

## Efectos de la administración de bisfenol A en etapas clave de la maduración sexual

### *Effects of bisphenol A administration during critical stages of sexual development*

Nancy Cardoso<sup>1</sup>, Matías Pandolfi<sup>3</sup>, Osvaldo Ponzo<sup>1</sup>, Silvia Carbone<sup>2</sup>, Romina Penalba<sup>1</sup>, Mariana Di-cugno<sup>4</sup>, Pablo Scacchi<sup>2</sup>, Roxana Reynoso<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Endocrinología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

<sup>2</sup>Facultad de Medicina CONICET.

<sup>3</sup>Laboratorio de Embriología Animal DBBE, FCE y N, UBA. <sup>4</sup>Hospital Británico.

Correspondencia a: Dra. Roxana Reynoso

Laboratorio de Endocrinología, Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155 (C1121ABG) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

E-mail: [rreynoso@fmed.uba.ar](mailto:rreynoso@fmed.uba.ar)

#### Resumen

El bisfenol A (BPA) es un compuesto estrogénico utilizado en la fabricación de plásticos policarbonatos, que tiene efectos deletéreos sobre el eje reproductor de los individuos expuestos y el de su descendencia. El BPA actuaría sobre el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal de ratas hembra modificando sus procesos de maduración. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del BPA sobre la maduración del eje reproductor de ratas hembra peripúberes expuestas a este compuesto desde el inicio de la gestación y durante la lactancia (Grupo 1, 2,5 mg/kg/día) y otro grupo (Grupo 2, 6,0 mg/kg/día) expuesto desde los 21 días y hasta los 30 días de edad. Se administró BPA en el agua de bebida o etanol al 0,1% (grupo control), (n=10/grupo). Se determinó LH, FSH (RIA, ng/ml), estradiol (ELISA, pg/ml), se evaluaron peso corporal y pesos relativos de útero y ovario. Se realizó estudio histológico de cortes de ovario y útero.

Grupo 1, los niveles de LH y estradiol aumentaron significativamente (Control:  $11 \pm 1,0$  vs. BPA:  $40 \pm 4,0$ ,  $p < 0,001$ ; Control:  $20 \pm 0,5$  vs. BPA:  $40 \pm 2,0$ ,  $p < 0,0001$ ), mientras los de FSH mostraron tendencia al aumento pero éste no fue significativo. Los pesos corporales y el peso relativo del ovario no se modificaron con el tratamiento. El estudio histológico mostró mayor número de folículos maduros y desarrollo de células de la teca y epitelio cilíndrico en útero de los animales tratados.

Grupo 2, LH y estradiol aumentaron significativamente (Control:  $3,3 \pm 0,3$  vs. BPA:  $5,1 \pm 0,3$ ,  $p < 0,01$ ; Control:  $25,0 \pm 0,5$  vs. BPA:  $27,1 \pm 0,7$ ,  $p < 0,05$ ). La FSH, si bien mostró tendencia a aumentar, ésta no fue significativa. Los pesos corporales y los pesos relativos de ovario y útero no se modificaron con este tratamiento. En la histología se observa mayor desarrollo de la teca

interna y un mayor número de folículos maduros en los animales tratados. No se encontraron diferencias evidentes en el alto del epitelio uterino.

La exposición aguda o crónica a BPA en etapas clave de la maduración sexual modifica la actividad del eje reproductor. Los resultados obtenidos sugieren que el BPA ejercería su efecto estrogénico, actuando sobre los mecanismos de retroalimentación positivos.

**Palabras clave:** bisfenol A, gonadotropinas, estradiol, exposición aguda, exposición crónica.

#### Abstract

*Bisphenol A (BPA) is an estrogenic compound used in the manufacture of polycarbonate plastic. It has deleterious effects on the reproductive axis in human and wildlife, both in individuals exposed to it and their descendants. Evidence suggests that BPA exerts its influence on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of female rats by interfering with its maturation process. The aim of the present study was to analyse the effect of BPA on maturation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of peripuberal female rats, exposed to it since the beginning of the gestation and during the lactation period (Group 1, 2.5 mg/kg/day), and from the age of 21 days till the age of 30 (Group 2, 6.0 mg/kg/day). The animals were treated with BPA or 0.1% ethanol (Control Group) in their drinking water (n=10/group). LH, FSH (RIA, ng/ml) and estradiol (ELISA, pg/ml) were measured in serum. Ovaries and uterus relative weights were obtained. Histological studies were performed on several sections of uterus and ovaries.*

*Group 1, LH and estradiol serum levels increased significantly (Control:  $11 \pm 1.0$  vs. BPA:  $40 \pm 4.0$ ,  $p < 0.001$ ; Control:  $20 \pm 0.5$  vs BPA:  $40 \pm 2.0$ ,  $p <$*

0.0001). FSH levels showed an increasing trend as well, but this was not statistically significant. Corporal weights and ovaries relative weights were not modified by treatment. Histological studies showed an increase in the total number of mature follicles, and development of the theca cells and ovarian stroma, in animals exposed to BPA.

Group 2, LH and estradiol serum levels increased significantly (Control:  $3.3 \pm 0.3$  vs. BPA:  $5.1 \pm 0.3$ ,  $p < 0.01$ ; Control:  $25.0 \pm 0.5$  vs. BPA:  $27.1 \pm 0.7$ ,  $p < 0.05$ ). Although FSH levels exhibited an increasing trend, this did not reach statistical significance. Corporal weights and ovaries and uterus relative weights were not modified by treatment. Histological studies revealed major development of the internal theca, and an increase in the number of mature follicles, in those animals under treatment. No significant differences were found in the height of the epithelium of the uterus.

Acute or chronic exposure to BPA during critical stages of sexual development modifies the activity of the reproductive axis. The results obtained suggest that BPA may exert its estrogenic effect, acting on the positive feedback mechanism.

## Introducción

Los disruptores endocrinos (DE) son compuestos químicos ambientales que interfieren con el sistema endocrino. Su toxicidad está mediada principalmente por los receptores de hormonas esteroides, receptor estrogénico (ER) y androgénico (AR)<sup>1,2</sup>, pueden actuar como agonistas o antagonistas de estos receptores y, por lo tanto, ejercer efectos estrogénicos o antiandrogénicos.

El bisfenol A es un DE utilizado en la fabricación de plásticos policarbonatos, que están presentes en la mayoría de los envases alimenticios, resinas epoxi que cubren el interior de las latas de conserva, fabricación de pegamentos de uso habitual, cañerías y selladores dentales usados en odontología. Estudios realizados tanto in vivo como in vitro han reportado que el BPA posee efecto estrogénico, ya que puede unirse con baja afinidad a ambas isoformas del receptor (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) y ocasionar, en consecuencia, desórdenes reproductivos tales como adelanto de la pubertad, estimulación del desarrollo de glándulas mamarias, reducción del número de crías vivas por camada en diferentes cepas de ratas o ratones<sup>3,4</sup>.

En ratas hembra en particular, se ha observado que la exposición al BPA provoca adelantamiento de la edad de apertura vaginal, irregularidades en el ciclo estral, como por ejemplo prolongación del ciclo o fase estral persistente e incremento del peso uterino<sup>5</sup>. Estudios recientes han sugerido que el BPA podría producir también alteraciones en el ser humano, ya que se han encontrado niveles detectables de éste en suero de hombres y mujeres, en leche materna, tejido placentario y líquido

amniótico<sup>6-8</sup>. Con relación a estos hallazgos, muchos autores sugieren que la exposición a DE, entre ellos el BPA, podría ser la responsable de la alta incidencia de cáncer mamario, de testículo y próstata y disfunciones reproductivas<sup>9,10</sup>.

La exposición al BPA tiene diferentes efectos, de acuerdo con el tiempo de exposición. La exposición durante la etapa adulta produce efectos que son generalmente reversibles. La exposición durante etapas clave del desarrollo podría provocar alteraciones permanentes de los sistemas afectados. La ventana de vulnerabilidad, también conocida como período crítico, durante la cual el sistema en desarrollo es más sensible a la exposición, son características comunes de los efectos permanentes<sup>4</sup>. Los períodos críticos en el desarrollo de los diferentes tejidos son la etapa prenatal, neonatal y lactacional, y también la etapa que atraviesa la pubertad, período de transición fisiológica a la fertilidad. Estudios experimentales han demostrado el efecto nocivo del bisfenol A en ratas expuestas al DE durante los mencionados períodos críticos, como por ejemplo, cambios estructurales en áreas cerebrales relacionadas con la diferenciación sexual, alteraciones en receptores para progesterona en hipotálamo, trastornos de la conducta sexual, aumento del peso del útero, como así también trastornos en el desarrollo genital de machos y hembras.

## Objetivos

Considerando los hallazgos previos, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del disruptor endocrino bisfenol A sobre el eje reproductor de ratas hembra peripúberes expuestas a este compuesto en etapas clave de la maduración sexual.

## Materiales y métodos

### Animales y tratamiento

Se utilizaron ratas Wistar hembra (peso 250-300 g) provenientes del Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron alojados individualmente en jaulas metálicas con viruta de madera, mantenidos en un ambiente de luz y temperatura controladas (período de luz de 07:00 a 19:00 h, T: 22-24 °C) y con acceso al alimento y al agua de bebida a voluntad. Los experimentos comenzaron luego de la aclimatación al ciclo de luz-oscuridad durante una semana, momento en el cual una rata Wistar macho (peso 300-350 g) y una hembra fueron alojadas en una misma jaula, hasta que el apareamiento fue confirmado por la presencia del tapón vaginal. El día de su aparición se consideró día de gestación 0 (DG0). Las hembras preñadas fueron separadas y colocadas individualmente en cajas metálicas. Se realizaron dos tratamientos en dos grupos distintos de animales: el de

nominado crónico, durante la etapa prenatal y posnatal temprana, y el agudo, durante la etapa peripuberal. Para el tratamiento crónico, a las ratas madre se les administró etanol 0,1% (grupo control, n=10) o BPA (4,4' Isopropylidene-Diphenol, MP Biomedicals LLC, Alemania) disuelto en etanol (grupo tratado, n=10), desde el inicio de la gestación (DG 0) y durante el período de lactancia, 21 días luego del nacimiento (DPN 21), momento en el cual las crías hembra fueron destetadas, finalizando así el período de tratamiento. El BPA fue disuelto en etanol 100% hasta una concentración de 25 mg/ml, se realizó posteriormente una dilución 1:1000 con agua corriente para obtener una concentración final de 25 mg/l. La dosis aproximada de exposición (DAE) fue de 2,5 mg/kg/día, la cual era 20 veces menor a la NOAEL (50 mg/kg/día)<sup>11,12</sup>. Estas estimaciones fueron realizadas mediante la observación y medición de la diferencia de cantidad de agua colocada inicialmente en la botella y la cantidad remanente al día siguiente. Los cálculos asumen que toda el agua faltante en la botella fue consumida, no se tuvo en cuenta una posible pérdida o evaporación del agua o la pérdida de actividad del BPA durante el período de 24 h. El nivel de BPA que afectó a las crías durante la gestación o el ingerido posnatalmente por las crías durante el período de lactancia no fueron tenidos en cuenta en estos experimentos.

Para los experimentos realizados en forma aguda, las crías hembra fueron separadas de la madre a los 21 días de edad (DPN 21) y colocadas en jaulas metálicas hasta su sacrificio (DPN 30). A este grupo de animales se les administró etanol al 0,1% (grupo control, n=10) o BPA (4,4' Isopropylidene-Diphenol, MP Biomedicals LLC, Alemania) disuelto en etanol (grupo tratado, n=10). El BPA fue disuelto en etanol al 100% hasta una concentración de 60 mg/ml, se realizó posteriormente una dilución 1:1000 con agua corriente para obtener una concentración final de 60 mg/l. La dosis aproximada de exposición (DAE) fue de 6,0 mg/kg/día. Cada una de las soluciones fue administrada con el agua de bebida. La dosis mayor utilizada en estos experimentos fue similar a la mayor dosis de exposición humana reportada en trabajos previos<sup>13-16</sup>. Por otra parte, es importante aclarar que la ruta de administración oral fue elegida para mimetizar la ruta más común de exposición al BPA en los humanos.

#### *Efecto del BPA sobre el desarrollo*

Luego del nacimiento, se determinó el número de crías, se realizó un examen físico detallado y se controló el peso a lo largo de su crecimiento y hasta el día del sacrificio. Este día se determinó el peso de órganos sexuales y el peso corporal, y finalmente se calcularon los pesos relativos de cada órgano ([peso órgano/peso

corporal-peso órgano] x 100).

#### **Efecto del BPA sobre hipófisis y órganos reproductores**

Para evaluar los efectos del BPA sobre las gonadotropinas, la secreción de hormonas esteroides (estradiol) y la morfología de órganos reproductores, luego de la decapitación se recolectó sangre troncal y se determinó la concentración sérica de LH y FSH por radioinmunoensayo (RIA), y de estradiol por electroquimioluminiscencia (EQLIA). Para realizar los estudios histológicos se extrajeron tejidos de ovario y útero.

#### **Determinación de LH, FSH y esteroides sexuales**

La concentración sérica de LH fue determinada por duplicado utilizando un radioinmunoensayo (RIA) con doble anticuerpo. El material para los ensayos fue provisto por el *NIAMDD Rat Pituitary Program*. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 8% y 10% respectivamente. Los datos son expresados en ng/ml de acuerdo con la preparación de los estándares de referencia (rat LH-IRP1). La concentración sérica de FSH fue determinada por duplicado utilizando un radioinmunoensayo (RIA) con doble anticuerpo. Los materiales para el ensayo fueron provistos por el *NIAMDD Rat Pituitary Program*. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 8% y del 10%, respectivamente. Los resultados son expresados en ng/ml de acuerdo con la preparación de los estándares de referencia (rat FSH-IRP1). La concentración sérica de estradiol fue determinada por un inmunoensayo competitivo provisto por VITROS (*Immunodiagnostic Products Estradiol Reagent Pack, Ortho Clinical Diagnostics, Johnson and Johnson Company*). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 3,1% y del 7,0%, respectivamente. Los resultados son expresados en pg/ml.

#### **Estudios histológicos**

Posteriormente a la disección, los órganos fueron fijados durante 24 h por inmersión en líquido de Bouin y conservados a 4 °C. Luego las muestras fueron deshidratadas utilizando concentraciones crecientes de etanol, aclaradas en xileno y embebidas en Paraplast durante 6 horas (Fisherbrand, Fisher, WA, EE. UU.). Se realizaron cortes transversales de 7 µm con micrótopo, se montaron en portaobjetos y se colorearon con la técnica de hematoxilina-eosina. Finalmente las secciones fueron examinadas con un microscopio Nikon microphot fx y fotografiadas digitalmente (Nikon, Coolpix 4500).

#### *Análisis estadístico*

Las diferencias entre medias de 2 grupos experimentales fueron calculadas por el test de Student. Un valor de p<0,05 fue considerado significativo.

**Resultados**

Grupo 1: Tratamiento crónico, etapa prenatal y posnatal temprana; DAE: 2,5 mg/kg/día.

Como puede observarse en la Tabla 1, ni el peso corporal de los animales ni el del útero se modificaron de manera significativa. Sin embargo, el peso relativo de este órgano reproductor aumentó significativamente en los animales expuestos al disruptor ( $p < 0,01$ ). El peso de los ovarios disminuyó significativamente en los animales tratados ( $p < 0,01$ ), no así su peso relativo, el cual no mostró diferencias significativas en los animales tratados respecto al grupo control. Los niveles séricos de LH (Figura 1) y estradiol (Figura 3) aumentaron significativamente en los animales expuestos a BPA ( $p < 0,001$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente), mientras que los niveles séricos de FSH no se vieron modificados significativamente por el tratamiento, pero mostraron una tendencia al aumento (Figura 2). Las Figuras 4 y 5 muestran la histología de ovarios y útero respectivamente de animales control y tratado. En el ovario control se observa principalmente presencia de folículos primordiales y en crecimiento, también algunos folículos maduros. Las te-

cas de la mayoría de los folículos no se encuentran diferenciadas en teca externa e interna y es dificultoso distinguirlas del estroma ovárico. En los animales tratados se observan folículos maduros en mayor número, en los cuales se diferencia claramente la teca interna glandular de la teca externa fibrosa, con gran desarrollo de la interna, especialmente. En el caso de la histología uterina, en los animales control se observa un epitelio uterino simple cúbico bajo y la lámina propia con tejido conectivo denso y abundante. En los animales tratados, se observa un epitelio uterino simple cilíndrico y en algunos casos un tejido conectivo más laxo con mayor cantidad de vasos sanguíneos.

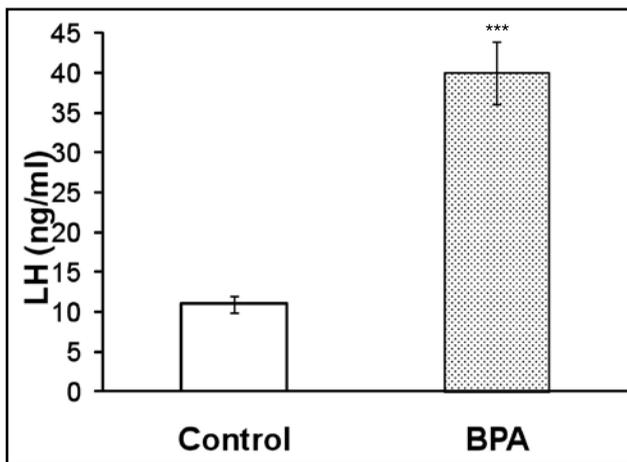
Grupo 2: Tratamiento agudo, etapa peripuberal; DAE: 6,0 mg/kg/día.

En el grupo de animales tratados en forma aguda, el peso corporal al momento del sacrificio, los pesos de órganos reproductores y sus pesos relativos (Tabla 2) no se modificaron significativamente ante la exposición a BPA.

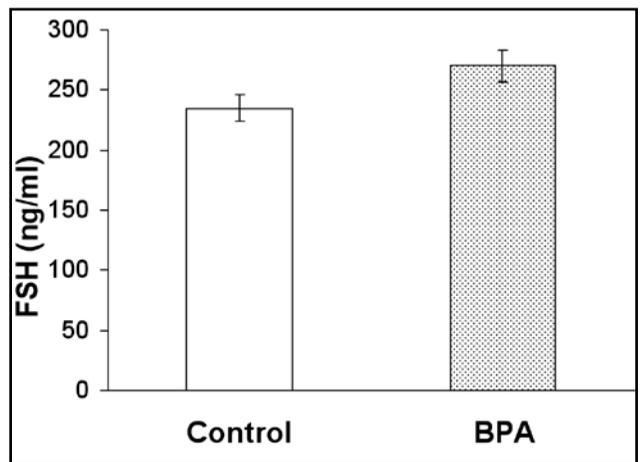
Cuando se evaluó el efecto del BPA sobre los niveles séricos de LH (Figura 6), FSH (Figura 7) y estradiol (Figura 8), se observó un incremento significativo en los

	CONTROL	BPA
<b>Peso corporal (g)</b>	79±1	75±5 <sup>NS</sup>
<b>Peso de ovarios (g)</b>	0,0171±0,0003	0,0153±0,0005**
<b>Peso uterino (g)</b>	0,074±0,002	0,070±0,003 <sup>NS</sup>
<b>Peso ovárico relativo</b>	0,0219±0,0003	0,0220±0,0004 <sup>NS</sup>
<b>Peso de útero relativo</b>	0,090±0,002	0,097±0,003**

**Tabla 1.** Peso corporal al momento del sacrificio, peso de órganos reproductores y pesos relativos de útero y ovario de animales tratados crónicamente. \*\* $p < 0,01$



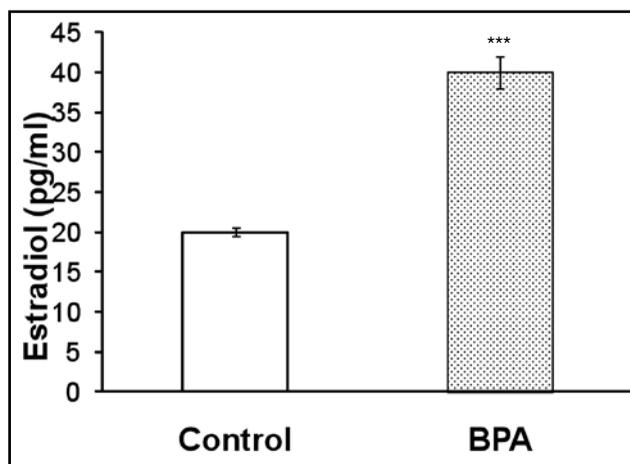
**Figura 1.** Efecto del tratamiento crónico con BPA sobre los niveles séricos de LH. Cada columna representa la media ± ESM de 10 determinaciones. \*\* $p < 0,001$  vs. Control.



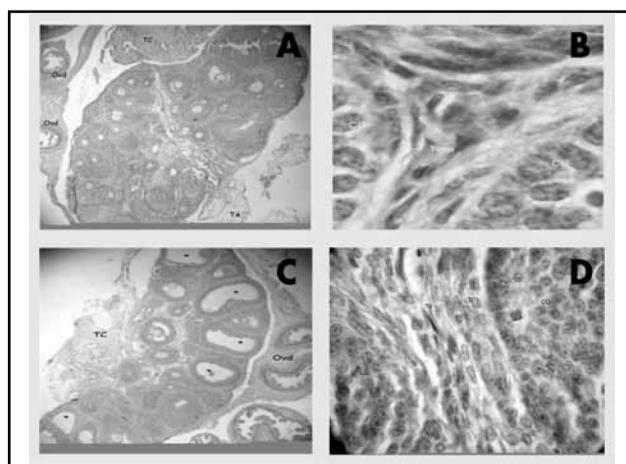
**Figura 2.** Efecto del tratamiento crónico con BPA sobre los niveles séricos de FSH. Cada columna representa la media ± ESM de 10 determinaciones.

	CONTROL	BPA
<b>Peso corporal (g)</b>	54±3	58±1 <sup>NS</sup>
<b>Peso de ovarios (g)</b>	0,010±0,001	0,0107±0,0003 <sup>NS</sup>
<b>Peso uterino (g)</b>	0,029±0,003	0,0317±0,0006 <sup>NS</sup>
<b>Peso ovárico relativo</b>	0,028±0,005	0,0187±0,0007 <sup>NS</sup>
<b>Peso de útero relativo</b>	0,071±0,008	0,064±0,002 <sup>NS</sup>

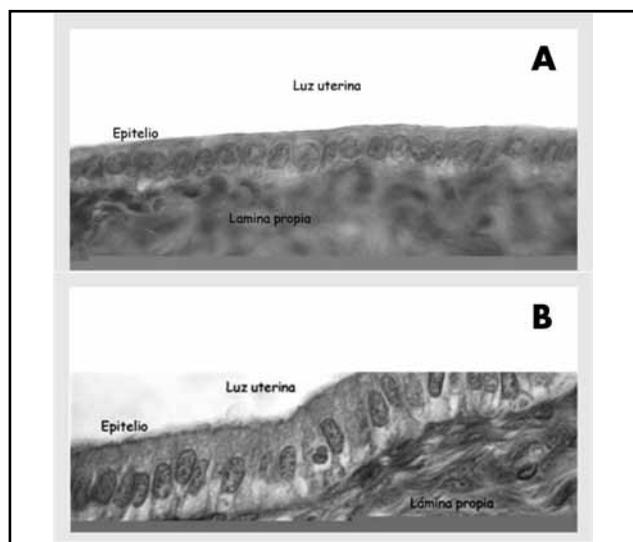
**Tabla 2.** Peso corporal al momento del sacrificio, peso de órganos reproductores y pesos relativos de útero y ovario de animales tratados en forma aguda.



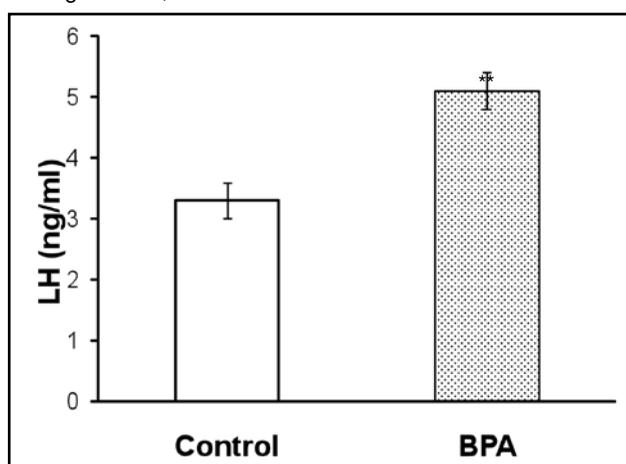
**Figura 3.** Efecto del tratamiento crónico con BPA sobre los niveles séricos de Estradiol. Cada columna representa la media ± ESM de 10 determinaciones. \*\*\*\*p<0,0001 vs. Control.



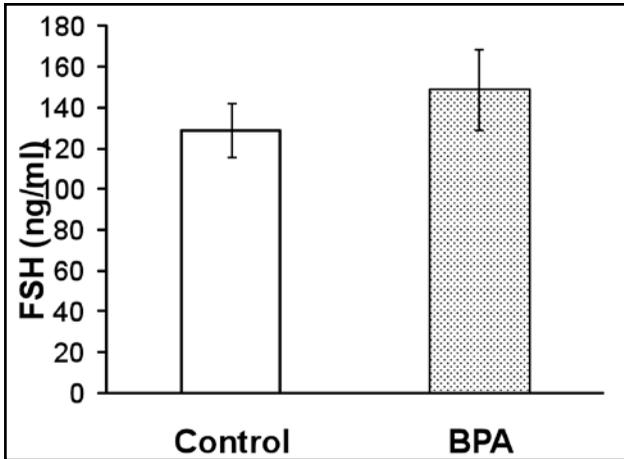
**Figura 4.** Cortes histológicas de ovarios de animales Control (A: Aumento 40X, B: Aumento 600X) y BPA (C: Aumento 40X; D: Aumento 600X). OVD: oviducto; TC: tejido conectivo; Ti: teca interna; Te: teca externa; TA: tejido adiposo; CG: células de la granulosa; \*Folículo maduro.



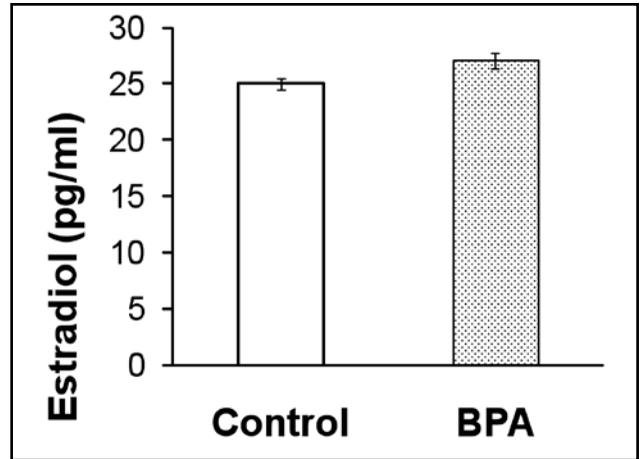
**Figura 5.** Cortes histológicos de útero Control (A) y BPA (B). Aumento 600X



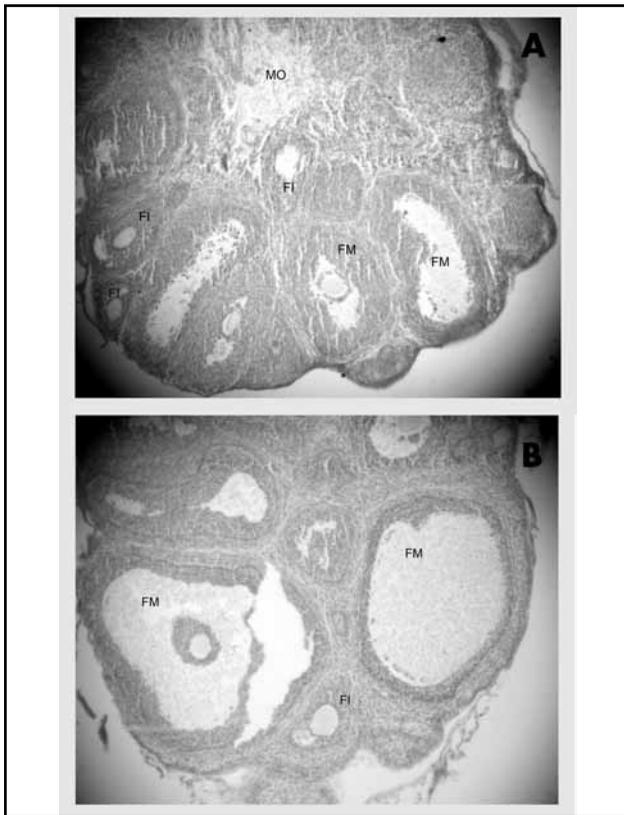
**Figura 6.** Efecto del tratamiento agudo con BPA sobre los niveles séricos de LH. Cada columna representa la media ± ESM de 10 determinaciones. \*\*p<0,01 vs. Control.



**Figura 7.** Efecto del tratamiento agudo con BPA sobre los niveles séricos de FSH. Cada columna representa la media  $\pm$  ESM de 10 determinaciones.



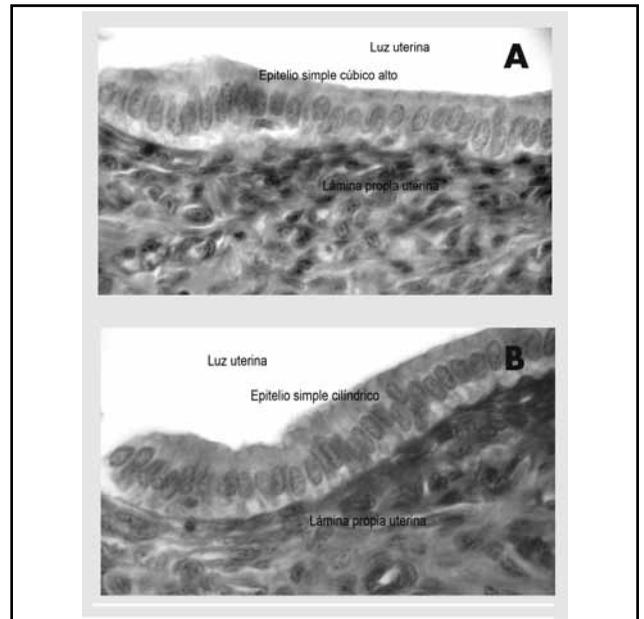
**Figura 8.** Efecto del tratamiento agudo con BPA sobre los niveles séricos de estradiol. Cada columna representa la media  $\pm$  ESM de 10 determinaciones. \* $p < 0,05$  vs. Control.



**Figura 9.** Cortes histológicos de ovarios de animales Control (A) y BPA (B). **FM:** folículos maduros; **FI:** folículos inmaduros; **MO:** médula ovárica. Aumento 200X.

niveles de LH y estradiol ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$  respectivamente), mientras que los de FSH no se modificaron significativamente y mostraban una tendencia al aumento.

La Figura 9 muestra los cortes histológicos de ovarios de animales control y tratados, en los cuales se observa mayor desarrollo de la teca interna y un mayor



**Figura 10.** Cortes histológicos de ovarios de animales Control (A) y BPA (B). **FM:** folículos maduros; **FI:** folículos inmaduros; **MO:** médula ovárica. Aumento 200X

número de folículos maduros en los animales expuestos a BPA. No se encontraron diferencias evidentes en el alto del epitelio uterino ni en las características histológicas del endometrio y miometrio (Figura 10).

### Discusión

Los resultados presentados demuestran que la exposición a BPA durante distintas etapas de la maduración sexual ocasiona alteraciones en el eje reproductor de la rata hembra peripúber.

Es ampliamente conocido que a medida que el animal madura, la unidad hipotálamo-hipofisaria es más

sensible al efecto estimulador de los estrógenos. En este sentido, los trabajos de Ojeda y Urbanski<sup>17</sup> muestran que la administración de estradiol por medio de la implantación de una cápsula a ratas de 16 días provoca un pico de LH, para lo que es necesario que los niveles séricos del esteroide dupliquen el valor observado durante el proestro. A partir del día 20 de vida, los niveles de estradiol correspondientes al proestro son suficientes para generar un pico de LH; dicho pico ocurre aproximadamente a las 54 horas después de la implantación de la cápsula. Al administrar el esteroide a animales de 28 días, el pico ocurre a las 30 horas. Este incremento en la sensibilidad sería el resultado de la exposición al estradiol, ya que el pretratamiento de ratas peripúberes adelanta la edad a la que la LH responde al esteroide con un pico de secreción. Trabajos previos han demostrado fehacientemente que en ratas peripúberes los niveles elevados de estradiol provocan un *feed-back* positivo, lo que conduce a un incremento en la liberación de Gn-RH y de ambas gonadotropinas que acelera el desencadenamiento de la pubertad<sup>18,19</sup>.

Se ha demostrado que el BPA es un disruptor endocrino con actividad estrogénica con capacidad para unirse e inducir la síntesis de ambas isoformas del receptor de estrógenos, ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Matthews y cols. han reportado que el BPA se une a ER $\beta$  ubicados en la neurona Gn-RH modificando así su secreción<sup>20</sup>. Por otra parte, los trabajos de Luque y cols. muestran que la exposición prenatal al BPA provoca un marcado incremento de la expresión de ARNm de la isoforma ER $\beta$  en área preóptica anterior de hipotálamo de ratas macho<sup>21</sup>. Pennie y cols. demostraron que los estrógenos son capaces de producir una “*up-regulation*” de ambas isoformas del receptor estrogénico a nivel hipofisario<sup>22</sup>. En este sentido, Akingbemi y cols. reportaron que el BPA incrementa el ARNm de ER $\beta$  pero no el de ER $\alpha$  a nivel hipofisario en ratas macho peripúberes<sup>23</sup>. Estos hallazgos previos nos permitirían especular que tanto en los animales tratados en forma crónica, etapa prenatal y posnatal temprana, como aguda, etapa peripuberal, el BPA induciría ER, sensibilizando la unidad hipotálamo-hipofisaria a lo largo de la maduración sexual. Por otra parte, el BPA se uniría a estos receptores estrogénicos en hipófisis y en hipotálamo, provocando un aumento de la liberación de Gn-RH y de gonadotropinas. El efecto a nivel hipotalámico podría ejercerse en forma directa o vía aminoácidos excitatorios, ácido glutámico y aspártico, involucrados en la regulación de la secreción de Gn-RH. Datos previos de nuestro laboratorio han demostrado que en ratas macho peripúberes, el BPA es capaz de modificar los mecanismos neuroendocrinos involucrados en el desarrollo puberal, y existe una fuerte correlación entre las modificaciones en la liberación de Gn-RH y los niveles de

gonadotropinas y la liberación de ácido glutámico, cuyas neuronas hacen sinapsis con neuronas Gn-RH<sup>24</sup>.

Los estudios realizados a nivel ovárico mostraron tanto en el caso de la exposición crónica como aguda mayor número de folículos maduros y desarrollo de células de la teca en comparación con los animales control. Estos hallazgos serían consecuencia del efecto estimulador de LH sobre las células de la teca, sitio de origen de andrógenos, los cuales, por acción de la aromatasa inducida por FSH en células de la granulosa, generan estradiol, que junto con la FSH ejerce una acción mitogénica sobre dichas células, estimulando así su proliferación. Sin embargo, un efecto directo del BPA sobre el ovario no puede ser descartado. Lenie y cols. han demostrado la presencia de ambas isoformas del ER en ovario de ratón<sup>25</sup>. El ER $\beta$  se expresa predominantemente en las células de la granulosa y la isoforma ER $\alpha$  lo hace en células de la teca. Es probable entonces que el BPA se una a estos receptores presentes en células de granulosa estimulando su mitosis y, en consecuencia, el crecimiento folicular.

El estudio histológico de útero mostró un epitelio uterino simple cilíndrico y, en algunos casos, un tejido conectivo más laxo con mayor cantidad de vasos sanguíneos en animales expuestos en forma crónica, en comparación con el grupo control, que presentó un epitelio uterino simple cúbico bajo y la lámina propia con tejido conectivo denso y abundante. Estos cambios en el útero son una clara evidencia del efecto estrogénico del BPA sobre este efector. Estudios histológicos realizados por Seidovla-Wuttke y cols. demostraron que bajas dosis de BPA son capaces de estimular el crecimiento del epitelio uterino, efecto mediado por ER $\alpha$ <sup>26</sup>. Dado que el BPA induce la expresión de ER, es probable que el tiempo de exposición provoque la aparición de numerosas unidades de receptores en útero y sea capaz de provocar los cambios observados. Por otra parte, el efecto estrogénico sobre útero se manifestó en los animales bajo administración crónica a través del incremento de su peso relativo. En este sentido, el clásico ensayo uterotrópico realizado por Ashby y cols. demuestra claramente la capacidad del BPA para incrementar el peso uterino cuando es administrado tanto por vía oral como por vía subcutánea a una dosis aproximada de exposición de 170 mg/kg/día<sup>27</sup>. Los animales tratados en forma aguda, en cambio, no mostraron modificaciones en el epitelio ni en el peso uterino. Es probable que, a pesar de que el tratamiento agudo se realizó bajo altas dosis del DE, el corto período de exposición no haya sido suficiente para provocar cambios en la sensibilidad del efector.

Nuestros resultados demuestran que el BPA administrado en etapas clave del desarrollo, período prenatal, posnatal temprano y peripubertad, es capaz

de modificar la actividad del eje reproductor en la rata hembra. La vida fetal constituye la etapa de desarrollo y programación del eje reproductor, por lo que sería "la ventana de mayor sensibilidad" para alterar en forma permanente los mecanismos homeostáticos del eje. El período posnatal temprano es también una etapa susceptible a la disrupción endocrina, dado que es aquella en la que los diferentes órganos y sistemas neurales se modifican rápidamente. Por otra parte, la peripubertad involucra profundos cambios hormonales y es el momento de desarrollo activo del tracto reproductor.

Los hallazgos obtenidos sugieren que la exposición al BPA durante estas etapas de la maduración sexual de la rata hembra provocaría sensibilización de la unidad hipotálamo-hipofisaria que conduciría a un incremento en la liberación de Gn-RH y de ambas gonadotropinas, acelerando el desencadenamiento de la pubertad.

### Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con subsidios provistos por la Universidad de Buenos Aires (Subsidios UBA-CYT M006- M434).

### Referencias

1. Jones LA, Hajek RA. Effect of estrogenic chemicals on development. *Environ Health Perspect* 1995; 103:63-67.
2. Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K. Antiandrogenic effects of Bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci* 2003; 75:40-46.
3. Morrissey RE, Lamb JC, IV, Morris RW, Chapin RE, Gulati DK, Heindel JJ. Results and evaluations of 48 continuous breeding reproduction studies conducted in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1989; 13:747-777.
4. Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold R, Rubin BS, Talsness CE, Vandenbergh JG, Walser-Kuntz DR, vom Saal FS. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology* 2007; 24:199-224.
5. Raiser G, Toppari J, Parent AS, Bourguignon JP. Female sexual maturation and reproduction alter prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: a review of rodent and human data. *Moll Cell Endocr* 2006; 254-255 187-201.
6. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Millar BA, Clegg L, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review*. National Cancer Institute, Bethesda, MD 1992.
7. Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 2004; 18:501-507.
8. Soto AM, Fernández MF, Luizzi MF, Oles Karasko AS, Sonnenschein C. Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ Health Perspect* 1997; 105:647-654.
9. Takeuchi T, Tsutsumi O. FERUM bisphenol A concentration showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291:76-78.
10. Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezaki Y, Takai Y, Takeuchi Y. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J* 2004; 51:165-169.
11. Cagen SZ, Waechter Jr, JM, Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, Joiner RL, Shiotsuka RN, Veenstra GE, Harris LR. Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 30:130-139.
12. Funabashi T, Kawaguchi M, Furuta M, Fukushima A, Kimura F. Exposure to Bisphenol A during gestation and lactation causes loss of sex difference in corticotropin-releasing hormone immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Psychoendocrinology* 2004; 29:475-485.
13. Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol A, an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 1993; 132:2279-2286.
14. Brotons JA, Olea Serrano MF, Villalobos M, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans. *Environ Health Perspect* 1995; 103:608-612.
15. Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996; 104:298-305.
16. Tohei A, Suda S, Taya K, Hashimoto T, Kogo H. Bisphenol A inhibits testicular functions and increases luteinizing hormone secretion in adult male rats. *Exp Biol Med* 2001; 226(3):216-221.
17. Ojeda S and Urbansky H. Puberty in the rat. En: Knobil, Nelly JD (eds.) *The Physiology of Reproduction* (2ª edición). New York: Raven Press Ltd. 1994.
18. Levine JE. New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropins surges in rats. *Biol Reprod* 1997; 56:293-302.
19. Terasawa E, Fernández DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* 2001; 22:111-51.
20. Matthews JB, Twoney K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Chem Res Toxicol* 2001; 14:149-157.
21. Ramos J, Varayoud J, Kass L, Rodríguez H, Costabel L, Muñoz del Toro, Luque E. Bisphenol A induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally

- exposed male rats. *Endocrinology* 2003; 144:3208-3215.
22. Pennie WD, Aldridge TC, Brooks AN. Differential activation by xenoestrogens of ER alpha and ER beta when linked to different response elements. *J Endocrinol* 1998; 158:11-14.
23. Akingbemi B, Sottas C, Koulova A, Klinefelter G, Hardy M. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen Bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 2004; 145:592-603.
24. Cardoso N, Pandolfi M, Ponzio O, Carbone S, Szwarcfarb B, Scacchi P, Reynoso R. Evidence to suggest glutamic acid involvement in Bisphenol A effect at the hypothalamic level in prepubertal male rats. *Neuroendocrinol Lett* 2010 Aug 30; 31(4) (Epub ahead of print).
25. Lenie S, Smitz J. Estrogen receptor subtypes localization shifts in cultured mouse ovarian follicles. *Histochem Cell Biol* 2008; 129(6):827-40.
26. Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W. Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone. *Toxicology* 2004; 205:103-112.
27. Ashby J, Tinwell H. Uterotrophic activity of Bisphenol A in the immature rat. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106(11):719-720.