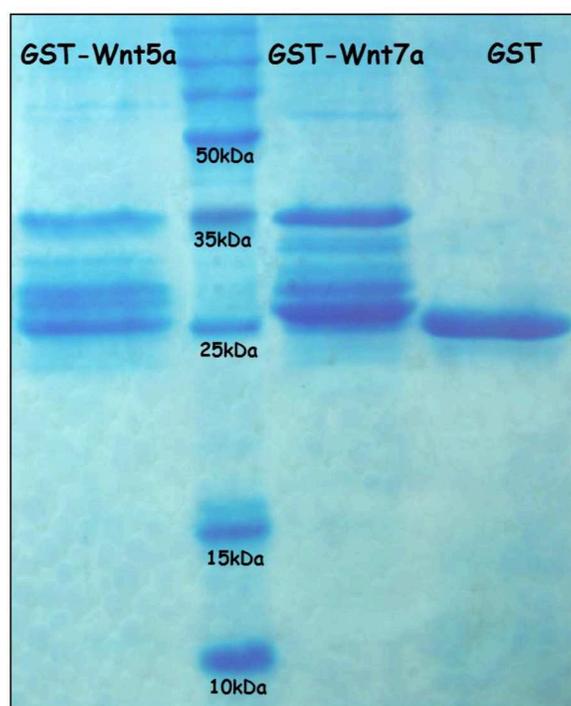


Figura 32: Purificación de los antígenos GST-Wnt5a y GST-Wnt7a mediante cromatografía de afinidad. Gel de poliacrilamida teñido con Coomassie Blue. Se observan fracciones de una cromatografía realizada con GSTrap. De izquierda a derecha: GST-Wnt5a purificada, marcador de peso molecular, GST-Wnt7a purificada, GST purificada.

En la figura 32 se puede observar que las proteínas recombinantes purificadas estuvieron compuestas por 3 péptidos mayoritarios. De acuerdo al peso molecular de las mismas, la banda de menor peso correspondería a GST, la de mayor peso a GST-Wnt5a o GST-Wnt7a (aproximadamente 35 kDa) y la banda

de peso intermedio podría deberse a una liberación prematura del complejo de traducción del plásmido, resultando en una proteína de peso intermedio conteniendo el extremo amino terminal de Wnt5a y Wnt7a respectivamente.

## **7.2. Generación y caracterización de los anticuerpos policlonales**

Dos conejos fueron inoculados con los antígenos GST-Wnt7a y GST-Wnt5a siguiendo el protocolo descrito en M&M (sección 5.4.2). El suero se purificó por doble cromatografía de afinidad, y la caracterización de los anticuerpos específicos anti-Wnt7a y anti-Wnt5a se realizó mediante técnicas de Western blot e IHQ. En los ensayos de Western blot se observó una banda específica de 39 kDa para la proteína Wnt7a en extractos protéicos de útero y testículo de rata, mientras que para Wnt5a se observó una banda específica de 42 kDa en extracto protéico de útero (figura 33 A). A continuación, para evaluar la inmunoreactividad en tejidos fijados en parafina, se realizaron ensayos de IHQ en secciones de testículo y útero (figura 33 B y C). Se definió el patrón de expresión de ambas proteínas en el tejido uterino. En muestras de animales control+E2, la proteína Wnt7a se expresó en el núcleo y citoplasma del epitelio glandular y luminal del útero, mientras que Wnt5a presentó expresión citoplasmática principalmente, mostrando una marcación débil en el núcleo de las células del epitelio glandular y luminal. El estroma fue mayoritariamente negativo para ambas proteínas (figura 33 C). No se detectó marcación específica cuando el anticuerpo primario (anti-Wnt7a o anti-Wnt5a) fue preincubado con el péptido utilizado como inmunógeno (figura 33 D).

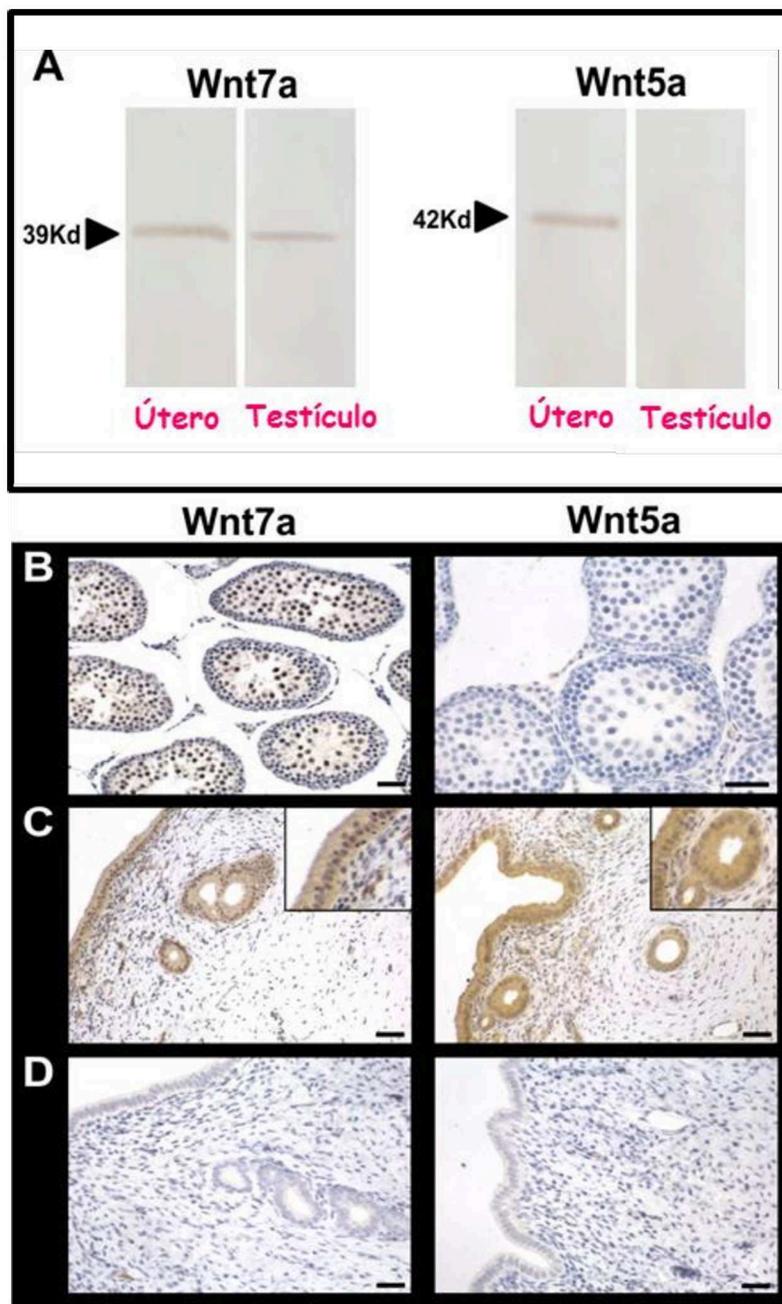


Figura 33: Caracterización de los anticuerpos anti-Wnt7a y anti-Wnt5a en el útero y testículo de rata. (A) En los ensayos de Western blot se detectó la proteína Wnt7a (39 kDa) en ambos tejidos, y la proteína Wnt5a (42 kDa) solo en el tejido uterino. La inmunorreactividad de los anticuerpos se evaluó por inmunohistoquímica en secciones de tejido de testículo (B) y útero (C). (C) Se observó marcación positiva para Wnt7a y Wnt5a en las células glandulares y luminales del tejido uterino; las inserciones a mayor aumento muestran que la expresión de Wnt7a fue nuclear y citoplasmática, mientras que la expresión de Wnt5a fue principalmente citoplasmática. Cuando el anticuerpo primario fue preadsorbido con el antígeno usado como inmunógeno no se observó marcación específica (D). Barras: 50  $\mu$ m.

### 7.3. Expresión de Wnt7a y Wnt5a en glándulas uterinas

La expresión de estas proteínas se evaluó por IHQ en las glándulas normales, en las GME y en las GGH. La expresión de Wnt7a fue menor en las GME en comparación con las glándulas normales, independientemente del grupo experimental (figura 34). Por su parte, la expresión de Wnt5a no mostró diferencias entre los distintos tipos morfológicos de glándulas uterinas (figura 34).

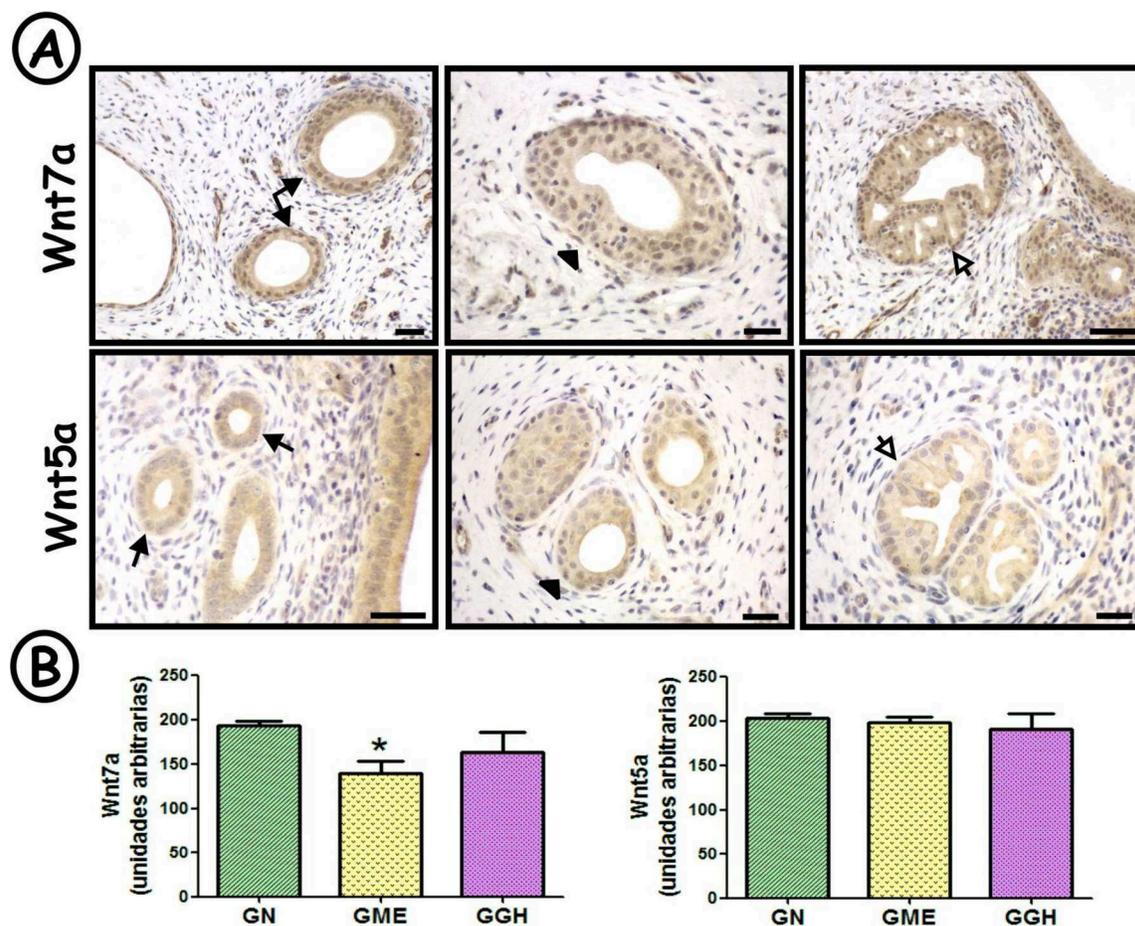


Figura 34: Expresión de Wnt7a y Wnt5a en las glándulas uterinas de ratas de DPN460-E2. A) Las fotomicrografías muestran la detección inmunohistoquímica de Wnt7a y Wnt5a en glándulas normales (GN, flecha), glándulas con metaplasia escamosa (GME, punta de flecha), y glándulas con glándulas hijas (GGH, flecha blanca). Las imágenes fueron obtenidas a partir de ensayos contracoloreados con hematoxilina de Mayer. Barras: 50  $\mu$ m. B) Cuantificación de Wnt7a y Wnt5a en las GN, GME y GGH, evaluadas como densidad óptica integrada (DOI). Los resultados se expresan como unidades arbitrarias. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  vs. las GN.

Interesantemente, además de que las GME presentaron menor expresión de Wnt7a que las glándulas normales, observamos que la expresión de Wnt7a en las GME del grupo de BPA60+E2 fue aún menor que las GME del grupo control+E2 (figura 35).

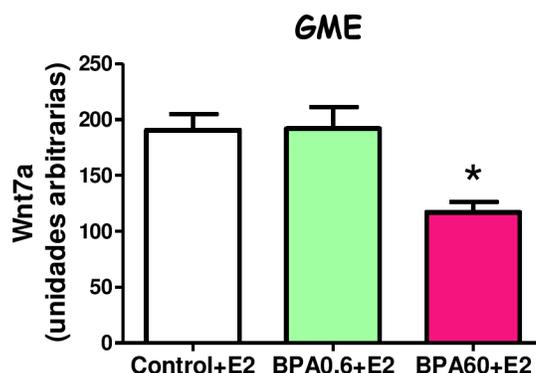


Figura 35: Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de Wnt7a en las glándulas con metaplasia escamosa (GME) de ratas de DPN460 tratadas con E2. La inmunomarcación positiva se cuantificó calculando la densidad óptica integrada (DOI). Los resultados se expresan como unidades arbitrarias. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  vs. el grupo control+E2.

## 8. Expresión de $\beta$ -catenina en glándulas uterinas

Posteriormente decidimos evaluar la expresión de  $\beta$ -catenina, principal mediador intercelular de la vía canónica de Wnt (Clevers 2006), en todos los animales de DPN460-E2. Esta proteína se expresó en células del epitelio glandular y luminal del útero, y su localización fue restringida principalmente a la membrana plasmática y al citoplasma celular con menor intensidad (figura 36). Posteriormente se cuantificó la expresión de  $\beta$ -catenina en las glándulas normales, en las GME y en las GGH, y no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales ( $p > 0,05$ ) (figura 36).



Figura 36: Inmunomarcación de  $\beta$ -catenina en las glándulas uterinas de hembras de DPN460-E2. Fotomicrografías representativas de la expresión de  $\beta$ -catenina en los distintos grupos experimentales, obtenidas a partir de ensayos contracolorados con hematoxilina de Mayer. Barra: 50  $\mu$ m.

### 9. Expresión de RP en glándulas uterinas

El RP es un marcador importante de diferenciación epitelial uterina regulado por E<sub>2</sub> (Franco y col., 2012; Patel y col., 2015). Por lo tanto, decidimos evaluar su expresión por IHQ en las glándulas normales, en las GME y en las GGH. La expresión de RP fue menor en las GME en comparación con las glándulas normales, independientemente del grupo experimental (glándulas normales:  $196,1 \pm 2,35$ ; GME:  $159,3 \pm 15,39$ ,  $p < 0,05$ ), mientras que no se observaron cambios en las GGH ( $187,0 \pm 5,482$ ). La exposición a BPA no modificó el patrón de expresión de RP en los diferentes tipos de glándulas.

### 10. Expresión de RE $\alpha$ , RE $\beta$ y RP en el estroma uterino

Como se ha mencionado en la introducción de esta tesis (sección 2.3), las hormonas esteroides ováricas regulan la proliferación y diferenciación del epitelio uterino a través de la unión a sus receptores específicos localizados en el estroma. Para evaluar si las alteraciones observadas en las glándulas uterinas estuvieron asociadas con cambios en la expresión de los receptores hormonales, estudiamos la expresión de RE $\alpha$ , RE $\beta$  y RP en el estroma uterino de las hembras de DPN460 tratadas con E<sub>2</sub>. La expresión de RP disminuyó en ambos grupos de BPA+E<sub>2</sub>, mientras que la expresión de RE $\alpha$  fue menor en las ratas expuestas a BPA60+E<sub>2</sub> en comparación con las del grupo control+E<sub>2</sub> (figura 37). En relación a

la expresión de RE $\beta$ , no se observaron diferencias entre los grupos experimentales (figura 37).

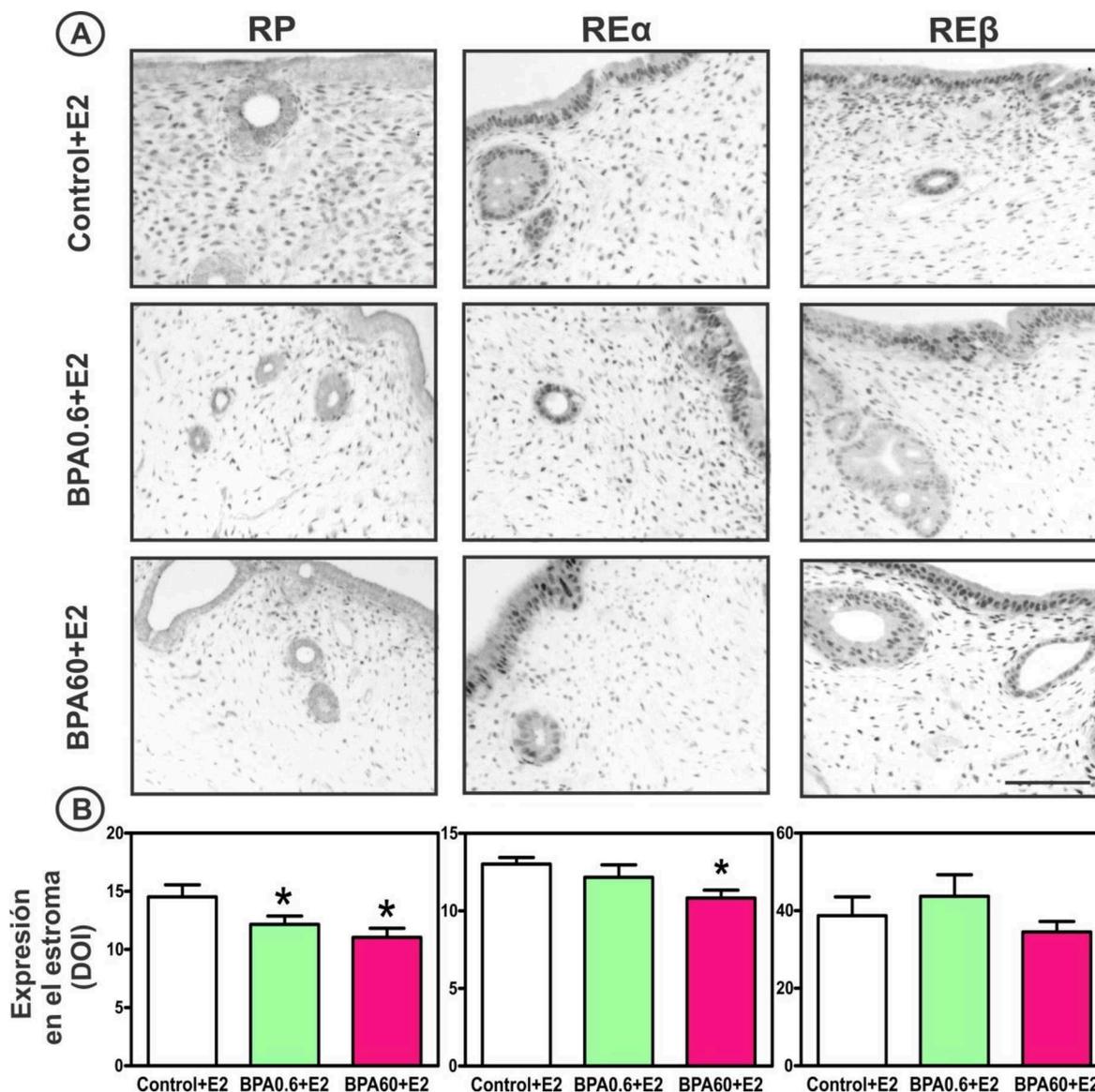


Figura 37: Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión inmunohistoquímica de receptores hormonales en el tejido uterino de ratas de DPN460 tratadas con E2. (A) Las fotomicrografías muestran la detección de RP, RE $\alpha$  y RE $\beta$  en el estroma uterino. Estas imágenes se obtuvieron a partir de ensayos sin contracoloración. Barra: 50  $\mu$ m. (B) Cuantificación de receptores hormonales evaluados como densidad óptica integrada (DOI). Los resultados se expresan como unidades arbitrarias. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  vs. el grupo control+E2.

---

## 11. Expresión del ARNm de RE $\alpha$ y sus promotores transcripcionales OS, ON, O, OT y E1

Para estudiar con más detalle la respuesta uterina al E2 a través del RE $\alpha$ , evaluamos si la disminución del RE $\alpha$  observada en el estroma uterino estuvo asociada con cambios a nivel de la transcripción del ARNm. Se analizaron los niveles del ARNm de RE $\alpha$  mediante PCR en tiempo real. Las ratas del grupo de BPA60+E2 mostraron una disminución en la expresión de RE $\alpha$  (figura 38). A continuación, para determinar si esa disminución se asoció con cambios en la actividad relativa de los promotores transcripcionales del RE $\alpha$ , se estudiaron los niveles de expresión de los transcritos con exones 5' no traducibles, asociados a los distintos promotores descritos del gen del RE $\alpha$  de la rata, en los grupos control+E2 y BPA60+E2 (ya que este grupo de BPA+E2 fue el que presentó disminución en el ARNm total y en la proteína del RE $\alpha$ ). Los resultados demostraron que la transcripción del RE $\alpha$  en el útero de ratas de DPN460 tratadas con E2 fue regulada por los promotores OS, O, OT y E1 independientemente del grupo experimental. Los niveles de transcritos conteniendo el exón ON no pudieron ser detectados por PCR en esta condición experimental. Las hembras expuestas a BPA60+E2 presentaron una disminución en la expresión de los transcritos RE $\alpha$ -O y RE $\alpha$ -OT en comparación con el grupo control+E2 (figura 38).

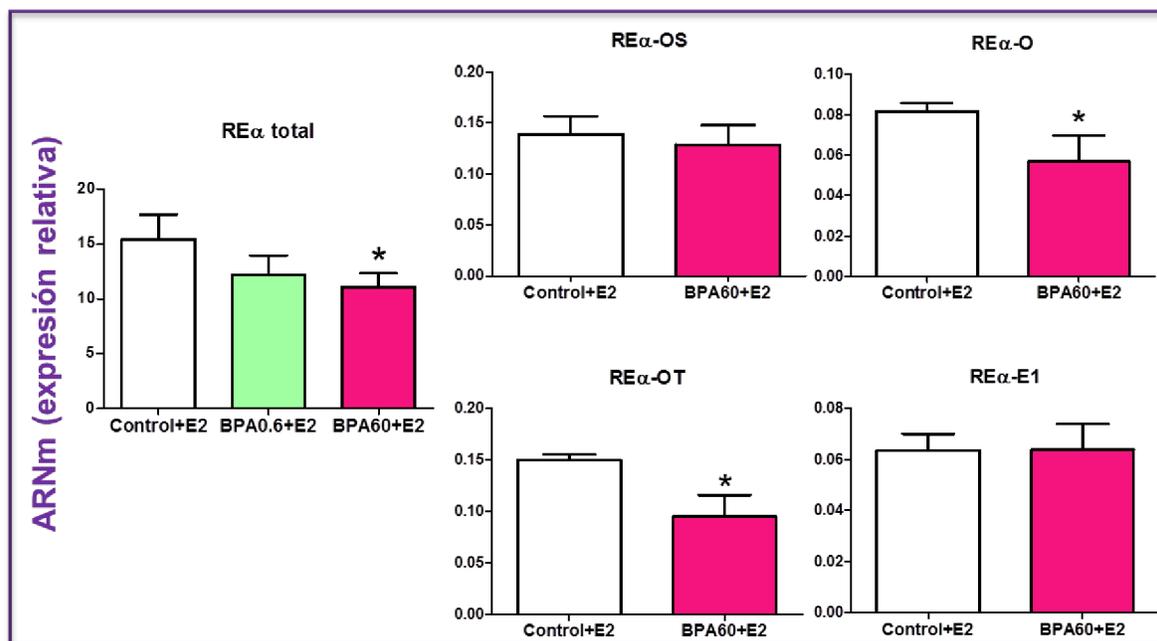


Figura 38: Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión del ARNm del RE $\alpha$  en el útero de ratas de DPN460 tratadas con E2. Los niveles de expresión del ARNm total del RE $\alpha$  y de los exones 5' no traducibles del gen del RE $\alpha$  fueron evaluados por PCR en tiempo real. Las muestras se normalizaron con la expresión del gen L19 y las cantidades relativas de ARNm se calcularon utilizando el método de la curva estándar relativa. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  vs. el grupo control+E2.

## 12. Expresión de coactivadores de la acción de los receptores de hormonas esteroides: SRC1 y SRC3 en el estroma uterino

Como se describió en la introducción de esta Tesis (sección 2.4.1), los coactivadores de la acción de los receptores hormonales cooperan con los mismos promoviendo la activación transcripcional en las regiones regulatorias de los genes diana de los receptores. Para obtener más información sobre los mecanismos asociados a las alteraciones observadas en el útero de ratas de los grupos de BPA+E2, estudiamos la expresión de dos coactivadores de receptores de hormonas esteroides, SRC1 y SRC3, en el estroma uterino mediante ensayos de IHQ. Los resultados mostraron que la expresión de SRC1 y SRC3 disminuyó en ambos grupos de BPA+E2 (figura 39).

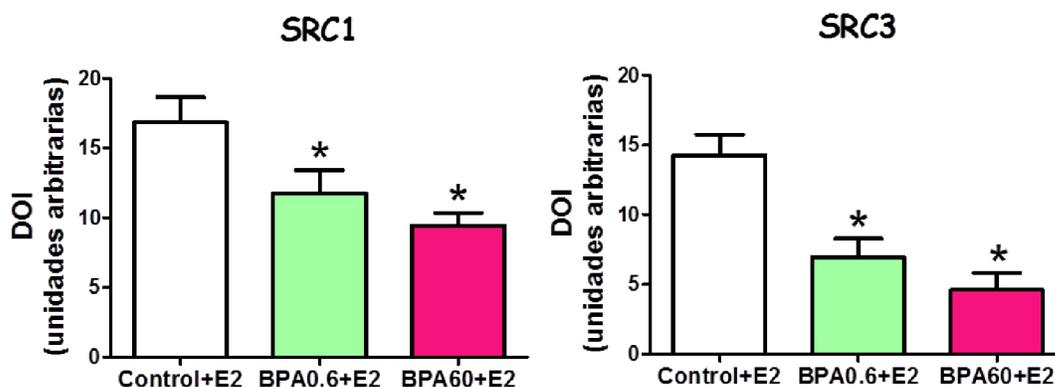


Figura 39: Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de SRC1 y SRC3 en el tejido uterino de ratas de DPN460 tratadas con E2. La inmunomarcación de SRC1 y SRC3 se cuantificó evaluando la densidad óptica integrada (DOI) en el estroma del útero. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  vs. el grupo control+E2.

### 13. Expresión del ARNm de IGF-I e IGF-IR

Como se ha mencionado en la Introducción de esta tesis (sección 2.3), el E2 (a través del RE $\alpha$  localizado en el estroma) promueve la expresión de IGF-I que actúa en forma paracrina sobre el epitelio uterino para inducir proliferación. En este punto, nos propusimos estudiar si la vía de señalización del IGF-I estuvo implicada en los efectos inducidos por E2 sobre el epitelio glandular. Se evaluó la expresión del IGF-I y su receptor, IGF-IR, por PCR en tiempo real. La expresión del ARNm de IGF-I e IGF-IR fue menor en las ratas de BPA0.6+E2 (figura 40).

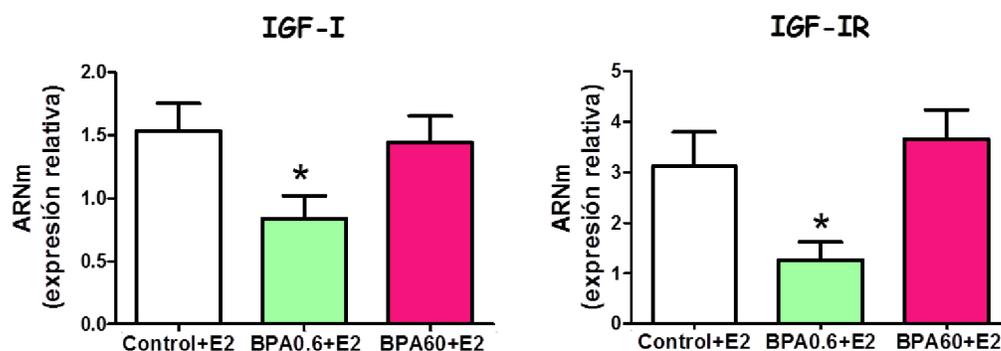


Figura 40: Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de IGF-I e IGF-IR en el útero de ratas de DPN460 tratadas con E2. Los niveles relativos del ARNm de IGF-I e IGF-IR se midieron por PCR en tiempo real. Las muestras fueron normalizadas con la expresión del gen L19

y las cantidades relativas del ARNm fueron calculadas mediante el método de la curva estándar relativa. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  vs. el grupo control+E2.

#### 14. Expresión del ARNm de enzimas involucradas en mecanismos epigenéticos

La alteración en la expresión de moléculas Eg-sensibles observada en ratas expuestas a BPA+E2 podría estar influenciada por alteraciones en distintos mecanismos epigenéticos. Para evaluar la expresión de enzimas involucradas en algunos de estos mecanismos como metilación del ADN y metilación/acetilación de histonas, se midieron los niveles del ARNm de las Dnmt3a y Dnmt3b, de la histona metiltransferasa EZH-2, y de las Hdac-1, -2 y -3 en el útero de las hembras de DPN460-E2. En el grupo de BPA60+E2 aumentó la expresión de Dnmt3a y Dnmt3b, mientras que la expresión de EZH-2 y Hdac-1 fue mayor en el grupo de BPA0.6+E2 (figura 41).

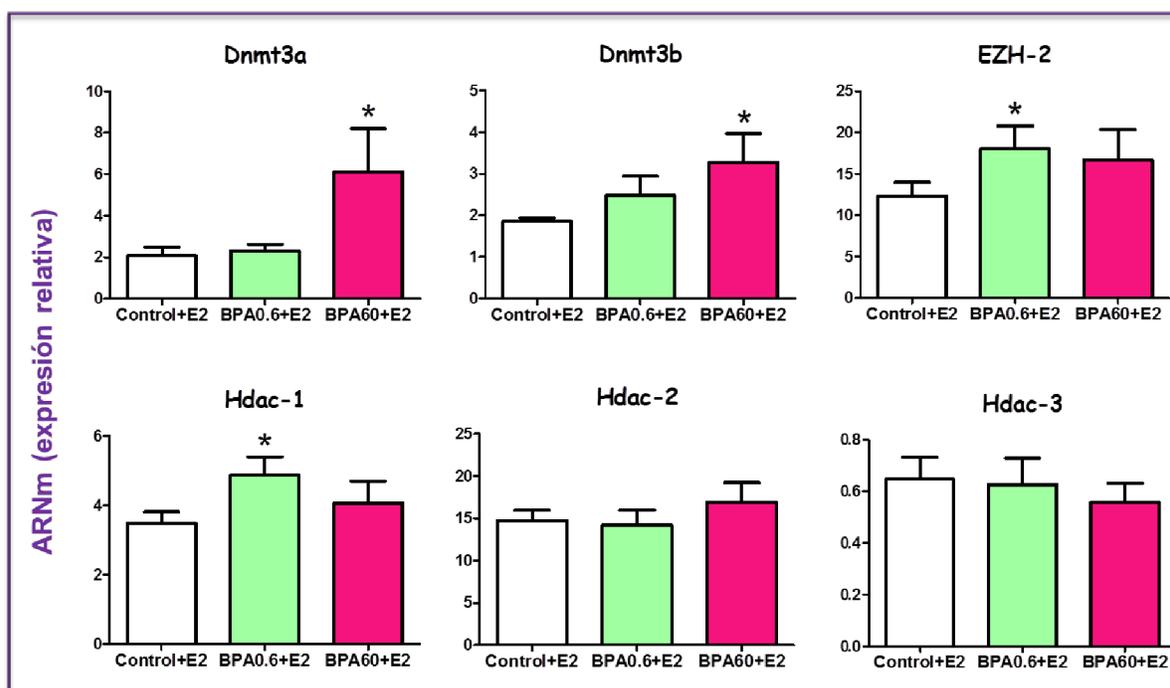


Figura 41: Efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de las enzimas Dnmt3a, Dnmt3b, EZH-2, Hdac-1, Hdac-2 y Hdac-3 en el útero de ratas de DPN460 tratadas con E2. Los niveles relativos de expresión del ARNm se midieron por PCR en tiempo real. Las muestras fueron normalizadas con la expresión del gen L19 y las cantidades relativas del ARNm fueron calculadas

---

mediante el método de la curva estándar relativa. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  vs. el grupo control+E2.

### **CAPÍTULO III**

#### ***Establecimiento de cultivos en tres dimensiones (3D) de células epiteliales endometriales como modelo para el estudio de los efectos de la exposición in vitro a Bisfenol A***

Este capítulo reúne los resultados obtenidos durante una estancia en el *Instituto de Recerca Biomédica de Lleida* (IRB) en España. El proyecto de estancia en el IRB tuvo como objetivo principal mi capacitación en la metodología de cultivo de células epiteliales endometriales en 3D, para luego realizar estudios del efecto de la exposición *in vitro* a BPA. Esta técnica de cultivos provee un ambiente estructural y funcional adecuado para investigar el efecto directo del BPA sobre las células epiteliales del útero, evitando la interferencia de moléculas derivadas del estroma. Durante el desarrollo de los cultivos, las células epiteliales forman estructuras glandulares correctamente polarizadas, que “imitan” el fenotipo normal de las células epiteliales *in vivo*.

#### **15. Desarrollo de los cultivos en 3D**

El desarrollo de los cultivos de células epiteliales endometriales se realizó siguiendo el protocolo descrito y desarrollado por el grupo investigación del IRB con el cual me capacitó (Eritja y col., 2010). En la figura 42 se observa el progreso de un cultivo en 3D a lo largo del tiempo. Las células epiteliales comienzan a formar estructuras glandulares polarizadas entre el tercer y cuarto día de cultivo en 3D. Debido a la naturaleza de estos cultivos que crecen sobre una base de Matrigel, no es posible realizar repiques para mantener a las células en crecimiento, por lo que la viabilidad de los mismos es relativamente baja, de aproximadamente 2 semanas, momento en el que las estructuras glandulares comienzan a colapsar y luego entran en apoptosis (figura 42).

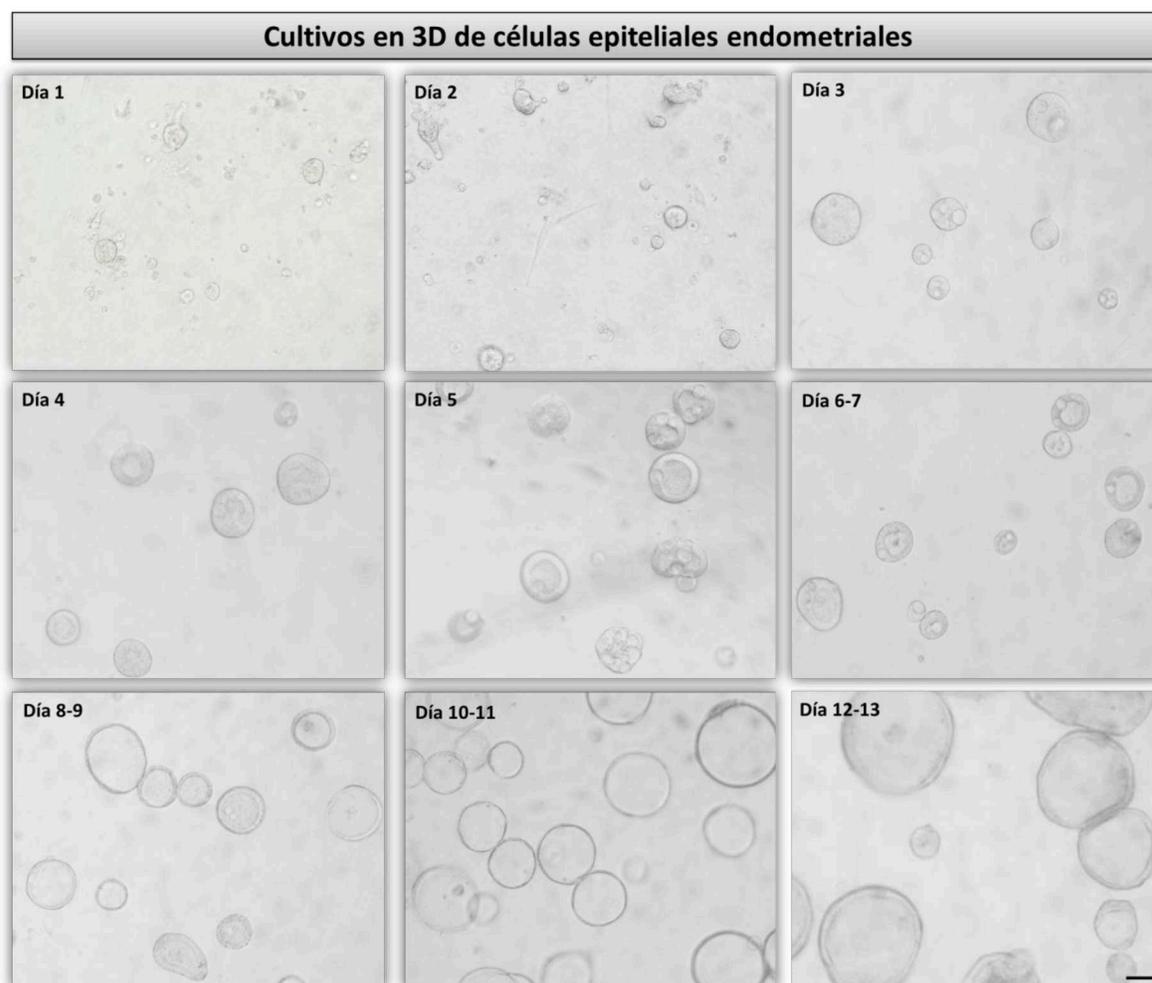


Figura 42: Fotomicrografías que muestran el progreso de un cultivo en 3D de células epiteliales endometriales a lo largo del tiempo. Se puede observar que a partir del día 3 las células comienzan a formar estructuras glandulares polarizadas, que proliferan y aumentan de tamaño durante los siguientes días. Entre los días 12 y 13 las estructuras glandulares comienzan a colapsar, para luego entrar en proceso de apoptosis. Barra: 50  $\mu\text{m}$ .

## 16. Efecto de la exposición a BPA sobre las estructuras glandulares en cultivos en 3D

Como se señaló en M&M, realizamos un experimento para evaluar el efecto de la exposición crónica a BPA en las dosis  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  M sobre los cultivos de células epiteliales en 3D. Durante el tratamiento se cuantificó el perímetro glandular (cada 3 días). Los resultados mostraron que los cultivos expuestos a BPA  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  M presentaron una disminución significativa del perímetro en el día 3 y 6 de tratamiento. Interesantemente, en el día 9 no encontramos diferencias

significativas entre los grupos, pero al final del tratamiento (día 12) observamos que los cultivos expuestos a BPA  $10^{-5}$  M presentaron un aumento significativo del tamaño glandular (perímetro) con respecto a los cultivos control (figura 43).

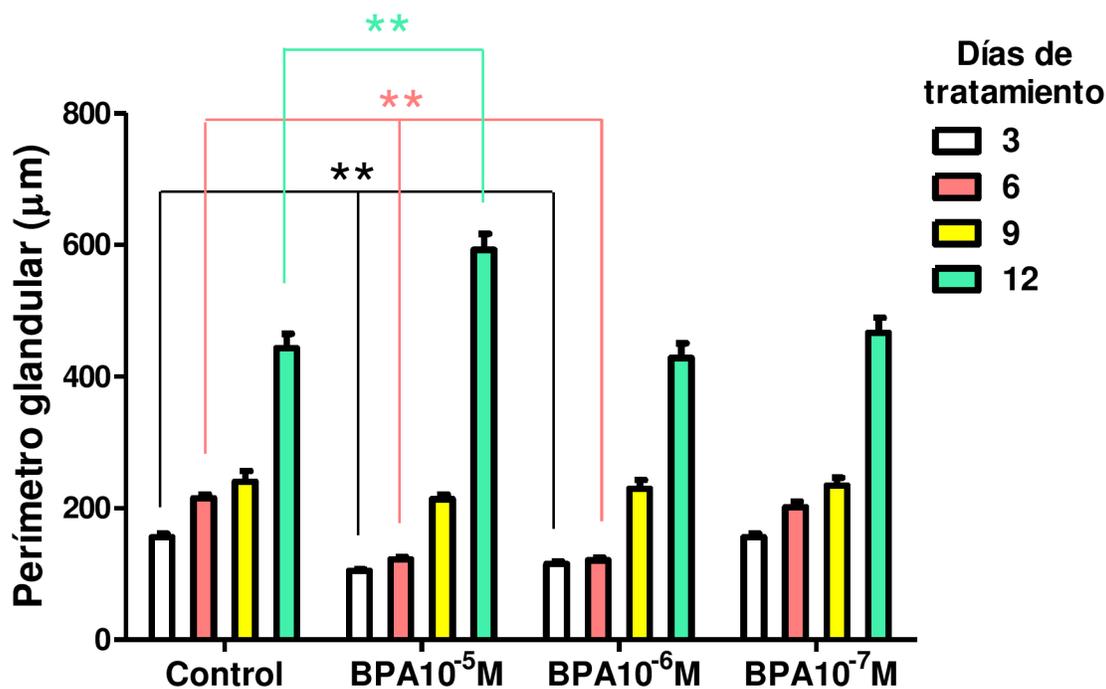


Figura 43: Efecto de la exposición a BPA sobre el perímetro de las estructuras glandulares en cultivos en 3D. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM. \*\*,  $p < 0,01$  vs. el grupo control.

Además evaluamos en el día 3 de tratamiento, la incorporación de BrdU (como marcador de proliferación celular) en los cultivos expuestos a las dosis de BPA que habían mostrado una disminución en el perímetro (es decir las dosis  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  M de BPA). En concordancia con la disminución observada en el perímetro glandular de esos cultivos, observamos también una disminución en el porcentaje de células BrdU-positivas por glándula (figura 44).

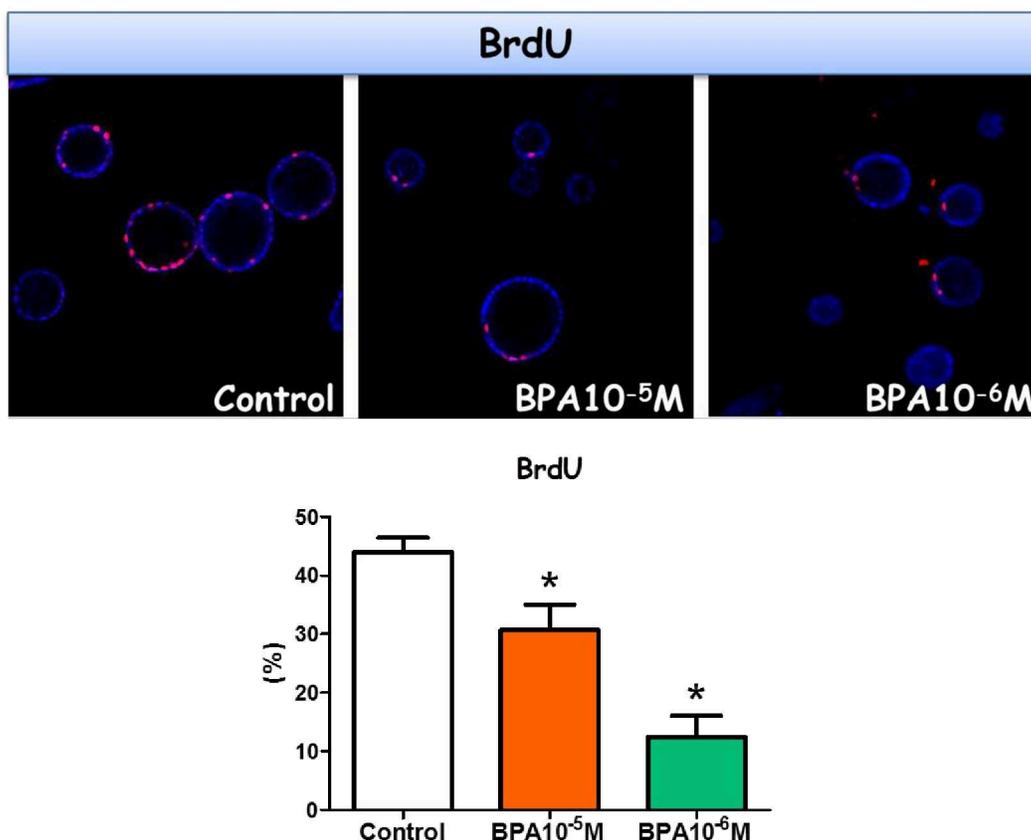


Figura 44: Efecto de la exposición a BPA sobre la proliferación de las estructuras glandulares en cultivos en 3D. Arriba, fotomicrografías representativas de la marcación positiva de BrdU (magnificación 20X). Abajo, cuantificación de la proliferación expresada como porcentaje de células que incorporaron BrdU por glándula. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  vs. el grupo control.

### 17. Efecto de la exposición a BPA sobre la polaridad apicobasal de las estructuras glandulares en 3D

Para evaluar si la exposición a BPA modificó la polaridad de las estructuras glandulares en los cultivos en 3D, se analizó por IF la expresión y localización de las proteínas faloidina, GM130 y  $\beta$ -catenina, a los 3 días de comenzado el tratamiento. Los marcadores evaluados presentaron un patrón de expresión normal en las células epiteliales de las estructuras glandulares. La faloidina se expresó en la superficie apical de las células, determinando un correcto posicionamiento del citoesqueleto de actina; la proteína GM130 se expresó en el citoplasma, adyacente al núcleo, hacia la cara luminal de la células, demostrando el correcto posicionamiento del aparato de Golgi, y la expresión de  $\beta$ -catenina se

localizó en la membrana celular lateral y basal, demostrando su participación en las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular (figura 45). La exposición a BPA no afectó la polarización apicobasal de las estructuras glandulares formadas.

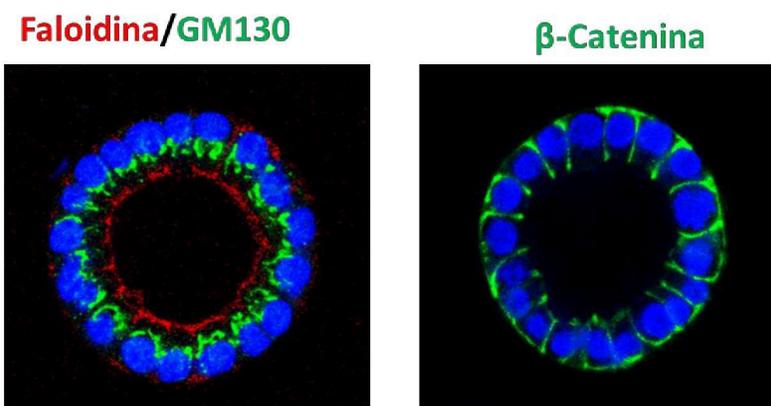


Figura 45: Fotomicrografías representativas de las inmunofluorescencias realizadas para evaluar polaridad apicobasal en las estructuras glandulares en 3D. En las imágenes se observa la expresión y localización de Faloidina (marcador del citoesqueleto de actina, rojo); GM130 (marcador del aparato de Golgi, verde);  $\beta$ -catenina (marcador de uniones célula/célula y célula/matriz extracelular, verde). En azul se marca el núcleo celular (magnificación 40X).

## **V- DISCUSIÓN**

*"No siempre se consigue lo que se quiere, pero si se intenta, se consigue lo que se necesita..."*

*Mick Jagger*

---

El conducto Mülleriano de los mamíferos experimenta un proceso de diferenciación organogenética que define el patrón histomorfológico del TRF. En la rata, este proceso comienza durante la organogénesis fetal (DG9) y se completa durante las 2 primeras semanas de vida postnatal (Kurita y col., 2001). Este periodo es crítico para el desarrollo uterino debido a que la exposición a compuestos químicos con actividad hormonal como el BPA puede alterar el microambiente tisular normal, y como consecuencia afectar la funcionalidad uterina y salud reproductiva a largo plazo (Suvorov y Waxman 2015). Actualmente existen numerosas evidencias de nuestro grupo y otros, que alertan acerca de la asociación entre la exposición a BPA durante periodos críticos del desarrollo y la presencia de alteraciones en tejidos hormono-sensibles, el aumento en la incidencia de patologías reproductivas como infertilidad-subfertilidad, problemas durante la preñez/lactancia y alteraciones preneoplásicas (Altamirano y col., 2015; Bosquiazzo y col., 2010; Kass y col., 2012; Newbold y col., 2009; Suvorov y Waxman 2015; Varayoud y col., 2014).

### ***1. La exposición perinatal a BPA afecta la diferenciación funcional uterina en ratas adultas durante la vida reproductiva***

En la primera parte de este trabajo, evaluamos los efectos de la exposición perinatal a BPA sobre el útero de hembras en diferentes etapas reproductivas. En ratas adultas jóvenes de DPN90, demostramos que la exposición a BPA modificó parámetros relacionados con la diferenciación y funcionalidad de las glándulas uterinas. Las hembras tratadas con las dos dosis de BPA evaluadas presentaron una disminución significativa en la tasa de proliferación celular de las glándulas uterinas, sin observarse cambios en los índices apoptóticos. Además, en el grupo de BPA60 se observó una disminución de la expresión de  $\alpha$ -SMA en las células del estroma que rodean el epitelio glandular, mientras que la expresión de vimentina no se modificó. Como se comentó en la introducción de esta tesis (sección 2), las células del estroma periglandular cumplen roles importantes en las comunicaciones entre el estroma y el epitelio glandular. Estas células colaboran

en la regulación y respuesta de señales provenientes del estroma necesarias para el mantenimiento de la arquitectura y función glandular (Czernobilsky y col., 1993). De este modo, la disminución de la proliferación celular en las glándulas uterinas de las hembras expuestas a BPA podría estar asociada con la alteración en la organización del estroma circundante, evidenciada por la disminución de  $\alpha$ -SMA en las células del perímetro glandular, que podría estar afectando la correcta comunicación entre el estroma y el epitelio glandular. En un trabajo previo demostramos que hembras expuestas a dietilestilbestrol (DES), un compuesto sintético con actividad estrogénica potente sobre el cual existen fuertes evidencias de perturbación endocrina, presentaron modificaciones similares a las descritas en este trabajo (Bosquiazzo y col., 2013). En concordancia con nuestros resultados, Ramos y col., (2001) demostraron que en ratas tratadas con BPA, el fenotipo de las células del estroma periductal de la próstata y la funcionalidad de las células glandulares también se vieron afectados. Resultados comparables fueron reportados para las células peritubulares que rodean los túbulos seminíferos de *Caiman latirostris* expuestos a pesticidas (Rey y col., 2009). Alteraciones en la organización de las células mioides periglandulares podrían ser las responsables de modificaciones en las señales que intervienen en el control de la proliferación y la apoptosis celular necesaria para mantener la histoarquitectura y función tisular (Rey y col., 2009).

Siguiendo con el estudio de los efectos de la exposición a BPA sobre el útero de hembras en diferentes etapas reproductivas, evaluamos el tejido uterino de ratas adultas de DPN360 que habían sido expuestas perinatalmente a BPA. En estas hembras observamos la presencia de anormalidades uterinas que incluyeron cambios morfológicos en el epitelio luminal del útero, tales como regiones epiteliales con células anormales y disposición atípica, y zonas con una reducción de la altura epitelial, evidenciada por la presencia de células cúbicas en lugar de cilíndricas. Además, en estas hembras observamos diferentes tipos morfológicos de glándulas uterinas tales como GME, glándulas quísticas y glándulas con anomalías celulares. El hecho de haber observado estas anormalidades en todos

los grupos experimentales incluyendo los controles, indicaría que se trata de alteraciones histomorfológicas que aparecen normalmente en ratas de edad avanzada. El proceso de envejecimiento uterino ha sido previamente asociado con alteraciones en la proliferación celular y en la expresión de receptores hormonales en diferentes tipos de células endometriales (Niklaus y col., 2007). Además, otros autores demostraron cambios en el patrón de expresión de genes blanco de los Eg en el útero de ratones adultos de edad avanzada (Khalyfa y col., 2003), sugiriendo que la expresión modificada de genes sensibles podría jugar un papel importante en la senescencia reproductiva y contribuir a la disminución y/o alteración de la función reproductiva en animales de edad avanzada.

La caracterización histológica de las alteraciones glandulares observadas mostró que todos los tipos glandulares a excepción de las GME presentaron un patrón similar al observado en las glándulas normales, expresando marcadores de diferenciación epitelial luminal (CK8) y RE $\alpha$ . Las GME en cambio, presentaron un patrón diferente, ya que fueron inmunoreactivas para la pan-CK basal, y además presentaron una alta expresión de p63. Se sabe que p63 es un marcador de diferenciación escamosa en tejidos adultos, y que se expresa normalmente en las capas basales de epitelios estratificados, pero no en epitelios simples. De esta manera se ha sugerido que p63 cumple un importante rol en el desarrollo y mantenimiento de epitelios estratificados (Di Como y col., 2002; Koster y col., 2004). Nuestros resultados mostraron que la expresión de p63 no se limitó exclusivamente a las células basales de las GME, sino que ciertas poblaciones de células epiteliales luminales (inmunoreactivas para CK8) también expresaron p63. En coincidencia con nuestros resultados, otros autores han demostrado expresión de p63 en metaplasias escamosas uterinas de ratones expuestos a DES (Kurita y col., 2004), y en pacientes con patologías uterinas como hiperplasia endometrial severa y cáncer endometrial (Stefansson y col., 2006).

Aunque las anomalías uterinas observadas fueron histológicamente iguales entre los diferentes grupos experimentales, en las ratas tratadas con BPA

la incidencia de alteraciones en el epitelio luminal fue mayor que en los controles. Las hembras expuestas a BPA60 mostraron también una mayor incidencia de glándulas con anomalías celulares. Estos resultados concuerdan con los reportados anteriormente por otros autores, que demostraron que la exposición a BPA durante periodos tempranos de desarrollo indujo diversas alteraciones en el epitelio luminal y lesiones patológicas incluyendo alteraciones benignas, premalignas y cambios neoplásicos en el útero de roedores adultos (Markey y col., 2005; Newbold y col., 2007, 2009; Schonfelder y col., 2004). Además, en un estudio previo demostramos que ratas expuestas perinatalmente a DES presentaron alteraciones glandulares similares a las descritas en esta tesis (Bosquiazzo y col., 2013). De esta manera podemos sugerir que este tipo de alteraciones histológicas en el epitelio luminal y glandular del útero podrían formar parte de patrones específicos de perturbación endocrina mediada por exposición a xenoestrógenos.

En resumen, en esta primera parte del trabajo, hemos demostrado que la exposición perinatal a dosis tan bajas como en el rango de la "dosis segura" de BPA establecida por la EPA (tal como la dosis alta utilizada aquí, BPA60), y a una dosis 100 veces menor (BPA0.6), altera el desarrollo normal del útero con consecuencias adversas a largo plazo en la histología y la diferenciación uterina. En el presente trabajo observamos importantes cambios en el compartimento glandular del útero, sugiriendo que el BPA podría alterar la funcionalidad de las glándulas uterinas. Importantes procesos reproductivos en los que las glándulas uterinas cumplen roles fundamentales, como por ejemplo la implantación del embrión en la preñez, se han visto alterados en modelos de exposición neonatal a BPA (Varayoud y col., 2014). En este sentido, alteraciones en la diferenciación funcional de las glándulas uterinas, mediadas por exposiciones tempranas a químicos estrogénicos como el BPA, podrían estar estrechamente asociadas con patologías reproductivas y cáncer en mujeres, cuya incidencia se ha incrementado notablemente en las últimas décadas (Caserta y col., 2014; Rochefort 2013).

---

## **2. La exposición perinatal a BPA altera la respuesta uterina al tratamiento con E2 en ratas adultas**

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación se ha demostrado que la exposición a xenoestrógenos en momentos tempranos del desarrollo altera la respuesta del útero frente a un tratamiento con esteroides ováricos en la adultez (Bosquiazzo y col., 2010; Bosquiazzo y col., 2013; Varayoud y col., 2008). En esta segunda parte de la tesis, evaluamos la respuesta del útero de ratas de edad avanzada perinatalmente expuestas a BPA, frente a un tratamiento crónico con E2 durante tres meses (grupos de DPN460-E2).

Las hembras de DPN460-E2 mostraron niveles circulantes de E2 equivalentes a las concentraciones fisiológicas reportadas para la fase del estro del ciclo estral en ratas (Lu y col., 1979) independientemente del grupo experimental. Esos valores séricos demuestran que la dosis de E2 administrada a las ratas estuvo en el rango de valores fisiológicos bajos y que no fueron afectados por la exposición a BPA. Por otro lado, el análisis de la histomorfología uterina de estas hembras mostró la presencia de alteraciones glandulares similares a las descritas en hembras de DPN360, las cuales, como se mencionó en la sección anterior, podrían ser parte del proceso normal de envejecimiento del útero en ratas de edad avanzada. En estas hembras observamos también la presencia de otros tipos morfológicos de glándulas, las GGH y los conglomerados de glándulas. Estos últimos se ha propuesto que podrían desarrollarse a partir de las GGH, que, en un estadio avanzado se separan formando conglomerados (Gunin y col., 2001).

En las hembras del grupo de BPA60+E2 aumentó la incidencia de glándulas con anomalías celulares y la densidad de volumen de GME. El mecanismo de formación de metaplasias escamosas en el útero es desconocido; sin embargo, este tipo de alteraciones han sido asociadas con diversas patologías además de un endometrio senil, incluyendo endometritis crónica, hiperplasia endometrial y

carcinoma endometrial (Nicolae y col., 2011; Stefansson y col., 2006). Como se describió en la sección anterior, las GME expresaron, y de manera anormal, el marcador de diferenciación epitelial basal p63. En esta parte del trabajo de tesis y para analizar con más detalle el patrón de expresión de p63 en la GME, estudiamos si la expresión de esta molécula en el útero se producía a expensas de alguna isoforma en particular. Para ello, evaluamos los niveles del ARNm de las isoformas de p63 TA y  $\Delta N$ , generadas a partir del uso de promotores alternativos (descrito en la sección 1.1 de la Introducción de esta tesis) en las hembras de todos los grupos experimentales. Poco se sabe acerca de las funciones específicas de cada una de estas isoformas. Koster y col., (2004) demostraron que TA es la primera isoforma de p63 que se expresa durante la embriogénesis y que es requerida para la iniciación de la estratificación epitelial en tejidos escamosos como la epidermis. En nuestro trabajo, la expresión del ARNm de TA fue mayor en el grupo de BPA60+E2 que en el control+E2. Se ha observado que la expresión ectópica de TA en un epitelio pulmonar simple *in vivo* promueve la inducción de metaplasias escamosas (Koster y col., 2004). Estos resultados nos permiten sugerir que el aumento observado en la expresión de TA en las ratas de BPA60+E2 podría estar asociado con la mayor densidad de GME observada en las ratas de ese grupo experimental. A diferencia del grupo de BPA60+E2, las ratas expuestas a BPA0.6+E2 presentaron menor expresión de TA, que se correlacionó con una menor expresión de la proteína p63 en las GME. En conjunto, lo anteriormente expuesto indica que si bien ambas isoformas de p63 se expresaron en el útero de las ratas de DPN460-E2, la isoforma TA sería la principal responsable de la expresión alterada de p63 en el útero de las hembras expuestas a BPA+E2. Las GME también presentaron una disminución en la expresión de Wnt7a y RP en comparación con las glándulas normales, demostrando que el desarrollo de este tipo glandular en el útero está asociado con alteraciones en la expresión de genes sensibles a Eg. En el mismo sentido, Kurita y Nakamura (2008) demostraron que Wnt7a es un importante gen diana de los Eg que cumple un rol esencial en el mantenimiento del fenotipo epitelial uterino en respuesta a Eg. Interesantemente, las GME de las ratas de BPA60+E2 mostraron

aún menor expresión de Wnt7a que las GME del grupo control+E2. Esta perturbación de Wnt7a mediada por exposición a BPA podría ser responsable del incremento de GME observado en el útero de las hembras del grupo de BPA60+E2. Varios autores han demostrado que la exposición neonatal a DES suprime la expresión de Wnt7a en las células epiteliales de ratones durante los primeros días después del nacimiento (Ma 2009; Mericskay y col., 2004; Miller y col., 1998a). También se ha observado que una desregulación de Wnt7a durante el período perinatal conduce a la desorganización global del epitelio uterino que se diferencia en un epitelio estratificado escamoso, y a alteraciones en la formación de glándulas (Kurita 2011; Miller y col., 1998a). Por otra parte, Jeong y col., (2009) demostraron que el *knockout* condicional de  $\beta$ -catenina en el útero de ratones adultos indujo el desarrollo de un epitelio escamoso, indicando que la activación de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina es necesaria para el mantenimiento del fenotipo epitelial normal del útero. En este trabajo, cuando evaluamos la expresión protéica de  $\beta$ -catenina en los distintos tipos de glándulas, no encontramos diferencias entre los grupos experimentales, y además observamos que en todos los animales, la inmunomarcación de  $\beta$ -catenina se encontró localizada en la membrana y el citoplasma de las células glandulares, pero no en el núcleo, sugiriendo que la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina estaría inactiva en esas células.

En las hembras del grupo tratado con BPA0.6+E2 se observó un aumento significativo en la incidencia de GGH. Este tipo morfológico de glándulas uterinas ha sido previamente considerado como una alteración uterina pre-neoplásica (Gunin y col., 2001). Es interesante remarcar que estas GGH no fueron observadas en las hembras de DPN360, razón por la cual decidimos investigar si su desarrollo era inducido por el tratamiento con E2, la edad de las hembras (ya que en este experimento los animales tenían 100 días más al momento del sacrificio que los de DPN360), o por una combinación de ambos. Los resultados de los experimentos complementarios que se llevaron a cabo para responder a esta incógnita (cuyo diseño experimental se explicó en la sección 1.2 de M&M), demostraron que las hembras jóvenes tratadas con E2 durante tres meses

(DPN190-E2) no presentaron GGH ni conglomerados de glándulas. No obstante, el análisis de la histología de las hembras adultas (DPN460) sin ningún tratamiento, mostró la presencia de GGH con una incidencia similar a las del grupo control+E2. Así, estos resultados indican que este tipo de glándulas aparecen normalmente en animales adultos de edad avanzada en presencia de estrógenos exógenos o endógenos. Sin embargo, su mayor incidencia en hembras expuestas a BPA0.6+E2 sugiere que, al igual que como se discutió para las GME en BPA60+E2, la exposición perinatal a BPA aumentaría la susceptibilidad a desarrollar este tipo de alteraciones en la vejez. Poco se conoce acerca de los mecanismos implicados en la formación de GGH. Gunin y col., (2001) postularon que cuando las mitosis de las células glandulares se producen de manera perpendicular a la membrana basal de la glándula, pueden inducir la formación de GGH. Además, estos autores sugirieron que las alteraciones en la orientación de las mitosis están correlacionadas con cambios precancerosos inducidos por E2. Sin embargo, el mecanismo por el cual el E2 podría influenciar la orientación de las mitosis es desconocido. Miembros de las vías de señalización no canónicas de Wnt podrían estar implicados, teniendo en cuenta su participación en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular durante el periodo de desarrollo del tracto reproductivo (Vandenberg y Sassoon 2009). En nuestro trabajo, si bien encontramos un aumento de la incidencia de GGH en las ratas expuestas a BPA0.6+E2, el mecanismo de su formación sigue siendo desconocido.

Como se ha mencionado anteriormente en esta tesis, numerosos procesos de diferenciación epitelial uterina regulados por las hormonas sexuales son mediados por sus receptores localizados en el estroma (Cunha y col., 2004). Varios autores han propuesto que patrones alterados de expresión de estos receptores hormonales en el útero, desempeñan un rol importante en la etiología de graves alteraciones patológicas del endometrio, incluyendo hiperplasia endometrial y cáncer (Hapangama y col., 2015; Jarzabek y col., 2013). En este trabajo demostramos que la expresión de RP disminuyó en las células del estroma

---

uterino de ambos grupos tratados con BPA+E2. Además, se observó una disminución en la expresión de RE $\alpha$  en las hembras del grupo de BPA60+E2, que se correlacionó con una caída en los niveles relativos del ARNm de RE $\alpha$ . En algunos casos de mujeres con alteraciones endometriales neoplásicas, se ha observado que el aumento en el grado de malignidad de ciertos tipos de cáncer endometrial se ha correlacionado con menores niveles de RE (Sivridis y col., 2001). Posiblemente, la disminución de los niveles de RE $\alpha$  en las ratas expuestas a BPA60+E2, lleve a una desregulación en el control adecuado de la expresión de genes diana del E2, tales como el Wnt7a en las GME.

Un posible mecanismo mediador de la perturbación provocada por la exposición a BPA sobre la expresión de RE $\alpha$ , podría ser la utilización diferencial de las secuencias promotoras del gen que lo codifica. Nuestros resultados demostraron que ratas del grupo de BPA60+E2 presentaron una disminución en la abundancia relativa de los transcritos con exones 5' alternativos RE $\alpha$ -O y RE $\alpha$ -OT. El uso selectivo de promotores del RE $\alpha$  mediado por exposición a BPA ha sido previamente demostrado en el cerebro de ratas hembra neonatalmente expuestas a dosis de BPA similares a las estudiadas aquí (Monje y col., 2007). Además, reportes previos demuestran que la actividad diferencial de estos promotores es un mecanismo de regulación clave en la expresión tejido-dependiente del RE $\alpha$  (Donaghue y col., 1999; Hughes 2006; Kato y col., 1998), y que el splicing alternativo del ARNm del RE $\alpha$  puede ser diferencialmente regulado por distintas dosis de Eg (Varayoud y col., 2005). Los resultados presentados aquí, sugieren que los promotores RE $\alpha$ -O y RE $\alpha$ -OT son importantes en el control de la transcripción del gen de RE $\alpha$  en el útero de hembras adultas en respuesta a E2, y pueden ser perturbados por exposiciones tempranas a BPA. Así, el uso selectivo de promotores y el splicing alternativo del ARNm son mecanismos Eg-dependientes de variabilidad en la regulación del gen de RE $\alpha$ , que complejizan aún más el estudio de los efectos a nivel molecular de compuestos con actividad estrogénica.

Además de los cambios observados en la expresión de RE $\alpha$ , otras moléculas reguladoras claves de las acciones de los Eg, podrían estar asociadas con las alteraciones observadas en animales expuestos a BPA+E2. Como se ha mencionado en la introducción de esta tesis (sección 2.4.1), los coreguladores de la acción de receptores hormonales colaboran en regiones reguladoras de genes diana de estos receptores para potenciar o inhibir la transcripción génica hormonodependiente (Hall y McDonnell 2005). En este trabajo encontramos una disminución en la expresión de las proteínas coactivadoras SRC1 y SRC3 en el estroma de las ratas expuestas a ambas dosis de BPA+E2. Este resultado sugiere una interrupción en la activación transcripcional de genes diana del E2 mediada por la exposición perinatal a BPA. En el mismo sentido, reportes previos han demostrado que estas y otras proteínas coreguladoras de la acción de los receptores, son moléculas diana de perturbación endocrina mediada por BPA en distintos modelos animales (Bosquiazzo y col., 2010; Salian-Mehta y col., 2014; Varayoud y col., 2008).

Posteriormente en este trabajo decidimos estudiar la expresión del IGF-I y su receptor IGF-IR, como posibles mediadores paracrinicos de la respuesta alterada del útero de las hembras expuestas a BPA+E2. En los roedores, el E2 induce proliferación de las células epiteliales actuando a través de RE $\alpha$  localizado en el estroma, el cual estimula la secreción de factores de crecimiento tales como el IGF-I, que actúan de manera paracrina sobre el IGF-IR localizado en el epitelio (Sato y col., 2002). En un estudio previo se demostró que ratones expuestos a E2 durante el período perinatal desarrollan hiperplasia endometrial vinculada con desregulaciones en vías de señalización que involucran al IGF-I y al IGF-IR (McC Campbell y col., 2008). Además, ratones *knockout* para el gen del IGF-I carecen de la respuesta mitogénica del epitelio uterino frente al estímulo de los Eg (Sato y col., 2002). Aquí, observamos que las hembras expuestas a BPA0.6+E2 presentaron una disminución en la expresión del ARNm del IGF-1 y del IGF-IR. Esto sugiere que la desregulación en la vía de señalización del IGF-I podría estar asociada con el aumento en la frecuencia de aparición de GGH observadas en las

ratas de BPA0.6+E2. Sin embargo, no podemos descartar que otros mecanismos no asociados al IGF-I puedan favorecer la formación de GGH en este grupo experimental.

Los mecanismos de regulación epigenética representan uno de los objetivos más plausibles a través de los cuales los compuestos estrogénicos ambientales tales como el BPA podrían ejercer sus efectos (Cruz y col., 2014; Kundakovic y Champagne 2011). En el presente trabajo demostramos cambios en enzimas claves que participan en mecanismos de regulación epigenética, en ratas expuestas a BPA+E2. Específicamente, la expresión de las enzimas encargadas de la metilación del ADN, Dnmt3a y Dnmt3b, se incrementó en el grupo de BPA60+E2 mientras que la expresión de enzimas involucradas en la acetilación y metilación de histonas, Hdac-1 y EZH-2 respectivamente, fue mayor en el grupo de BPA0.6+E2. Diversos estudios en roedores han demostrado que el BPA puede actuar por diferentes mecanismos epigenéticos en varios órganos incluyendo el útero (Bromer y col., 2010; Doherty y col., 2010; Doshi y col., 2011; Kundakovic y Champagne 2011). Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar si las alteraciones observadas en las enzimas encargadas de modificaciones epigenéticas en los grupos de BPA+E2 son responsables de los cambios que observamos en moléculas coactivadoras de los receptores hormonales, y/o en genes diana del E2 específicos como el RE $\alpha$ , el RP, el IGF-I o miembros de la familia de los Wnt.

En resumen, en esta segunda parte del trabajo de tesis demostramos que la exposición perinatal a bajas dosis de BPA es capaz de alterar la respuesta uterina al tratamiento con E2 en ratas adultas de edad avanzada. Esto fue evidenciado por alteraciones en las glándulas uterinas, tanto en la histomorfología como en la expresión de proteínas implicadas en la diferenciación funcional como el Wnt7a; y en la expresión de los receptores hormonales RE $\alpha$  y RP en el estroma uterino. Además, otras moléculas reguladoras claves como los coactivadores de la acción de los receptores hormonales SRC1 y SRC3 se encontraron alterados por

exposición a BPA, pudiendo también estar implicados en la desregulación de la expresión de genes diana de las hormonas. Los cambios en la expresión de moléculas como el IGF-I y el IGF-IR podrían ser responsables de alteraciones en las comunicaciones estroma-epitelio mediadas por E2 en animales expuestos a BPA. Por último, las alteraciones encontradas en la expresión de enzimas responsables de modificaciones epigenéticas como metilación de ADN y metilación/acetilación de histonas podrían estar implicadas en los mecanismos de acción del BPA en el útero de los animales expuestos. En conjunto estos resultados alertan acerca de la posible relación entre el aumento de patologías dependientes de hormonas en mujeres adultas y la función uterina alterada debido a exposiciones tempranas a BPA.

Es interesante observar que cada dosis de BPA utilizada en este trabajo se asoció con diferentes efectos en el útero, ya sea en cuanto a la incidencia de determinadas alteraciones glandulares como a nivel de la expresión génica. De esta manera, podemos decir que el BPA estaría actuando mediante diferentes mecanismos moleculares en función de la dosis administrada perinatalmente. Este tipo de comportamiento dosis-dependiente ha sido reportado previamente en modelos de exposición a BPA (Monje y col., 2007; Newbold y col., 2007, 2009).

### ***3. La exposición in vitro a $10^{-5}$ M de BPA produce respuesta estrogénica sobre la proliferación de estructuras glandulares en cultivos en 3D***

Como se reportó en el Capítulo III de esta tesis, durante una capacitación en España realicé un estudio piloto para optimizar una metodología de exposición *in vitro* a BPA sobre cultivos en 3D de células epiteliales endometriales de ratones. El análisis de los cultivos en 3D expuestos a BPA mostró inicialmente una reducción en el perímetro de las estructuras glandulares formadas en los cultivos expuestos a  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  M de BPA. Sin embargo, a lo largo del tratamiento estas estructuras progresivamente alcanzaron el tamaño normal observado en los

controles y luego, al final del tratamiento se observó un incremento significativo en el perímetro glandular de los cultivos expuestos a  $10^{-5}$  M de BPA. Los resultados obtenidos en este experimento resultan muy interesantes si se los compara con los anteriormente reportados por Eritja y col., (2013). En su trabajo, esta autora observó el mismo patrón de respuesta en cultivos de células epiteliales endometriales que habían sido crónicamente expuestas a E2 en las dosis de  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M. Esto sugiere fuertemente que el BPA administrado *in vitro* en la dosis de  $10^{-5}$  M produce una respuesta estrogénica sobre la proliferación de las estructuras glandulares en cultivos en 3D, comparable a la producida por exposición a E2, indicando que esa dosis podría ser empleada para evaluar perturbación endocrina mediada por BPA *in vitro* en este tipo de cultivos. Además es interesante resaltar que las dosis de BPA testeadas en este experimento, son consideradas dosis bajas de exposición *in vitro* (Yang y col., 2013). Esto es un punto muy importante para tener en cuenta en experimentos en los que se pretendan estudiar comparativamente los mecanismos de acción implicados en alteraciones observadas *in vivo* con dosis bajas de exposición a este xenoestrógeno, tal como las que han sido reportadas en esta tesis.

Cabe destacar además, que esta metodología de cultivo en 3D permite “imitar” el fenotipo normal de las células epiteliales *in vivo* y provee el microambiente adecuado para investigar los efectos del BPA en células epiteliales sin interferencias de factores paracrinós derivados del estroma. Además, este sistema posee importantes innovaciones que proporcionan mejoras con respecto a otros modelos de cultivos *in vitro* existentes. La mayoría de cultivos en 3D se construyen utilizando líneas celulares inmortales tales como MDCK o células MCF-10. En este sentido, el cultivo primario normal de células epiteliales no inmortalizadas constituye una importante ventaja a la hora de estudiar el efecto de drogas o compuestos con actividad hormonal en procesos de diferenciación epitelial y glandular, superando los posibles efectos no deseados derivados de la línea celular (Eritja y col., 2010). Por otra parte, la elevada disponibilidad de células de roedores ofrece la oportunidad de examinar los efectos de diferentes

modelos animales en eventos como la formación de las glándulas uterinas y el mantenimiento de la estructura glandular. Estas características hacen de ésta, una metodología de elección para abordar estudios en los que se pretenda estudiar el efecto directo del BPA u otros PE sobre las células epiteliales del útero, evitando la interferencia de moléculas derivadas del estroma.

En conclusión, los resultados presentados en este trabajo demuestran que la exposición perinatal a BPA provoca alteraciones sobre el útero, que se manifiestan a lo largo de la vida reproductiva y frente a un tratamiento crónico con E2 en la adultez. Además, muchos de los efectos de la exposición a BPA observados en este trabajo demostraron ser dosis-dependientes y algunos de ellos fueron exclusivamente observados en las hembras expuestas a la dosis más baja utilizada en este estudio (BPA0.6), como ser el aumento en la incidencia de GGH, consideradas previamente como alteraciones pre-neoplásicas. A pesar de que la EPA de EEUU y la Comisión Europea establecieron una dosis de 50 µg/kg/día como “dosis segura” e “ingesta diaria tolerable”, respectivamente; los resultados presentados en esta tesis, así como otros ya reportados por nuestro grupo de laboratorio empleando dosis bajas de BPA (Altamirano y col., 2015; Bosquiazzo y col., 2010; Kass y col., 2012; Monje y col., 2007; Monje y col., 2009; Ramos y col., 2001; Varayoud y col., 2008; Varayoud y col., 2014) indicarían que es necesario realizar un replanteo con relación a las dosis consideradas “seguras” de este compuesto.

Estos resultados son inquietantes en lo que respecta a la salud pública, ya que en el transcurso de esta tesis confirmamos que la exposición a dosis bajas de un compuesto ambiental hormonalmente activo durante las etapas tempranas del desarrollo, afecta la diferenciación del útero con consecuencias negativas a largo plazo durante la vida adulta, que podrían afectar el desempeño reproductivo. Esto es particularmente importante ya que, como se demostró aquí, muchos de los efectos provocados por distintos PE permanecen silentes durante largos períodos, activándose frente a estímulos endocrinos como la pubertad, la madurez sexual, la gestación, o el tratamiento con hormonas.

Por último, pensamos que es necesario generar conciencia acerca de las consecuencias adversas de la exposición a compuestos con actividad hormonal sobre la población actual y las generaciones venideras. El desarrollo de políticas sanitarias y de prevención en el tema de los PE es una necesidad ineludible.

## **VI- CONCLUSIONES**

*"Es larga la carretera cuando uno mira atrás. Vas cruzando las fronteras sin darte cuenta quizás..."*

*Sui Generis*

---

Finalizando el desarrollo de este trabajo de tesis y luego de presentados los resultados podemos elaborar un resumen de los mismos y las siguientes conclusiones:

**1.** La exposición perinatal a BPA afecta la diferenciación funcional uterina en ratas adultas durante la vida reproductiva, destacándose las siguientes características:

a) en hembras adultas jóvenes (DPN90):

- ✓ Ambas dosis de BPA provocaron una disminución en la tasa de proliferación celular de las glándulas uterinas.
- ✓ La expresión de  $\alpha$ -SMA en las células del estroma que rodean el epitelio glandular se encontró disminuida en hembras expuestas a BPA60.

b) en hembras adultas (DPN360):

- ✓ Ambas dosis de BPA provocaron un aumento en la incidencia de alteraciones en el epitelio luminal, tales como regiones epiteliales con células anormales y/o disposición atípica, y zonas con una reducción de la altura epitelial.
- ✓ La incidencia de glándulas con anomalías celulares (caracterizadas por poseer células cilíndricas, relación núcleo/citoplasma baja, bordes citoplasmáticos pocos definidos, núcleos con la cromatina dispersa y/o disposición atípica de las células) se incrementó en hembras expuestas a BPA60.

**2.** La exposición perinatal a BPA altera la respuesta uterina al tratamiento con E2 en ratas adultas. Se demostraron las siguientes características:

- ✓ En hembras expuestas a BPA60+E2 aumentó la incidencia de glándulas con anomalías celulares y también la densidad de GME. En todos los grupos experimentales, este tipo glandular se caracterizó por presentar expresión anormal de p63, y menor expresión de Wnt7a y RP en comparación con las glándulas normales.
- ✓ Las GME del grupo de BPA60+E2 mostraron menor expresión de Wnt7a que las GME del control+E2.

- ✓ En hembras expuestas a BPA0.6+E2 aumentó la incidencia de GGH.
- ✓ La expresión de la isoforma TA de p63 aumentó en BPA60+E2, en correlación con el aumento de densidad de GME en este grupo experimental.
- ✓ Ambas dosis de BPA provocaron una disminución en la expresión de RP en el estroma uterino.
- ✓ La expresión de RE $\alpha$  en el estroma uterino fue menor en BPA60+E2. Esta disminución fue a expensas de la caída en los niveles de transcritos con exones 5' no traducibles RE $\alpha$ -O y RE $\alpha$ -OT.
- ✓ Ambas dosis de BPA provocaron una disminución en la expresión de los coactivadores de la acción de receptores hormonales SRC1 y SRC3 en el estroma uterino.
- ✓ La exposición a BPA0.6+E2 disminuyó la expresión del ARNm de IGF-I e IGF-IR.
- ✓ La expresión de enzimas encargadas de la metilación del ADN, Dnmt3a y Dnmt3b, fue mayor en BPA60+E2.
- ✓ La expresión de enzimas encargadas de la deacetilación y metilación de histonas, Hdac-1 y EZH-2 respectivamente, fue mayor en las hembras de BPA0.6+E2.
- ✓ Los efectos producidos por la exposición perinatal a BPA fueron diferentes según la dosis estudiada.

**3.** La exposición *in vitro* a  $10^{-5}$  M de BPA produce respuesta estrogénica sobre la proliferación de estructuras glandulares formadas en los cultivos en 3D de células epiteliales endometriales. Esto fue evidenciado por un patrón de respuesta de los cultivos expuestos a BPA comparable al patrón observado frente a un tratamiento crónico con E2 en dosis comparables, el cual se caracterizó por una disminución inicial en la proliferación y el perímetro de las estructuras glandulares, que progresivamente se incrementó a lo largo del tratamiento hasta lograr un aumento significativo al final del tratamiento.

Los resultados obtenidos en esta tesis intentan contribuir al conocimiento de los efectos de exposiciones a bajas concentraciones de un xenoestrógeno ampliamente difundido en el medioambiente como lo es el BPA, durante períodos de desarrollo perinatal altamente susceptibles. Estos resultados deberían servir para acrecentar la alerta sobre las consecuencias nocivas de los contaminantes químicos a los que a diario estamos expuestos. Además contribuyen en la toma de conciencia para promover la legislación de normas que reduzcan o eviten totalmente la exposición a compuestos químicos con actividad hormonal comprobada, y que son capaces de afectar la salud reproductiva de animales silvestres y de la población humana.

## **VII- BIBLIOGRAFÍA**

*"No está mal que terminen las historias, mientras haya historias que contar..."*

*Las Pastillas del Abuelo*

---

Adesanya, O.O.; Zhou, J.; Samathanam, C.; Powell-Braxton, L. y Bondy, C.A. (1999) *Insulin-like growth factor 1 is required for G2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle*. Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 3287-3291.

Altamirano, G.A.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; Gomez, A.L.; Delconte, M.B. y Kass, L. (2015) *Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to bisphenol A*. Mol Cell Endocrinol. 411: 258-267.

Bernal, A.J. y Jirtle, R.L. (2010) *Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 88: 938-944.

Bjornstrom, L. y Sjoberg, M. (2005) *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes*. Mol Endocrinol. 19: 833-842.

Block, K.; Kardana, A.; Igarashi, P. y Taylor, H.S. (2000) *In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing mullerian system*. FASEB J. 14: 1101-1108.

Bork, P. y Koonin, E.V. (1998) *Predicting functions from protein sequences--where are the bottlenecks?* Nat Genet. 18: 313-318.

Bosquiazzo, V.L.; Varayoud, J.; Muñoz-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.

Bosquiazzo, V.L.; Vigezzi, L.; Muñoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2013) *Perinatal exposure to diethylstilbestrol alters the functional differentiation of the adult rat uterus*. J Steroid Biochem Mol Biol. 138: 1-9.

Bottner, M. y Wuttke, W. (2005) *Chronic treatment with low doses of estradiol affects pituitary and thyroid function in young and middle-aged ovariectomized rats*. Biogerontology. 6: 261-269.

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.

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.

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.

Caserta, D.; Di Segni, N.; Mallozzi, M.; Giovanale, V.; Mantovani, A.; Marci, R. y Moscarini, M. (2014) *Bisphenol A and the female reproductive tract: an overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies*. *Reprod Biol Endocrinol*. 12: 37.

Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*. 162: 156-159.

Christensen, K.L.; Lorber, M.; Koslitz, S.; Bruning, T. y Koch, H.M. (2012) *The contribution of diet to total bisphenol A body burden in humans: results of a 48 hour fasting study*. *Environ Int*. 50: 7-14.

Cikos, S.; Bukovska, A. y Koppel, J. (2007) *Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis*. *BMC Mol Biol*. 8: 113.

Clevers, H. (2006) *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. *Cell*. 127: 469-480.

Cooke, P.S.; Spencer, T.E.; Bartol, F.F. y Hayashi, K. (2013) *Uterine glands: development, function and experimental model systems*. *Mol Hum Reprod*. 19: 547-558.

Cruz, G.; Foster, W.; Paredes, A.; Yi, K.D. y Uzumcu, M. (2014) *Long-term effects of early-life exposure to environmental oestrogens on ovarian function: role of epigenetics*. *J Neuroendocrinol*. 26: 613-624.

Cunha, G.R.; Cooke, P.S. y Kurita, T. (2004) *Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses*. *Arch Histol Cytol*. 67: 417-434.

Czernobilsky, B.; Remadi, S. y Gabbiani, G. (1993) *Alpha-smooth muscle actin and other stromal markers in endometrial mucosa*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 422: 313-317.

Daftary, G.S. y Taylor, H.S. (2006) *Endocrine regulation of HOX genes*. *Endocr Rev*. 27: 331-355.

Dasgupta, S.; Lonard, D.M. y O'Malley, B.W. (2014) *Nuclear receptor coactivators: master regulators of human health and disease*. *Annu Rev Med*. 65: 279-292.

de Ruijter, A.J.; van Gennip, A.H.; Caron, H.N.; Kemp, S. y van Kuilenburg, A.B. (2003) *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. *Biochem J*. 370: 737-749.

Delfosse, V.; Grimaldi, M.; Cavailles, V.; Balaguer, P. y Bourguet, W. (2014) *Structural and functional profiling of environmental ligands for estrogen receptors*. *Environ Health Perspect*. 122: 1306-1313.

Delfosse, V.; Grimaldi, M.; Pons, J.L.; Boulahtouf, A.; le Maire, A.; Cavailles, V.; Labesse, G.; Bourguet, W. y Balaguer, P. (2012) *Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 109: 14930-14935.

Di Como, C.J.; Urist, M.J.; Babayan, I.; Drobnjak, M.; Hedvat, C.V.; Teruya-Feldstein, J.; Pohar, K.; Hoos, A. y Cordon-Cardo, C. (2002) *p63 expression profiles in human normal and tumor tissues*. Clin Cancer Res. 8: 494-501.

Dobrzycka, K.M.; Townson, S.M.; Jiang, S. y Oesterreich, S. (2003) *Estrogen receptor corepressors -- a role in human breast cancer?* Endocr Relat Cancer. 10: 517-536.

Doherty, L.F.; Bromer, J.G.; Zhou, Y.; Aldad, T.S. y Taylor, H.S. (2010) *In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer*. Horm Cancer. 1: 146-155.

Donaghue, C.; Westley, B.R. y May, F.E. (1999) *Selective promoter usage of the human estrogen receptor-alpha gene and its regulation by estrogen*. Mol Endocrinol. 13: 1934-1950.

Doshi, T.; Mehta, S.S.; Dighe, V.; Balasinor, N. y Vanage, G. (2011) *Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A*. Toxicology. 289: 74-82.

Dunlap, K.A.; Filant, J.; Hayashi, K.; Rucker, E.B., 3rd; Song, G.; Deng, J.M.; Behringer, R.R.; DeMayo, F.J.; Lydon, J.; Jeong, J.W.; y col. (2011) *Postnatal deletion of Wnt7a inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice*. Biol Reprod. 85: 386-396.

Durando, M.; Kass, L.; Piva, J.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Luque, E.H. y Muñoz-de-Toro, M. (2007) *Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats*. Environ Health Perspect. 115: 80-86.

Engel, S.M.; Levy, B.; Liu, Z.; Kaplan, D. y Wolff, M.S. (2006) *Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid*. Reprod Toxicol. 21: 110-112.

Environmental Protection Agency (1988) *Integrated Risk Information System. Bisphenol A (CASRN 80-05-7)*.  
[http://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance\\_nmbr=356](http://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=356)

Eritja, N.; Llobet, D.; Domingo, M.; Santacana, M.; Yeramian, A.; Matias-Guiu, X. y Dolcet, X. (2010) *A novel three-dimensional culture system of polarized epithelial cells to study endometrial carcinogenesis*. Am J Pathol. 176: 2722-2731.

Eritja, N.; Mirantes, C.; Llobet, D.; Yeramian, A.; Bergada, L.; Dosil, M.A.; Domingo, M.; Matias-Guiu, X. y Dolcet, X. (2013) *Long-term estradiol exposure is a*

*direct mitogen for insulin/EGF-primed endometrial cells and drives PTEN loss-induced hyperplasic growth.* Am J Pathol. 183: 277-287.

Fernandez, M.; Bianchi, M.; Lux-Lantos, V. y Libertun, C. (2009) *Neonatal exposure to bisphenol a alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats.* Environ Health Perspect. 117: 757-762.

Franco, H.L.; Dai, D.; Lee, K.Y.; Rubel, C.A.; Roop, D.; Boerboom, D.; Jeong, J.W.; Lydon, J.P.; Bagchi, I.C.; Bagchi, M.K.; y col. (2011) *WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse.* FASEB J. 25: 1176-1187.

Franco, H.L.; Rubel, C.A.; Large, M.J.; Wetendorf, M.; Fernandez-Valdivia, R.; Jeong, J.W.; Spencer, T.E.; Behringer, R.R.; Lydon, J.P. y Demayo, F.J. (2012) *Epithelial progesterone receptor exhibits pleiotropic roles in uterine development and function.* FASEB J. 26: 1218-1227.

Freeman, M.E. (1994) *The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat.* En: *The Physiology of Reproduction*, (Eds.: Knobil, E., y Neill, J.D.), Raven Press Ltd, New York, p. 1893–1928.

Funk, C.R. y DeMayo, F.J. (1999) *Progesterone actions on reproductive tract.* En: *Encyclopedia of Reproduction*, (Eds.: Knobil, E., y Neill, J.D.), Academic Press, New York, USA, p. 6-16.

Furst, R.W.; Kliem, H.; Meyer, H.H. y Ulbrich, S.E. (2012) *A differentially methylated single CpG-site is correlated with estrogen receptor alpha transcription.* J Steroid Biochem Mol Biol. 130: 96-104.

GE Healthcare Life Sciences (2014) *Cloning the gene or gene fragment into a pGEX expression vector.* En: *GST Gene Fusion System*, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA, p. 9-19. [http://www.gelifesciences.com/file\\_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/GST\\_gene\\_fusion\\_system\\_handbook.pdf](http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/GST_gene_fusion_system_handbook.pdf)

Geneser, F. (2000) *Organos de la reproducción.* En: *Histología, Sobre Bases Biomoleculares*, (Eds.), Panamericana, Buenos Aires, Argentina, p. 613-637.

Ghioni, P.; Bolognese, F.; Duijf, P.H.; Van Bokhoven, H.; Mantovani, R. y Guerrini, L. (2002) *Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains.* Mol Cell Biol. 22: 8659-8668.

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

Gray, C.A.; Bartol, F.F.; Tarleton, B.J.; Wiley, A.A.; Johnson, G.A.; Bazer, F.W. y Spencer, T.E. (2001) *Developmental biology of uterine glands*. Biol Reprod. 65: 1311-1323.

Guenther, M.G.; Yu, J.; Kao, G.D.; Yen, T.J. y Lazar, M.A. (2002) *Assembly of the SMRT-histone deacetylase 3 repression complex requires the TCP-1 ring complex*. Genes Dev. 16: 3130-3135.

Gunin, A.G.; Kapitova, I.N. y Suslonova, N.V. (2005) *Effects of histone deacetylase inhibitors on estradiol-induced proliferation and hyperplasia formation in the mouse uterus*. J Endocrinol. 185: 539-549.

Gunin, A.G.; Mashin, I.N. y Zakharov, D.A. (2001) *Proliferation, mitosis orientation and morphogenetic changes in the uterus of mice following chronic treatment with both estrogen and glucocorticoid hormones*. J Endocrinol. 169: 23-31.

Halachmi, S.; Marden, E.; Martin, G.; MacKay, H.; Abbondanza, C. y Brown, M. (1994) *Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription*. Science. 264: 1455-1458.

Hall, J.M. y McDonnell, D.P. (2005) *Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting*. Mol Interv. 5: 343-357.

Hapangama, D.K.; Kamal, A.M. y Bulmer, J.N. (2015) *Estrogen receptor beta: the guardian of the endometrium*. Hum Reprod Update. 21: 174-193.

Haqq, C.M. y Donahoe, P.K. (1998) *Regulation of sexual dimorphism in mammals*. Physiol Rev. 78: 1-33.

Harlow, E. y Lane, D. (2014) *Antibodies. A laboratory manual*. 2nd, (Eds.: Greenfield, E.A.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. EE.UU.

Hayashi, K.; Yoshioka, S.; Reardon, S.N.; Rucker, E.B., 3rd; Spencer, T.E.; DeMayo, F.J.; Lydon, J.P. y MacLean, J.A., 2nd (2011) *WNTs in the neonatal mouse uterus: potential regulation of endometrial gland development*. Biol Reprod. 84: 308-319.

Helton, E.S.; Zhu, J. y Chen, X. (2006) *The unique NH2-terminally deleted (DeltaN) residues, the PXXP motif, and the PPXY motif are required for the transcriptional activity of the DeltaN variant of p63*. J Biol Chem. 281: 2533-2542.

Hernandez-Valencia, M. y Zarate, A. (2010) *[Genetic and hormonal effects on sexual differentiation. Paradoxically women require androgens and men estrogens]*. Ginecol Obstet Mex. 78: 365-370.

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G. y Watson, R. (1993) *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y). 11: 1026-1030.

Hughes, T.A. (2006) *Regulation of gene expression by alternative untranslated regions*. Trends Genet. 22: 119-122.

Illingworth, R.; Kerr, A.; Desousa, D.; Jorgensen, H.; Ellis, P.; Stalker, J.; Jackson, D.; Clee, C.; Plumb, R.; Rogers, J.; y col. (2008) *A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci*. PLoS Biol. 6: e22.

Ishii, H.; Kobayashi, M. y Sakuma, Y. (2010) *Alternative promoter usage and alternative splicing of the rat estrogen receptor alpha gene generate numerous mRNA variants with distinct 5'-ends*. J Steroid Biochem Mol Biol. 118: 59-69.

Jarzabek, K.; Koda, M.; Walentowicz-Sadlecka, M.; Grabiec, M.; Laudanski, P. y Wolczynski, S. (2013) *Altered expression of ERs, aromatase, and COX2 connected to estrogen action in type 1 endometrial cancer biology*. Tumour Biol. 34: 4007-4016.

Jeong, J.W.; Lee, H.S.; Franco, H.L.; Broaddus, R.R.; Taketo, M.M.; Tsai, S.Y.; Lydon, J.P. y DeMayo, F.J. (2009) *beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus*. Oncogene. 28: 31-40.

Junqueira, L.C. y Junqueira, L.M. (1983) *Técnicas básicas en citología e histología*. (Eds.) Livraria Santos. Com. Imp. Ltda, Rua Augusta, São Paulo, Brasil.

Kass, L.; Altamirano, G.A.; Bosquiazzo, V.L.; Luque, E.H. y Muñoz-de-Toro, M. (2012) *Perinatal exposure to xenoestrogens impairs mammary gland differentiation and modifies milk composition in Wistar rats*. Reprod Toxicol. 33: 390-400.

Kass, L.; Durando, M.; Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Powell, C.E.; Luque, E.H. y Muñoz-de-Toro, M. (2004) *Association of increased estrogen receptor beta2 expression with parity-induced alterations in the rat mammary gland*. J Steroid Biochem Mol Biol. 91: 29-39.

Kato, J.; Hirata, S.; Koh, T.; Yamada-Mouri, N.; Hoshi, K. y Okinaga, S. (1998) *The multiple untranslated first exons and promoters system of the oestrogen receptor gene in the brain and peripheral tissues of the rat and monkey and the developing rat cerebral cortex*. J Steroid Biochem Mol Biol. 65: 281-293.

Kato, M. (2005) *WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review)*. Oncol Rep. 14: 1583-1588.

Khalyfa, A.; Klinge, C.M.; Hall, W.C.; Zhao, X.; Miller, M.M. y Wang, E. (2003) *Transcription profiling of estrogen target genes in young and old mouse uterus*. Exp Gerontol. 38: 1087-1099.

Kirikoshi, H. y Kato, M. (2002) *Expression of WNT7A in human normal tissues and cancer, and regulation of WNT7A and WNT7B in human cancer*. Int J Oncol. 21: 895-900.

Klein-Hitpass, L.; Tsai, S.Y.; Weigel, N.L.; Allan, G.F.; Riley, D.; Rodriguez, R.; Schrader, W.T.; Tsai, M.J. y O'Malley, B.W. (1990) *The progesterone receptor stimulates cell-free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex*. Cell. 60: 247-257.

Kohn, A.D. y Moon, R.T. (2005) *Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways*. Cell Calcium. 38: 439-446.

Kos, M.; Reid, G.; Denger, S. y Gannon, F. (2001) *Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region*. Mol Endocrinol. 15: 2057-2063.

Koster, M.I.; Kim, S.; Mills, A.A.; DeMayo, F.J. y Roop, D.R. (2004) *p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program*. Genes Dev. 18: 126-131.

Kouwenhoven, E.N.; van Bokhoven, H. y Zhou, H. (2015) *Gene regulatory mechanisms orchestrated by p63 in epithelial development and related disorders*. Biochim Biophys Acta. 1849: 590-600.

Kumar, R. y Thompson, E.B. (1999) *The structure of the nuclear hormone receptors*. Steroids. 64: 310-319.

Kundakovic, M. y Champagne, F.A. (2011) *Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A*. Brain Behav Immun. 25: 1084-1093.

Kurita, T. (2011) *Normal and abnormal epithelial differentiation in the female reproductive tract*. Differentiation. 82: 117-126.

Kurita, T.; Cooke, P.S. y Cunha, G.R. (2001) *Epithelial-stromal tissue interaction in paramesonephric (Mullerian) epithelial differentiation*. Dev Biol. 240: 194-211.

Kurita, T. y Cunha, G.R. (2001) *Roles of p63 in differentiation of Mullerian duct epithelial cells*. Ann N Y Acad Sci. 948: 9-12.

Kurita, T.; Cunha, G.R.; Robboy, S.J.; Mills, A.A. y Medina, R.T. (2005) *Differential expression of p63 isoforms in female reproductive organs*. Mech Dev. 122: 1043-1055.

Kurita, T.; Mills, A.A. y Cunha, G.R. (2004) *Roles of p63 in the diethylstilbestrol-induced cervicovaginal adenosis*. Development. 131: 1639-1649.

Kurita, T. y Nakamura, H. (2008) *Embryology of the uterus*. En: *Endometrium*, (Eds.: Aplin, J.D., Fazleabas, A.T., y Giudice, L.C.), UK Ltd, London, p. 1-18.

Lawson, P.T. (2001) *Genetics and breeding*. En: *Laboratory animal technician training manual* (Eds.: Lawson, P.T.), American Association for Laboratory Animal Science, Memphis, Tenn, p. 27-37.

Li, X.; Ying, G.G.; Su, H.C.; Yang, X.B. y Wang, L. (2010) *Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles*. Environ Int. 36: 557-562.

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.

Liu, X.F. y Bagchi, M.K. (2004) *Recruitment of distinct chromatin-modifying complexes by tamoxifen-complexed estrogen receptor at natural target gene promoters in vivo*. J Biol Chem. 279: 15050-15058.

Lohmiller, J.J. y Swing, S.P. (2006) *Reproduction and breeding*. En: *The laboratory rat*. , (Eds.: Suckow, M.A., Weisbroth, S.H., y Franklin, C.L.), American College of Laboratory Animal Medicine Series, Academic Press, p. 147-165.

Lonard, D.M. y O'Malley, B.W. (2012) *Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets*. Nat Rev Endocrinol. 8: 598-604.

Lu, K.H.; Hopper, B.R.; Vargo, T.M. y Yen, S.S. (1979) *Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states*. Biol Reprod. 21: 193-203.

Ma, L. (2009) *Endocrine disruptors in female reproductive tract development and carcinogenesis*. Trends Endocrinol Metab. 20: 357-363.

Mangiulli, M.; Valletti, A.; Caratozzolo, M.F.; Tullo, A.; Sbisà, E.; Pesole, G. y D'Erchia, A.M. (2009) *Identification and functional characterization of two new transcriptional variants of the human p63 gene*. Nucleic Acids Res. 37: 6092-6104.

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, R.; Taylor, M.B.; Krikun, G.; Lockwood, C.; Akbas, G.E. y Taylor, H.S. (2007) *Differential cell-specific modulation of HOXA10 by estrogen and specificity protein 1 response elements*. J Clin Endocrinol Metab. 92: 1920-1926.

Matsushima, A.; Kakuta, Y.; Teramoto, T.; Koshihara, T.; Liu, X.; Okada, H.; Tokunaga, T.; Kawabata, S.; Kimura, M. y Shimohigashi, Y. (2007) *Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma*. J Biochem. 142: 517-524.

McCampbell, A.S.; Walker, C.L.; Broaddus, R.R.; Cook, J.D. y Davies, P.J. (2008) *Developmental reprogramming of IGF signaling and susceptibility to endometrial hyperplasia in the rat*. Lab Invest. 88: 615-626.

McLachlan, J.A.; Newbold, R.R. y Bullock, B.C. (1980) *Long-term effects on the female mouse genital tract associated with prenatal exposure to diethylstilbestrol*. Cancer Res. 40: 3988-3999.

Mericskay, M.; Kitajewski, J. y Sassoon, D. (2004) *Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus*. Development. 131: 2061-2072.

Milgrom, E.; Atger, M. y Baulieu, E.E. (1970) *Progesterone in uterus and plasma. IV. Progesterone receptor(s) in guinea pig uterus cytosol*. Steroids. 16: 741-754.

Miller, C.; Degenhardt, K. y Sassoon, D.A. (1998a) *Fetal exposure to DES results in de-regulation of Wnt7a during uterine morphogenesis*. Nat Genet. 20: 228-230.

Miller, C.; Pavlova, A. y Sassoon, D.A. (1998b) *Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle*. Mech Dev. 76: 91-99.

Miller, C. y Sassoon, D.A. (1998) *Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract*. Development. 125: 3201-3211.

Mills, A.A.; Zheng, B.; Wang, X.J.; Vogel, H.; Roop, D.R. y Bradley, A. (1999) *p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis*. Nature. 398: 708-713.

Miyamoto, K. y Kotake, M. (2006) *Estimation of daily bisphenol a intake of Japanese individuals with emphasis on uncertainty and variability*. Environ Sci. 13: 15-29.

Monje, L. (2009) *Estrógenos ambientales y fertilidad: efecto de xenoestrógenos sobre el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Consecuencias de la exposición neonatal temprana sobre el sistema Límbico*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

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.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. y Ramos, J.G. (2009) *Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat*. Reprod Toxicol. 28: 435-442.

Montes, G.S. y Luque, E.H. (1988) *Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat*. Acta Anat (Basel). 133: 192-199.

Moon, R.T.; Brown, J.D. y Torres, M. (1997) *WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development*. Trends Genet. 13: 157-162.

Muñoz-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.

Muñoz de Toro, M.; Maffini, M.V.; Giardina, R.H. y Luque, E.H. (1998) *Processing fine needle aspirates of prostate carcinomas for standard immunocytochemical studies and in situ apoptosis detection*. *Pathol Res Pract*. 194: 631-636.

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.

Nalbandov, A.V. (1969) *La estructura de los sistemas reproductores*. En: *Fisiología de la Reproducción*, (Eds.: Nalbandov, A.V. Zaragoza, España, p. 26-62.

National Research Council (1999) *Hormonally Active Agents in the Environment*. (Eds.: National Research Council) The National Academies Press, Washington, DC.

Newbold, R.R.; Jefferson, W.N. y Padilla-Banks, E. (2007) *Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract*. *Reprod Toxicol*. 24: 253-258.

Newbold, R.R.; Jefferson, W.N. y Padilla-Banks, E. (2009) *Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life*. *Environ Health Perspect*. 117: 879-885.

Nicolae, A.; Preda, O. y Nogales, F.F. (2011) *Endometrial metaplasias and reactive changes: a spectrum of altered differentiation*. *J Clin Pathol*. 64: 97-106.

Niklaus, A.L.; Aubuchon, M.; Zapantis, G.; Li, P.; Qian, H.; Isaac, B.; Kim, M.Y.; Adel, G.; Pollard, J.W. y Santoro, N.F. (2007) *Assessment of the proliferative status of epithelial cell types in the endometrium of young and menopausal transition women*. *Hum Reprod*. 22: 1778-1788.

Ojeda, S.R. y Urbanski, H.F. (1994) *Puberty in the rat*. En: *The Physiology of Reproduction* (Eds.: Knobil, E., y Neill, J.D.), Raven Press Ltd, New York, p. 363-409.

Onate, S.A.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J. y O'Malley, B.W. (1995) *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. *Science*. 270: 1354-1357.

Painter, T.S. (1923) *Further Observations on the Sex Chromosomes of Mammals*. *Science*. 58: 247-248.

Patel, B.; Elguero, S.; Thakore, S.; Dahoud, W.; Bedaiwy, M. y Mesiano, S. (2015) *Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology*. *Hum Reprod Update*. 21: 155-173.

Pavlova, A.; Boutin, E.; Cunha, G. y Sassoon, D. (1994) *Msx1 (Hox-7.1) in the adult mouse uterus: cellular interactions underlying regulation of expression*. Development. 120: 335-345.

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.

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Bosquiazso, V.L.; Luque, E.H. y Muñoz-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.; Monje, L.; Moreno-Piovan, G.; Muñoz-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.

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Muñoz De Toro, M. y Luque, E.H. (2001) *Prenatal exposure to low doses of bisphenol A alters the periductal stroma and glandular cell function in the rat ventral prostate*. Biol Reprod. 65: 1271-1277.

Ray, S. y Das, S.K. (2006) *Chromatin immunoprecipitation assay detects ERalpha recruitment to gene specific promoters in uterus*. Biol Proced Online. 8: 69-76.

Reed, C.E. y Fenton, S.E. (2013) *Exposure to diethylstilbestrol during sensitive life stages: a legacy of heritable health effects*. Birth Defects Res C Embryo Today. 99: 134-146.

Rey, F.; Gonzalez, M.; Zayas, M.A.; Stoker, C.; Durando, M.; Luque, E.H. y Muñoz-de-Toro, M. (2009) *Prenatal exposure to pesticides disrupts testicular histoarchitecture and alters testosterone levels in male Caiman latirostris*. Gen Comp Endocrinol. 162: 286-292.

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.; Varayoud, J.; Rodriguez, H.A.; Muñoz-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.; Bosquiazso, 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.

---

Rocheftort, H. (2013) *[Bisphenol A and hormone-dependent cancers: potential risk and mechanism]*. Med Sci (Paris). 29: 539-544.

Rodriguez, H.A.; Santambrosio, N.; Santamaria, C.G.; Muñoz-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.

Rubin, B.S. (2011) *Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects*. J Steroid Biochem Mol Biol. 127: 27-34.

Rudel, R.A.; Gray, J.M.; Engel, C.L.; Rawsthorne, T.W.; Dodson, R.E.; Ackerman, J.M.; Rizzo, J.; Nudelman, J.L. y Brody, J.G. (2011) *Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethyhexyl) phthalate exposure: findings from a dietary intervention*. Environ Health Perspect. 119: 914-920.

Sahlin, L.; Masironi, B.; Akerberg, S. y Eriksson, H. (2006) *Tissue- and hormone-dependent progesterone receptor distribution in the rat uterus*. Reprod Biol Endocrinol. 4: 47.

Salian-Mehta, S.; Doshi, T. y Vanage, G. (2014) *Exposure of neonatal rats to the endocrine disrupter Bisphenol A affects ontogenic expression pattern of testicular steroid receptors and their coregulators*. J Appl Toxicol. 34: 307-318.

Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning, a laboratory manual*. 3rd, (Eds.: Irwin, N., y Janssen, K.A.) Cold Spring Harbor Press, United States of America.

Sato, T.; Wang, G.; Hardy, M.P.; Kurita, T.; Cunha, G.R. y Cooke, P.S. (2002) *Role of systemic and local IGF-I in the effects of estrogen on growth and epithelial proliferation of mouse uterus*. Endocrinology. 143: 2673-2679.

Schonfelder, G.; Friedrich, K.; Paul, M. y Chahoud, I. (2004) *Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring*. Neoplasia. 6: 584-594.

Sivridis, E.; Giatromanolaki, A.; Koukourakis, M. y Anastasiadis, P. (2001) *Endometrial carcinoma: association of steroid hormone receptor expression with low angiogenesis and bcl-2 expression*. Virchows Arch. 438: 470-477.

Smith, C.L. (1998) *Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways*. Biol Reprod. 58: 627-632.

Smith, M.S.; Freeman, M.E. y Neill, J.D. (1975) *The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy*. Endocrinology. 96: 219-226.

Spencer, T.E.; Dunlap, K.A. y Filant, J. (2012) *Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption*. Mol Cell Endocrinol. 354: 34-53.

Stefansson, I.M.; Salvesen, H.B. y Akslen, L.A. (2006) *Loss of p63 and cytokeratin 5/6 expression is associated with more aggressive tumors in endometrial carcinoma patients*. Int J Cancer. 118: 1227-1233.

Stoker, C.; Beldomenico, P.M.; Bosquiazzo, V.L.; Zayas, M.A.; Rey, F.; Rodriguez, H.; Muñoz-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.; Rey, F.; Rodriguez, H.; Ramos, J.G.; Sirosky, P.; Larriera, A.; Luque, E.H. y Muñoz-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.

Suvorov, A. y Waxman, D.J. (2015) *Early programming of uterine tissue by bisphenol A: Critical evaluation of evidence from animal exposure studies*. Reprod Toxicol. 57: 59-72.

Takahashi, O. y Oishi, S. (2000) *Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses*. Environ Health Perspect. 108: 931-935.

Taylor, H.S.; Vanden Heuvel, G.B. y Igarashi, P. (1997) *A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes*. Biol Reprod. 57: 1338-1345.

Toft, D. y Gorski, J. (1966) *A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A. 55: 1574-1581.

Tulac, S.; Nayak, N.R.; Kao, L.C.; Van Waes, M.; Huang, J.; Lobo, S.; Germeyer, A.; Lessey, B.A.; Taylor, R.N.; Suchanek, E.; y col. (2003) *Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium*. J Clin Endocrinol Metab. 88: 3860-3866.

Tyl, R.W. (2014) *Abbreviated assessment of bisphenol A toxicology literature*. Semin Fetal Neonatal Med. 19: 195-202.

Vainio, S.; Heikkila, M.; Kispert, A.; Chin, N. y McMahon, A.P. (1999) *Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling*. Nature. 397: 405-409.

Vaiserman, A. (2014) *Early-life Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and Later-life Health Outcomes: An Epigenetic Bridge?* Aging Dis. 5: 419-429.

Vaitukaitis, J.; Robbins, J.B.; Nieschlag, E. y Ross, G.T. (1971) *A method for producing specific antisera with small doses of immunogen*. J Clin Endocrinol Metab. 33: 988-991.

van der Horst, P.H.; Wang, Y.; van der Zee, M.; Burger, C.W. y Blok, L.J. (2012) *Interaction between sex hormones and WNT/beta-catenin signal*

---

*transduction in endometrial physiology and disease. Mol Cell Endocrinol. 358: 176-184.*

Vandenberg, A.L. y Sassoon, D.A. (2009) *Non-canonical Wnt signaling regulates cell polarity in female reproductive tract development via van gogh-like 2. Development. 136: 1559-1570.*

Vandenberg, L.N.; Chahoud, I.; Heindel, J.J.; Padmanabhan, V.; Paumgartten, F.J. y Schoenfelder, G. (2012) *Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. Cien Saude Colet. 17: 407-434.*

Vandenberg, L.N.; Ehrlich, S.; Belcher, S.M.; Ben-Jonathan, N.; Dolinoy, D.C.; Hugo, E.R.; Hunt, P.A.; Newbold, R.R.; Rubin, B.S.; Sali, K.S.; y col. (2013) *Low dose effects of bisphenol A. An integrated review of in vitro, laboratory animal, and epidemiology studies. Endocrine Disruptors 1:1, e25078.*

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Bosquiazzo, V.L.; Lower, M.; Muñoz-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.; Bosquiazzo, V.L.; Muñoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2008) *Developmental exposure to Bisphenol a impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult. Endocrinology. 149: 5848-5860.*

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Monje, L.; Bosquiazzo, V.; Muñoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2005) *The estrogen receptor alpha sigma3 mRNA splicing variant is differentially regulated by estrogen and progesterone in the rat uterus. J Endocrinol. 186: 51-60.*

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Muñoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2014) *Long-lasting effects of neonatal bisphenol a exposure on the implantation process. En: Vitamins and Hormones, (Eds.: Vitamins and Hormones), Elsevier, Burlington, p. 253-275.*

Vigier, B.; Forest, M.G.; Eychenne, B.; Bezard, J.; Garrigou, O.; Robel, P. y Josso, N. (1989) *Anti-Mullerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. Proc Natl Acad Sci U S A. 86: 3684-3688.*

vom Saal, F.S.; Finch, C.E. y Nelson, J.F. (1994) *Natural History and Mechanisms of Reproductive Aging in Humans, Laboratory Rodents, and Other Selected Vertebrates. En: The Physiology of Reproduction, (Eds.: Knobil, E., y Neill, J.D.), Raven Press Ltd, New York, p. 1213-1314.*

vom Saal, F.S. y Hughes, C. (2005) *An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. Environ Health Perspect. 113: 926-933.*

Weibel, E.R. (1969) *Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology*. Int Rev Cytol. 26: 235-302.

Westwood, F.R. (2008) *The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging*. Toxicol Pathol. 36: 375-384.

Winuthayanon, W.; Hewitt, S.C.; Orvis, G.D.; Behringer, R.R. y Korach, K.S. (2010) *Uterine epithelial estrogen receptor alpha is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses*. Proc Natl Acad Sci U S A. 107: 19272-19277.

Wood, G.A.; Fata, J.E.; Watson, K.L. y Khokha, R. (2007) *Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus*. Reproduction. 133: 1035-1044.

Woosley, J.T. (1991) *Measuring cell proliferation*. Arch Pathol Lab Med. 115: 555-557.

Yang, A.; Kaghad, M.; Wang, Y.; Gillett, E.; Fleming, M.D.; Dotsch, V.; Andrews, N.C.; Caput, D. y McKeon, F. (1998) *p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities*. Mol Cell. 2: 305-316.

Yang, A.; Schweitzer, R.; Sun, D.; Kaghad, M.; Walker, N.; Bronson, R.T.; Tabin, C.; Sharpe, A.; Caput, D.; Crum, C.; y col. (1999) *p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development*. Nature. 398: 714-718.

Yang, L.; Luo, L.; Ji, W.; Gong, C.; Wu, D.; Huang, H.; Liu, Q.; Xia, B.; Hu, G.; Zhang, W.; y col. (2013) *Effect of low dose bisphenol A on the early differentiation of human embryonic stem cells into mammary epithelial cells*. Toxicol Lett. 218: 187-193.

Ye, X.; Kuklennyik, Z.; Needham, L.L. y Calafat, A.M. (2006) *Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 831: 110-115.

York, B. y O'Malley, B.W. (2010) *Steroid receptor coactivator (SRC) family: masters of systems biology*. J Biol Chem. 285: 38743-38750.

Zimmerman-Downs, J.M.; Shuman, D.; Stull, S.C. y Ratzlaff, R.E. (2010) *Bisphenol A blood and saliva levels prior to and after dental sealant placement in adults*. J Dent Hyg. 84: 145-150.

Zoeller, R.T.; Brown, T.R.; Doan, L.L.; Gore, A.C.; Skakkebaek, N.E.; Soto, A.M.; Woodruff, T.J. y Vom Saal, F.S. (2012) *Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society*. Endocrinology. 153: 4097-4110.

**URL de sitios web que fueron citados en esta tesis**

<http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>

<http://www.nursa.org/nursa/molecules/index.jsf>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>