

**Universidad ORT Uruguay  
Facultad de Ingeniería**

**Monitoreo de perturbadores endócrinos mediante el  
empleo de modelos *in vivo* e *in vitro*.**

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología.

**María Belén Harreguy -165587**

**Tutor: Mariela Raquel Bollati-Fogolín**

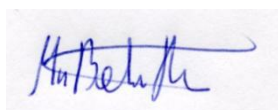
**Co-tutores: Romina Pagotto y Valentina Porro**

**2014**

## Declaración de autoría

Yo, María Belén Harreguy, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Proyecto de Grado;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente propia;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



María Belén Harreguy

***“No entiendes realmente algo, hasta que se lo puedes explicar a tu abuela”***  
Proverbio Galés

A mis abuelos.

## Agradecimientos

A la ANII por la beca de iniciación a la investigación (INI\_X\_2012\_1\_4184) y por la financiación mediante el fondo María Viñas (FMV\_2\_2011\_1\_6046) en el cual se enmarcó parte de este trabajo.

A la Dra. Mariela Bollati por haberme guiado y abierto las puertas de la Unidad de Biología Celular y del Instituto Pasteur de Montevideo.

A la Dra. Valentina Porro que me ayudó a entender un poco más de la citometría, me guió y aconsejó.

A la Dra. Romina Pagotto por toda la paciencia y el tiempo que me dedicó, por haberme guiado y aconsejado siempre con buen humor. Por siempre ver el lado positivo de las cosas y levantarme el ánimo.

A todas mis compañeras de la UBC, Karen, Inés, Sabina y Soledad por el apoyo y el buen ánimo, por sus opiniones y consejos.

A mis padres y mi hermano que siempre me dieron para adelante, me aguantaron cuando estaba bajo presión y siempre me apoyaron en todas mis decisiones.

A mis abuelos que se preocuparon más que yo por todos los parciales y exámenes que tuve a lo largo de este camino, por siempre apoyarme y recibirme en su casa de brazos abiertos.

A Emma por toda la compañía que me dio cuando estaba escribiendo y la alegría de todos los días.

A mis amigas incondicionales, las hermanas que me dio la vida Vicky, Belu, Cami, Fer y Leti.

## **Abstract**

Una gran diversidad de sustancias antropogénicas presentes en el ambiente, conocidas como perturbadores endócrinos (PE) son capaces de alterar la homeostasis del sistema endócrino de los organismos. El incremento de ciertas patologías, principalmente reproductivas, ha sido asociado con la creciente exposición a PE, haciendo cada vez más necesario contar con sistemas de monitoreo que permitan evaluar la capacidad de PE de compuestos utilizados por el hombre.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar los efectos de un tipo particular de PE, los estrógenos ambientales, mediante el empleo de dos modelos, uno *in vitro* y otro *in vivo*. Para el primero se empleó la línea celular reportera T47D-KBluc que contiene el gen de la luciferasa bajo un promotor regulado por elementos de respuesta a estrógenos. Este sistema permite realizar de forma rápida y efectiva un cribado primario de compuestos para evaluar su actividad estrogénica. El segundo modelo, plantea el empleo de un ratón transgénico Oct4-GFP, el cual expresa la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*) sólo en las células germinales más indiferenciadas, pudiéndolas distinguir de las germinales maduras y de las células somáticas. Este modelo posibilita estudiar los efectos de la exposición perinatal a PE sobre el desarrollo de la población de gametas masculinas.

Se optimizó el sistema *in vitro* para evaluar la capacidad estrogénica de los compuestos 17 $\alpha$ -etinilestradiol, Bisfenol A y 3-(4metilbencilindano)-canfor, comparándolos con el estrógeno estándar (17 $\beta$ -estradiol). Además, se realizaron ensayos *in vivo* con crías macho de madres OCT4-GFP expuestas desde el día 5,5 post-coito al 7 post-nacimiento a PE para evaluar por citometría de flujo el impacto del tratamiento sobre las suspensiones celulares testiculares, demostrando que al menos dos de los compuestos evaluados fueron capaces de modificar significativamente el nivel de expresión del gen GFP, lo que podría implicar una alteración en el proceso de desarrollo de las células germinales.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el empleo combinado de ambos modelos podrían ser utilizados por organismos públicos y privados como herramientas para el monitoreo de sustancias del ambiente y/o evaluar el potencial riesgo de nuevos productos, reduciendo tanto los tiempos como los costos de evaluación.

Uruguay, país exportador de productos ganaderos, depende enormemente de la tasa de reproducción de animales, la cual puede ser afectada por estrógenos ambientales. El desarrollo de una metodología rápida y económica para monitorear sus niveles y tomar medidas acordes, beneficiará tanto la economía como la productividad del país.

**Palabras Clave:** perturbador endócrino, línea reportera, estrógenos, célula germinal, reproducción.

# Contenido

Abreviaturas .....	9
1-Introducción .....	10
1.1- Sistema endócrino .....	10
1.2- Perturbadores endócrinos.....	10
1.3- Compuestos químicos que actúan como perturbadores estrogénicos .....	11
1.4- Estrógenos ambientales y desarrollo de las células germinales masculinas .....	13
1.5- Métodos para evaluar posibles PE ( <i>in vitro</i> vs <i>in vivo</i> ) .....	14
1.6- Relevancia actual de los PE .....	14
2- Objetivos .....	15
2.1- Objetivo general.....	15
2.2- Objetivos específicos .....	15
3- Metodología .....	16
3.1- Reactivos generales .....	16
3.2- Modelos experimentales .....	16
3.2.1- Línea celular reportera T47D-KBLuc.....	16
3.2.1.1- Expansión de la línea celular.....	17
3.2.1.2- Tripsinización de células .....	17
3.2.1.3- Criopreservación y descongelamiento de células .....	17
3.2.1.4- Recuento celular y evaluación de viabilidad con Azul de Tripán .....	18
3.2.2- Animales transgénicos Oct-4 GFP .....	18
3.3- Evaluación de PE con un modelo <i>in vitro</i> .....	18
3.3.1- Ensayos de transactivación con la línea celular T47D-KBluc para evaluar el efecto estrogénico de perturbadores endócrinos putativos.....	18
3.3.2- Medición de la actividad de luciferasa.....	19
3.3.3- Optimización del ensayo de transactivación .....	19
3.3.3.1- Determinación de la densidad celular a emplear .....	19
3.3.3.2- Tiempo de incubación con los estímulos .....	19
3.3.3.3- Medición de la luz producida .....	19
3.3.4-Ensayos de viabilidad celular .....	19
3.3.5- Ensayos de especificidad de respuesta estrogénica .....	20
3.4- Evaluación de PE con un modelo <i>in vivo</i> .....	20
3.4.1- Genotipado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
3.4.1.1- Extracción de ADN .....	20
3.4.1.2- Reacción en cadena de la Polimerasa.....	21
3.4.2- Tratamiento de los animales .....	21
3.4.3- Administración de los compuestos .....	22
3.4.4- Sacrificio de los animales .....	22

3.4.5- Disgregación de células germinales de testículo .....	22
3.4.6- Análisis por citometría de flujo.....	22
3.4.7- Análisis espermático.....	23
3.4.7.1- Viabilidad y recuento espermático .....	23
3.4.7.2- Evaluación de motilidad.....	23
3.5- Análisis estadístico .....	23
4-Resultados .....	24
4.1- Optimización del modelo <i>in vitro</i> para evaluación de PE .....	24
4.1.1- Determinación de la densidad celular a emplear .....	24
4.1.2- Determinación del tiempo de estimulación.....	24
4.1.3- Determinación del protocolo para medición de luz .....	25
4.1.4- Elección del vehículo .....	26
4.2- Evaluación de la capacidad de diferentes compuestos como PE utilizando un modelo <i>in vitro</i> reportero.....	26
4.2.1- Ensayos de citotoxicidad .....	26
4.2.2- Ensayos de transactivación con PE .....	28
4.2.3- Especificidad de la respuesta estrogénica .....	28
4.3- Evaluación de la capacidad de diferentes compuestos como PE utilizando un modelo <i>in vivo</i> .....	29
4.3.1- Tipificación por PCR .....	29
4.3.2- Parámetros evaluados durante la gestación .....	30
4.3.3- Análisis por citometría de flujo de células testiculares de crías DPN 7 .....	31
4.3.4- Evaluación de la capacidad reproductiva en adultos tratados perinatalmente con PE .....	32
5- Discusión .....	33
5.1- Evaluación de PE mediante ensayos <i>in vitro</i> .....	33
5.2- Evaluación de PE mediante ensayos <i>in vivo</i> .....	34
6- Análisis económico .....	36
7- Conclusión .....	37
Referencias Bibliográficas.....	38

## Abreviaturas

**BPA:** Bisfenol A

**BSA:** Seroalbúmina Bovina

**DCC:** Adsorbido con Carbón-Dextrano

**DMSO:** Dimetilsulfoxido

**DPC:** Días post coito

**DPN:** Días post nacimiento

**E2:** 17- $\beta$ -estradiol

**EE2:** 17- $\alpha$ -etinilestradiol

**EDTA:** Ácido etilendiamino tetra-acético

**Eg:** Estrógenos

**ER:** Receptor de estrógenos

**ER $\alpha$ :** Receptor de estrógenos Alfa

**ER $\beta$ :** Receptor de estrógenos Beta

**GFP:** Proteína verde fluorescente

**ICI:** Fulvestrant

**IP:** Ioduro de Propidio

**MIF:** Media de la Intensidad de Fluorescencia

**Oct4:** Factor de transcripción de unión a octámero-4

**PBS:** *Buffer* fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PE:** Perturbadores endócrinos

**PEg:** Perturbadores estrogénicos

**PFA 4%:** Paraformaldehído al 4%

**SD:** Desvío Estándar

**SFB:** Suero fetal bovino

**SPF:** Libre de patógenos específicos

**4- MBC:** 3-(4-metilbencilindano)-canfor

# 1-Introducción

## 1.1- Sistema endócrino

El sistema endócrino es uno de los sistemas principales que tiene el cuerpo para comunicar, controlar y coordinar el funcionamiento del organismo. Estas acciones son llevadas a cabo a través de mediadores químicos conocidos como hormonas, que son sintetizados y secretados por las glándulas endócrinas. Las principales glándulas del sistema endócrino son el hipotálamo, la glándula pituitaria, la tiroides, la paratiroides, la glándula adrenal, la glándula pineal, los órganos reproductivos y el páncreas.

Pequeñas alteraciones en la homeostasis de este sistema pueden generar consecuencias graves en el individuo afectado. Dentro de las enfermedades causadas por desregulaciones hormonales se encuentran la diabetes, el gigantismo, el hipotiroidismo y disgenesias gonadales. Estas desregulaciones pueden ocurrir por causa de factores ambientales que impactan negativamente, interfiriendo en el sistema endócrino a distintos niveles, por ejemplo alterando la secreción de hormonas desde el hipotálamo o la glándula pituitaria, alterando la biotransformación enzimática de hormonas por el hígado o impactando negativamente en el sistema reproductor (1-2).

## 1.2- Perturbadores endócrinos

Desde mediados del siglo XX se ha reportado una incidencia creciente de enfermedades reproductivas y consecuentemente una baja en las tasas de fertilidad humana (3). La infertilidad, que se define como la imposibilidad de concebir después de un año de tener relaciones sexuales sin protección, es una enfermedad que afecta al 9% de la población mundial (4). Debido al corto período de tiempo en el que este tipo de enfermedades ha aumentado, este problema no sería atribuible a cambios genéticos pero sí a cambios ambientales (5). Existe abundante evidencia que sugiere que los causantes podrían ser sustancias potencialmente peligrosas utilizadas por el hombre y cuya presencia en el ambiente se ha incrementado en las últimas décadas y afectarían tanto a los humanos como a los animales salvajes (6). Algunos de estos químicos, capaces de alterar la homeostasis del sistema endócrino, son conocidos como perturbadores endócrinos (PE) (7).

Los PE son compuestos antropogénicos de variada naturaleza, capaces de interferir con la acción hormonal endógena. Pueden ser solventes, lubricantes industriales (bifenilos policlorados o polibrominados, dioxinas), plásticos (bisfenol A, ftalatos), pesticidas (metoxiclor, Ditiotretitol), hormonas sintéticas (17  $\alpha$ -etinil-estradiol), filtros solares o compuestos naturales (fitoestrógenos) (8). Estos compuestos pueden actuar afectando la función natural de las hormonas. Pueden imitar o bloquear la acción de hormonas, alterar su biodisponibilidad, inhibiendo o estimulando la producción de las mismas, alterando su secreción y transporte o afectando las vías enzimáticas relacionadas con su síntesis y metabolismo (9).

Todos estos mecanismos de acción pueden afectar a los seres vivos de diversas maneras. En particular, la exposición a PE durante la etapa de feto o de neonato es un problema mayor ya que es cuando un ser vivo es más susceptible a la acción de estos compuestos (10). Los efectos de la exposición durante las primeras etapas del desarrollo fetal pueden afectar el desarrollo del sistema nervioso central, el corazón, los huesos y el sistema reproductor. También se ha relacionado dicha exposición con la presencia de cáncer en la niñez y problemas en la maduración sexual (9).

De acuerdo al mecanismo de acción, muchos de los efectos de los PE pueden no manifestarse en forma inmediata, por lo que las consecuencias de una exposición a una edad temprana pueden ser evidenciadas recién como enfermedades en la adultez del individuo (11). Uno de los mecanismos generales mediante el cual se propone que la exposición prenatal y postnatal puede producir cambios fenotípicos en la adultez es mediante la alteración de las marcas epigenéticas que juegan un rol muy importante en la determinación de la expresión génica (12). En algunos casos, estos compuestos también pueden promover una transmisión heredable de la enfermedad a generaciones sucesivas a través de mecanismos transgeneracionales observándose efectos como anomalías en la

pubertad, enfermedades testiculares, obesidad, y ovarios poliquísticos en la tercera generación (F3) (13-15).

El aumento de la presencia de PE en el ambiente en los últimos 50 años también se correlaciona con la mayor tasa de trastornos en las funciones reproductivas masculinas, como son baja calidad espermática e infertilidad, anomalías en el tracto urogenital, hipospadias, criptorquidea y cáncer de testículo (7,16-17). En este período de tiempo, el recuento espermático global disminuyó a la mitad (113 millones a 66 millones/mL) acompañado de anomalías en la morfología y motilidad espermática (18). En un estudio reciente llevado a cabo en 1000 niños recién nacidos, se encontró una correlación lineal entre la exposición materna a PE y bajos niveles de testosterona, menor longitud del pene y una mayor incidencia de anomalías reproductivas en la progenie masculina (19).

Además de los efectos sobre el desarrollo y la reproducción, algunos PE han demostrado ejercer una influencia sobre desórdenes metabólicos y aumentar la predisposición a padecer diabetes. Estudios *in vivo* e *in vitro* así como estudios epidemiológicos asocian el incremento de ciertos PE en las últimas décadas con el aumento de incidencia de la obesidad y síndrome metabólico, definiendo a este tipo de perturbadores como “obesógenos”(20-22). En la figura 1 se muestran los principales órganos endócrinos que son afectados por los PE como son los órganos reproductivos, el páncreas y la tiroides (9).

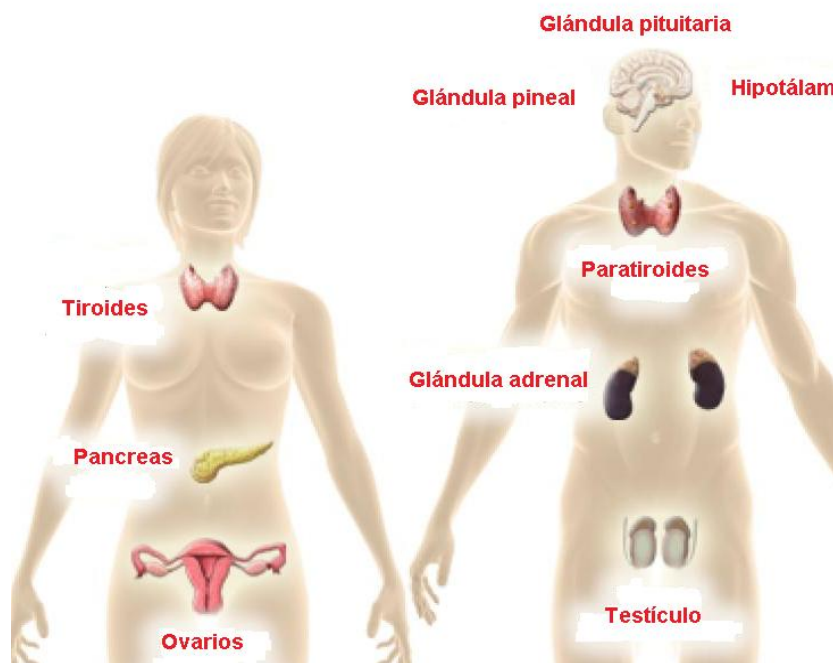


Figura 1. Principales órganos endócrinos afectados por los PE. Tomado y modificado de “Endocrine disruptive chemicals and disease susceptibility” (9)

### 1.3- Compuestos químicos que actúan como perturbadores estrogénicos

Los estrógenos son un grupo de hormonas esteroideas producidas por la modificación enzimática del colesterol (23). Su participación en la fisiología está principalmente asociada a las funciones sexuales femeninas aunque también está presente en hombres, donde es producida como un metabolito activo de la testosterona. Dentro de este grupo de hormonas sexuales, el estrógeno más importante en la etapa reproductiva femenina es el 17- $\beta$ -estradiol (E2) que es responsable del mantenimiento del sistema reproductor femenino y del desarrollo de las características sexuales secundarias (1). En los machos el E2 juega un rol importante en la regulación de la gonadotropina, en varias funciones cerebrales, en la maduración de los huesos y en el metabolismo lipídico (24).

El principal mecanismo a través del cual estas hormonas actúan, es mediante la interacción con los receptores de estrógeno (ER). Existen tres tipos de receptores de estrógeno: los receptores nucleares alfa y beta ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ), los receptores de membrana que son variantes de los ER nucleares y los receptores de estrógenos asociados a proteínas G, que son receptores asociados a membrana que presentan una gran afinidad por el estrógeno. La principal función de los ER es actuar como factor de transcripción para regular la expresión génica y otros procesos río abajo, aunque recientemente se ha reportado que los receptores asociados a proteínas G podrían cumplir otras funciones que no requieren de activación de la transcripción (9,25).

Existe una gran variedad de moléculas sintéticas y naturales distintas del E2 que pueden activar a los  $ER\alpha$  y  $ER\beta$ . Entre las moléculas naturales se destacan los fitoestrógenos producidos por plantas o los micoestrógenos producidos por hongos. Los activadores sintéticos comprenden aquellos producidos por el hombre, también llamados xenoestrógenos. Algunos pueden ser estrógenos sintéticos diseñados para uso directo en humanos como por ejemplo, el anticonceptivo oral 17- $\alpha$ -etinil estradiol. En otros casos, son compuestos utilizados para la fabricación de productos como pinturas, resinas, plásticos, que indirectamente entran en contacto con el hombre y los animales pero que también son capaces de alterar la actividad normal de los estrógenos endógenos (9). A estos perturbadores endócrinos con actividad estrogénica se los conoce con el nombre de perturbadores estrogénicos (PEg).

Un ejemplo de PEG son los filtros solares. Algunos agentes bloqueantes de rayos ultravioleta tipo A (UV-A) o UV-B, ampliamente utilizados en la elaboración de cremas protectoras solares (hasta en un 10% de su composición), han demostrado poseer actividad estrogénica tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Estos compuestos son liberados a los cuerpos de agua por plantas de tratamiento de efluentes y son capaces de bioacumularse. El filtro solar UV-A 3-(4-metilbencilindano)-canfor (4-MBC), ha sido detectado en concentraciones de 1800 ng/g en peces que habitan un río que recibe aguas de una planta de tratamiento de efluentes (26). Otro estudio reportó que en los sedimentos de las plantas de tratamiento de agua el nivel de 4-MBC fue de 150-4980  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de materia seca mientras que el de otro filtro solar (etilexyl cinamato) fue de 10-390  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de materia seca (27).

Se ha demostrado que el 4-MBC se une preferencialmente al  $ER\beta$  (28) e interfiere con el desarrollo del tracto reproductor femenino en ratas (29). En otro estudio se reportó que la exposición a 4-MBC dilató el inicio de la pubertad en machos, disminuyó el peso de la próstata e incrementó el peso testicular en ratas macho (30). La expresión y respuesta a estradiol de genes regulados por estrógenos, así como los niveles de correguladores de receptores nucleares fueron también modificados por este compuesto en el útero de ratas adultas, próstata y distintas regiones del cerebro implicadas en el control gonadal y la conducta sexual (31). En cuanto a su capacidad como PEG, estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que 4-MBC posee actividad estrogénica, induciendo la proliferación de células MCF-7 con una concentración efectiva 50 (EC50) de 3,02  $\mu\text{M}$  y un incremento en el peso uterino de ratas, utilizando dosis de 309 mg/kg/día (26).

Otro ejemplo de PEG es el bisfenol A (BPA), un Eg ambiental utilizado en la manufactura de policarbonatos plásticos y resinas epoxi, pesticidas, productos antioxidantes, selladores dentales y barnices que por exposición al calor (ej: autoclavado, horno de microondas), se libera de los envases plásticos de bebidas y alimentos, de mamaderas y de la pintura que recubre el interior de las latas de conserva. Los selladores odontológicos también liberan BPA a la saliva durante el proceso de polimerización (32-33). En estudios recientes se ha detectado BPA en el suero de fetos humanos de 15 a 18 semanas de gestación en concentraciones de 1-2 ng/mL. Además, este compuesto es capaz de acumularse en el fluido amniótico alcanzando concentraciones 5 veces superiores a las séricas (10 ng/mL) (34). Resultados obtenidos en diversos laboratorios muestran que la exposición de roedores al BPA altera el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, adelanta la pubertad, modifica el patrón de diferenciación de la próstata y de la glándula mamaria y reduce el número de folículos primordiales en el ovario neonatal (35).

El 17-alfa-etinilestradiol (EE2) es otro estrógeno sintético, de potencia similar al E2 y es uno de los ingredientes más usados en la composición de píldoras anticonceptivas en el mundo. Si bien el EE2 es un estrógeno "puro" y se lo usa frecuentemente en los trabajos científicos como un control positivo de acción estrogénica, al mismo tiempo se lo considera un Eg ambiental dado que se encuentra en cantidades significativas en el medio ambiente (32). De hecho, el exceso de EE2 y sus metabolitos son eliminados del organismo de quienes lo consumen por orina y heces, llegando de esta manera a

distintos ambientes acuáticos (33). Se ha demostrado que este compuesto presenta mayor resistencia a la degradación que los Eg naturales, por lo que permanece en el ambiente incluso después de haber atravesado las plantas de tratamiento de aguas (32). En efluentes industriales y cuerpos de agua de Europa se ha detectado EE2 en concentraciones que van desde 0,5 hasta 7 ng/L llegando en algunos casos hasta 50 ng/L (36). Trabajos recientes han reportado que el EE2 es capaz de alterar la conducta sexual dimórfica (37) y la fertilidad (35) en ratas expuestas en los períodos pre- y/o post natal. Además la exposición a concentraciones bajas de EE2 causa alteraciones en la funcionalidad gonadal en peces, disminuyendo en un 56 % su tasa de fecundidad (32). En la figura 2 se muestra la estructura química de los compuestos arriba descritos, los cuales fueron evaluados en este trabajo.

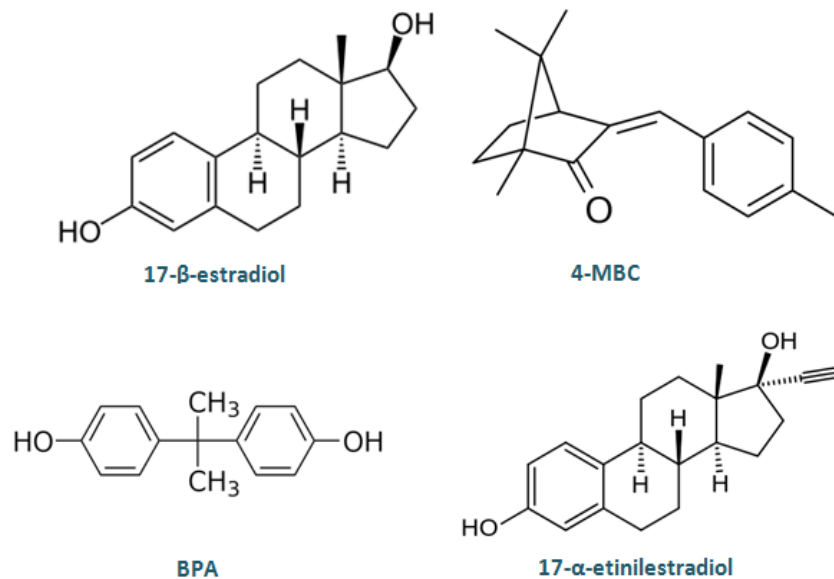


Figura 2. Estructura química de los distintos compuestos evaluados en este trabajo.

## 1.4- Estrógenos ambientales y desarrollo de las células germinales masculinas

El testículo es un órgano determinante de la eficiencia y capacidad reproductiva de los animales y del ser humano, siendo también uno de los órganos más afectados por la exposición a PEG durante su período de organogénesis y diferenciación.

En el ratón, la especificación de las células germinales ocurre en el día 6,5 post-coito (DPC 6,5), luego del cual las células germinales primordiales migran y colonizan la gónada, proliferan y comienzan su diferenciación y maduración hacia la célula germinal (38). Alrededor del DPC12,5, las células germinales son destinadas a desarrollarse como masculinas o femeninas. Durante este proceso de diferenciación, las células germinales expresan un conjunto de factores que mantienen la pluripotencia dentro de los que se encuentran Oct-4, Nanog y Sox 2. El proceso de maduración y mantenimiento de la población inicial de espermatogonias está bajo la regulación de los genes de pluripotencialidad que, a su vez pierden su expresión a medida que se produce la diferenciación (39).

Se ha observado que los tumores testiculares derivados de células germinales presentan una alta expresión de estos genes, lo que sugiere que posibles defectos en el silenciamiento de los genes reguladores de la pluripotencia podrían formar parte de la etiología de estos tumores (40).

A su vez, algunos trabajos observaron una asociación entre tumores germinales con la acción de PEg sugiriendo que los xenoestrógenos podrían actuar como agentes promotores en el desarrollo de cáncer testicular de células germinales (41).

## 1.5- Métodos para evaluar posibles PE (*in vitro* vs *in vivo*)

En la actualidad, existen métodos tanto *in vivo* como *in vitro* para evaluar PE (42). Los primeros evalúan los efectos de compuestos sobre el organismo vivo, incluyendo su metabolismo, por lo que sus resultados son más fácilmente extrapolables a la realidad del individuo. Entre los métodos *in vivo* más utilizados para el estudio de PE podemos mencionar el test de la metamorfosis de anfibios (para la evaluación de perturbadores tiroideos), el ensayo uterotrófico en ratas (para el estudio de perturbadores estrogénicos) y el ensayo de reproducción en peces (para el análisis de múltiples modos de acción de diferentes compuestos) (43). Estos modelos, sin embargo, demandan mucho tiempo, son costosos, engorrosos en su práctica y presentan una alta variabilidad (44).

Los métodos *in vitro*, por el contrario, son más rápidos, económicos y reproducibles, lo que los convierte en una herramienta más apropiada para un cribado primario, cuando la cantidad de compuestos a evaluar es muy amplia. Los ensayos más comúnmente utilizados y validados para el estudio de PE son de tres tipos: ensayos de proliferación basados en células tumorales que responden a hormonas, ensayos de unión específica a ligando y ensayos de transactivación mediante el empleo de líneas reporteras (45). En estos últimos, el gen de una proteína reportera como luciferasa, cloranfenicol acetil transferasa o GFP (del inglés *Green Fluorescent Protein*), se encuentra bajo un promotor que posee secuencias de unión específicas a receptores hormonales, que actúan como factores de transcripción. La interacción del receptor hormonal (activado por el PE) con dichos elementos, induce/inhíbe la expresión de la proteína reportera, revelando el efecto endócrino del compuesto. Los ensayos de transactivación han sido utilizados exitosamente para la detección de compuestos estrogénicos, androgénicos, progestágenos y perturbadores tiroideos (46).

## 1.6- Relevancia actual de los PE

La abundante evidencia científica que demuestra la capacidad de los PE para alterar la normal fisiología de los organismos, su presencia en ambientes naturales, en fluidos y tejidos animales y su creciente uso, han generado una situación de alarma sobre la cualidad de los compuestos utilizados por el hombre y su potencial efecto adverso sobre la salud de los seres vivos. Entidades gubernamentales internacionales han comenzado a promover políticas públicas tendientes a controlar y reducir la exposición a PE. Un ejemplo de ello ha sido la creación en la década del '90 del Programa de Cribado para Perturbadores Endócrinos por parte de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (47-48). Este accionar ha sido reproducido por otros países, como los miembros de la Comunidad Europea y Japón, quienes también promueven acciones para el control de este tipo de compuestos (49).

En lo que respecta a Uruguay, en agosto del 2013 participó de la Cuarta Reunión Regional de América Latina y el Caribe sobre la aplicación del Enfoque Estratégico para la Gestión de productos Químicos a Nivel Internacional (SAIMC, por sus siglas en inglés). En ella se reconoció el grave riesgo que el empleo de plaguicidas altamente peligrosos y productos químicos PE representan para la salud humana y el medio ambiente, exhortando a los países latinoamericanos a trabajar en forma conjunta para identificar los plaguicidas peligrosos utilizados, buscar alternativas para su reemplazo y promover la financiación de actividades relacionadas con el monitoreo de este tipo de compuestos (50).

## 2- Objetivos

Considerando los antecedentes descritos anteriormente, en este trabajo se planteó optimizar dos modelos de estudio para la evaluación de PEg. Por un lado, un método de cribado primario, para evaluar en poco tiempo y a bajo costo un gran número de PEg putativos y por otro lado un modelo *in vivo* para estudiar los efectos de dichos compuestos sobre la capacidad reproductiva masculina en mamíferos.

### 2.1- Objetivo general

Evaluar los efectos de distintos PEg (EE2, 4-MBC, BPA) mediante el empleo de modelos *in vivo* e *in vitro*, estableciendo el alcance y las limitaciones de cada una de las técnicas. Se utilizará como modelo *in vitro* la línea celular reportera T47D-KBluc y como modelo *in vivo* para el estudio de los efectos a nivel reproductivo, el ratón transgénico Oct4-GFP.

### 2.2- Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones del ensayo que emplea la línea celular reportera T47D-KBluc para evaluar PE.
- Evaluar la respuesta de la línea celular T47D-KBluc a diferentes compuestos (EE2, E2, 4-MBC, BPA).
- Presentar un modelo animal para la evaluación *in vivo* de la exposición perinatal a PE sobre el desarrollo de células germinales masculinas y la capacidad reproductiva.
- Comparar ambos modelos (*in vitro* e *in vivo*), en cuanto al alcance de sus resultados, factibilidad, costos, reproducibilidad e impacto ambiental.

## 3- Metodología

### 3.1- Reactivos generales

Los compuestos E2, EE2, BPA, Fulvestrant (ICI), agonista del receptor de estrógenos, y 4-MBC, se obtuvieron de SIGMA (Saint Louis, EUA), al igual que las sales utilizadas para la preparación de soluciones, el medio de cultivo RPMI sin rojo fenol y la tripsina-EDTA. El suero fetal bovino común (SFB) y el SFB adsorbido con Carbon-Dextrano (DCC) se obtuvieron de GIBCO (Carlsbad, EUA). Ambos SFB fueron descomplementados en un baño a 56°C por 40 min, previo a su uso.

El material plástico estéril utilizado en cultivo se obtuvo de Corning, las placas de 96 pocillos negras con fondo transparente, el azul de tripán, el DMSO y la Tripsina sin rojo fenol se obtuvieron de SIGMA.

El medio RPMI fue comprado en polvo, reconstituido en agua ultra pura y posteriormente suplementado con Hepes 10mM y con Piruvato de Sodio 1mM (GIBCO) (RPMI completo). En los casos que fue necesario, la esterilización de los reactivos fue realizada por filtración empleando un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (e EMD Millipore Corporation, Billerica, EUA).

El kit para medición de Luciferasa (*Luciferase Assay System*, catálogo n° E1501) y el *buffer* de lisis se obtuvieron de PROMEGA (Wisconsin, EUA).

### 3.2- Modelos experimentales

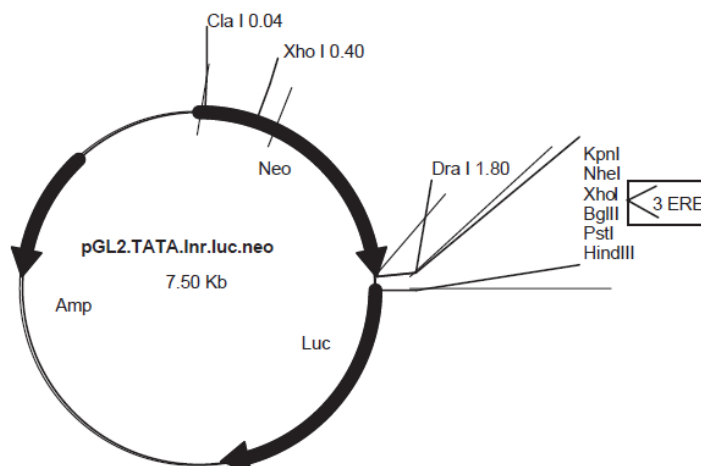
A lo largo de este trabajo se emplearon dos modelos experimentales:

- La línea celular reportera T47D-KBluc que fue utilizada para desarrollar los estudios *in vitro*
- Ratones de la cepa C57BL/6j transgénicos para el gen GFP bajo el promotor Oct4, que fueron utilizados para los estudios *in vivo*

#### 3.2.1- Línea celular reportera T47D-KBLuc

La línea celular reportera T47D-KBLuc fue adquirida a ATCC (CRL\_2865<sup>TM</sup>). La misma fue desarrollada a partir de la línea celular T47D proveniente de cáncer de mama. La misma expresa ambos receptores para estrógenos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) y fue transfectada con un plásmido reportero que posee el gen de la luciferasa bajo un promotor que contiene 3 elementos de respuesta a estrógenos (51). De esta manera, la presencia de estrógenos es revelada en estas células a través de la medición de luz producida por la luciferasa, cuya expresión es dirigida por el elemento de respuesta a estrógenos. En la figura 3 se muestra el mapa del plásmido empleado para generación de la línea reportera.

Para su mantenimiento, la línea celular se cultivó en frascos de 25-75 cm<sup>2</sup> a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> en RPMI completo suplementado con 10% SFB (medio de mantenimiento).



**Figura 3. Esquema del plásmido pGL2.TATA.INR.luc.neo utilizado para la generación de la línea celular T47DKBluc.** El mismo contiene el gen de la luciferasa regulado por 3 elementos de respuesta a estrógenos.

### 3.2.1.1- Expansión de la línea celular

La expansión de la población celular se llevó a cabo sembrando las células en frascos de 25 cm<sup>2</sup> conteniendo 10 mL de medio de mantenimiento o en frascos de 75 cm<sup>2</sup> conteniendo 20 mL del mismo medio, renovándolo cada 4 días. Antes de llegar a confluencia, 1 vez por semana, las células se repicaron con tripsina y se pasaron a un nuevo frasco. Cada lote de células se mantuvo en cultivo durante un período de tiempo limitado (3 meses). Pasado este período, se descongeló un nuevo lote para la propagación celular y la posterior utilización de las células en los ensayos.

### 3.2.1.2- Tripsinización de células

Las células fueron separadas de la superficie de cultivo mediante un tratamiento con tripsina (tripsinización). Para ello, se aspiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular con *Buffer* fosfato salino (PBS) estéril. Posteriormente, se agregó 0,5 a 1 mL de solución de tripsina-EDTA y la misma se dejó actuar durante 3 min a 37°C. Tanto la tripsina como el medio completo utilizado fueron reactivos libres de rojo fenol. Esto se debe a que el rojo fenol tiene un parecido estructural a algunos estrógenos no esteroideos y puede unirse al receptor de estrógenos con una baja afinidad (52), pudiendo interferir en los ensayos de respuesta a estrógenos.

Finalmente, se verificó mediante visualización al microscopio la separación de todas las células de la superficie de cultivo y se agregó medio fresco. Una alícuota de la suspensión celular se utilizó para el recuento en cámara de Neubauer, previa tinción con azul de tripán 0,5%, y se eligió la densidad de siembra apropiada según la superficie de cultivo a utilizar.

### 3.2.1.3- Criopreservación y descongelamiento de células

Para la criopreservación, se tripsinizaron células en fase de crecimiento exponencial, se contaron y se centrifugaron a 200 g por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en el medio de congelación (10 % DMSO y 90 % SFB) a razón de 3x10<sup>6</sup> células en 1,5 mL. Los criotubos fueron almacenados a -80°C utilizando un sistema de enfriamiento progresivo de 1°C por minuto (Nalgene) y a las 24h se transfirieron a nitrógeno líquido.

El descongelamiento de cada lote de células se llevó a cabo en forma rápida, para maximizar la supervivencia celular. Cada tres meses se retiró un criotubo del tanque de nitrógeno líquido y se lo llevó a un baño a 37 °C durante aproximadamente 2 min, agitándolo hasta el descongelamiento de su contenido. Posteriormente, la suspensión celular se transfirió a un tubo falcon de 15 mL conteniendo 10 mL de medio de mantenimiento, termostatzado a 37 °C y se centrifugó a 200 g por 5

min. Se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 mL de medio de mantenimiento, se realizó el recuento y la determinación de la viabilidad de las células recuperadas. Finalmente las células fueron sembradas en frascos de 25 o 75 cm<sup>2</sup>, según la demanda de células a utilizar en los ensayos.

#### 3.2.1.4- Recuento celular y evaluación de viabilidad con Azul de Tripán

Se realizó el recuento celular en cámara de *Neubauer* empleando diluciones convenientes de acuerdo con la densidad celular de la muestra. La concentración de células viables se determinó empleando el método de exclusión con Azul de Tripán en el cual sólo las células muertas incorporan el colorante ya que está comprometida la integridad de la membrana plasmática. Las muestras fueron incubadas con una solución de Azul de Tripán 0,5 % en PBS y sembradas en la cámara.

#### 3.2.2- Animales transgénicos Oct-4 GFP

Para este trabajo se utilizó el modelo de ratón transgénico Oct-4 GFP, perteneciente a la cepa C57BL/6j el cual expresa GFP bajo el promotor Oct-4 (53). El Octamer-4 (Oct-4) es un factor de transcripción implicado en la renovación de células madre embrionarias no diferenciadas, que se expresa en los diferentes estadios de desarrollo de las células germinales. El ratón transgénico Oct-4-GFP tiene la particularidad de expresar GFP sólo en las células germinales más indiferenciadas y no en las células somáticas.

Este modelo se ha utilizado para el estudio de la maduración de las células germinales en la etapa embrionaria, fetal y prepuberal distinguiendo las células germinales más primitivas (células germinales primordiales, gonocitos y gonias A) de las otras poblaciones celulares que componen el órgano. El empleo de estos ratones reporteros permite aislar poblaciones de células germinales puras a partir de los diferentes estadios de desarrollo, ya sea para estudiar su naturaleza, para estudios de cuantificación de expresión génica y/o para el aislamiento de nuevos genes.

La colonia de ratones Oct-4 GFP, cedida gentilmente por el Dr. Konstantinos Anastassiadis (Biotec, Dresden, Alemania), es una colonia estable dentro del bioterio SPF (libre de patógenos específicos) del IPMont. Para todos los ensayos realizados en este trabajo los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de luz/oscuridad, con comida y agua *ad libitum*. Los protocolos llevados a cabo fueron aprobados por el comité de ética del IPMont (Aval CEUA N° de Reg.012-11).

### 3.3- Evaluación de PE con un modelo *in vitro*

#### 3.3.1- Ensayos de transactivación con la línea celular T47D-KBluc para evaluar el efecto estrogénico de perturbadores endócrinos putativos

Los ensayos de transactivación fueron realizados según el protocolo descrito por Wilson y col (51), con algunas modificaciones, a fin de optimizar las condiciones en nuestro laboratorio. Brevemente, a las células sembradas en frascos de 75 cm<sup>2</sup> en medio de mantenimiento (RPMI completo suplementado con 10% v/v SFB), se les retiró el medio y fue reemplazado por medio de pre-ensayo (RPMI completo suplementado con 10% v/v SFB DCC) y renovado 96 h después. Una vez transcurridos 7 días en el medio de pre-ensayo, las células fueron despegadas y sembradas en una placa negra de 96 pocillos con fondo transparente en medio de ensayo (RPMI completo suplementado con 5% v/v SFB DCC) en un volumen final de 100 µL por pocillo e incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Al día siguiente se agregaron los compuestos a evaluar, en un volumen final de 200 µL por pocillo. Dada la baja solubilidad de los compuestos utilizados como estímulos, en cada caso se partió de un stock en etanol absoluto 1000 X de la concentración más alta a ensayar, y a partir de la misma se hicieron diluciones sucesivas en medio de ensayo. En todos los casos, la concentración final de etanol no superó el 0,1%. En cada placa además de las diferentes concentraciones de los estímulos a ensayar se agregaron controles de vehículo (etanol 0,1%) y un control de fondo con 1 µM de ICI, un antagonista específico de estrógenos, para evaluar el nivel de estimulación basal. Para considerar válido el ensayo, de acuerdo a lo estipulado por Wilson y col. se estableció que la concentración

máxima de E2 debía producir una estimulación de al menos tres veces el valor basal. Ensayos con respuestas menores no fueron considerados para su análisis (51).

Los compuestos se incubaron durante 12, 24, 32 o 48 h, se descartó el medio por inversión de la placa, se realizaron dos lavados con PBS y se agregaron 10  $\mu$ L por pocillo de *buffer* de lisis. La placa se guardó a -20°C por un periodo mínimo de 1 h para asegurar la lisis celular.

### 3.3.2- Medición de la actividad de luciferasa

La cantidad de luciferasa expresada fue medida en función de la cantidad de luz producida en presencia de su sustrato específico D-luciferina. Para ello se utilizó el kit comercial *Luciferase Assay System*, según especificaciones del fabricante. Brevemente, las células fueron descongeladas, el lisado fue homogeneizado y a cada pocillo se le agregó 50  $\mu$ L del reactivo de luciferasa. Inmediatamente después la placa fue introducida en un lector de luminiscencia (LUMIstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) y se realizó la lectura de luz de cada pocillo. Cada muestra se realizó por cuadruplicado y los valores de luz se expresaron como veces de inducción respecto del vehículo.

Los datos así obtenidos fueron graficados en función del logaritmo de la concentración y ajustados a un modelo dosis respuesta empleando el programa estadístico *GraphPad Prism v5*.

### 3.3.3- Optimización del ensayo de transactivación

Para optimizar las condiciones del ensayo de transactivación se llevó a cabo una serie de experimentos variando diferentes parámetros, a continuación detallados. En todos los casos el estímulo estrogénico de referencia utilizado fue el E2 y para algunos casos particulares el EE2.

#### 3.3.3.1- Determinación de la densidad celular a emplear

Para establecer la densidad celular óptima para estos ensayos, se sembraron diferentes densidades celulares ( $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$  y  $5 \times 10^4$  células/pocillo) por duplicado. Al día siguiente se agregó el estímulo EE2 en una concentración de 10 nM. Transcurridas 24 h de incubación la placa se procesó y se midió la actividad luciferasa con el lector de luminiscencia. El tiempo de lectura por pocillo fue de 1 s, con una ganancia máxima (4096).

#### 3.3.3.2- Tiempo de incubación con los estímulos

Se sembraron  $3 \times 10^4$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos negra, con fondo transparente. Las células se estimularon al día siguiente con E2 en un amplio rango de concentraciones (10nM a 0,00001nM) durante 12, 24, 36 y 48 h. Transcurridos los respectivos tiempos de incubación, las células fueron lisadas y se midió la actividad de luciferasa con un lector de luminiscencia. El tiempo de lectura por pocillo fue de 1 s, con una ganancia máxima (4095).

#### 3.3.3.3- Medición de la luz producida

Para optimizar el protocolo de medición de luz en el lector de luminiscencia, en primer lugar se evaluaron diferentes tiempos de lectura (10 y 1 s), diferentes ganancias (4095 y 2000) y, por último, una vez definidos estos parámetros, se procedió a realizar mediciones sucesivas en el tiempo con un mismo protocolo (10 s de medición, ganancia de 4095), para evaluar la estabilidad de la luz producida.

### 3.3.4-Ensayos de viabilidad celular

Para descartar el efecto citotóxico de los compuestos se realizaron estudios de viabilidad celular utilizando el reactivo *WST-1 Cell Proliferation Reagent* (ROCHE, Manheim, Alemania). Este ensayo es una herramienta rápida para determinar viabilidad celular en casi cualquier modelo *in vitro*. Se basa en el clivaje enzimático de la sal de tetrazolio a formazán llevado a cabo por las enzimas

deshidrogenasas mitocondriales presentes en las células viables. Este proceso genera un cambio de color que puede ser cuantificado.

Se sembraron  $6 \times 10^4$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos en medio de cultivo de ensayo en un volumen final de 100  $\mu$ L. Las células se incubaron a 37°C y 5%CO<sub>2</sub> hasta el día siguiente, para asegurar la adherencia de las mismas y posteriormente se agregaron los compuestos, en un volumen final de 200  $\mu$ L por pocillo. Dada la baja solubilidad de los mismos, en cada caso se partió de un stock en etanol absoluto 1000 X de la concentración más alta a ensayar, y a partir de la misma se hicieron diluciones sucesivas en medio de ensayo. En todos los casos, la concentración final de etanol no superó el 0,1 %. En cada placa además de las diferentes concentraciones de los estímulos a ensayar se agregó un control 100% viabilidad (representado por el vehículo etanol 0,1 %) y un control 100 % mortalidad (tritón X-100 0,2 %) Al día siguiente se retiraron 100  $\mu$ L de medio de cultivo de cada pocillo y se agregaron 10  $\mu$ L del reactivo WST-1. El color producido como consecuencia de la oxidación del tetrazolio se midió con un espectrofotómetro a 450 nm y a 650 nm a las 4 h de incubación con el reactivo, tiempo en el cual la lectura se había estabilizado.

Para el análisis de datos se restó a la medida de absorbancia a 450 nm la medida a 650 nm (fondo de placa) y el valor obtenido se normalizó en función de las absorbancias del control de viabilidad y mortalidad. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

### 3.3.5- Ensayos de especificidad de respuesta estrogénica

Para confirmar que la respuesta obtenida en los ensayos de transactivación fuera producto de la activación del receptor de estrógenos se realizó un ensayo en el cual se incubaron conjuntamente los estímulos en las concentraciones estipuladas y el antagonista puro de ER, ICI, en una concentración no citotóxica de 1  $\mu$ M. Dado que la afinidad de este antagonista por el receptor es muy alta (IC<sub>50</sub> 0,29 nM) se establece una competencia con el compuesto que culmina con el desplazamiento de éste de su unión al receptor.

Se sembraron  $3 \times 10^4$  células por pocillo en una placa de 96 pocillos negra, con fondo transparente en medio de ensayo. A las 24 h se procedió con la estimulación de las células con volúmenes iguales del compuesto a evaluar junto con el ICI (50  $\mu$ L respectivamente), de forma que las concentraciones finales fueran las deseadas. Luego de 24 h de incubación se procesaron las células y se midió la actividad de la luciferasa, de acuerdo a lo especificado en las secciones anteriores.

## 3.4- Evaluación de PE con un modelo *in vivo*

### 3.4.1- Genotipado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Previo a la utilización de los animales para cada ensayo se realizó la tipificación de los mismos mediante la técnica de PCR.

#### 3.4.1.1- Extracción de ADN

El ADN se extrajo a partir de un fragmento de cola u oreja de los animales, obtenido antes del destete. Las muestras fueron incubadas en *buffer* de lisis (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,5 % v/v, proteinasa K 500  $\mu$ g/mL) a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se agregó NaCl 5 M, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 9500 rpm por 10 min y el sobrenadante (conteniendo el ADN) se trasvasó a un tubo *ependorf* conteniendo 800  $\mu$ L de etanol absoluto. Se mezcló por inversión, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min y el sobrenadante fue descartado. El ADN recuperado en el *pellet* se lavó dos veces con etanol 70 % y el etanol remanente se eliminó incubando las muestras sobre un termobloque a 37°C. Una vez seco, el ADN fue resuspendido en agua estéril y cuantificado por medio de la absorbancia a 260nm, empleando el *Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)*. La pureza del ADN recuperado se evaluó en función de la relación 260 nm/280 nm, que en todos los casos superó el valor de 1,8.

### 3.4.1.2- Reacción en cadena de la Polimerasa

La tipificación para el transgen (Oct4-GFP) en los animales utilizados se realizó por PCR de ADN genómico obtenido de fragmentos de cola u orejas. Los iniciadores utilizados para amplificar el gen GFP fueron:

GFP FORWARD: 5'-CTT CTT CAA GGA CGA CGG CAA CTA-3'

GFP REVERSE: 5'-ATC GCG CTT CTC GTT GGG GTC TTT-3'

Como control interno de la técnica se empleó el gen de expresión constitutiva Mena 2, siendo los primer :

Mena FORWARD: 5'- GGC AGG ACT TGA ATC TGG AG -3'

Mena REVERSE: 5'- CAG CAC ACT GAG GGG ACA G -3'

La mezcla de reacción se preparó según lo indicado en la tabla 1. En todos los casos se corrió en paralelo un control GFP positivo, un control GFP negativo y un control de agua ultra pura. El protocolo de ciclado fue el siguiente: 94°C 4min/ (94°C 45 s, 55°C 1 min, 72°C 1 min) x 35 ciclos / 72°C 10 min/ 4°C.

**Tabla 1. Detalle los reactivos y las cantidades necesarias para la reacción de PCR.**

Reactivo	Cantidad para una reacción (µL)
Taq Buffer 10X	5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,75
dNTP mix (5mM)	1
Iniciador Oct-4 FORWARD (10mM)	0,5
Iniciador Oct-4 REVERSE (10mM)	0,5
Iniciador Mena FORWARD (10mM)	0,5
Iniciador Mena REVERSE (10mM)	0,5
Taq Polimerasa (Invitrogen) (5U/µL)	0,5
Agua ultra pura	39,75
Templado ( Entre 200 a 1000 µg)	1
Volumen final	50

Los amplicones obtenidos (GFP: 355pb; Mena: 165pb) fueron sembrados en un gel de agarosa 1,5 % en 0,5 X TBE y corridos durante 40 min a 100V. Las bandas se revelaron por incubación del gel con el intercalante *Gel Red* (Biotium) y se observaron en un transiluminador (SYNGENE).

### 3.4.2- Tratamiento de los animales

Para estudiar los efectos de la exposición a PEG en los períodos prenatal (exposición *in útero*) y postnatal temprano (exposición a través de la leche materna), ratones hembras Oct4-GFP preñadas fueron tratadas por vía intragástrica con distintos compuestos desde el DPC5 hasta el DPN 7.

Para ello, 10 machos Oct4-GFP (de 3-6 meses de edad) fueron apareados con 20 hembras Oct-4 GFP (2-3 meses de edad) en la relación de 1 macho x 2 hembras. Al día siguiente y durante los sucesivos 7 días se verificó la presencia de tapón vaginal (tapón de semen observado en la vagina de la hembra que indica que hubo copulación). Aquellas hembras que presentaron tapón fueron separadas del macho y ese día se contabilizó como día DPC 0,5.

Las hembras con presencia de tapón vaginal fueron divididas en los siguientes grupos, de acuerdo al compuesto a ser evaluado:

- EE2: 5µg/kg/día (control positivo de acción estrogénica)
- BPA 50µg/kg/día (PEg)
- 4-MBC: 120µg/kg/día (PEg)
- ETOH 0,1% (vehículo para EE2 y BPA)
- Aceite de oliva (vehículo para 4-MBC)

En el DPC 5,5 las hembras fueron pesadas y se inició la administración de los compuestos mediante sonda intragástrica en un volumen de 200 µL por día. Al DPC 11,5; 15,5; 19,5 y luego del parto, los animales fueron nuevamente pesados y se reajustó la dosis de los compuestos. La dosis post-parto se mantuvo hasta el DPN 7 de las crías, momento en que finalizó la administración de los compuestos.

### 3.4.3- Administración de los compuestos

Los compuestos fueron administrados vía intragástrica en un volumen final de 200 µL diarios. En todos los casos se partió de soluciones *stock* y se realizaron las diluciones correspondientes para cada animal de acuerdo a su peso en agua filtrada estéril o aceite de oliva. Los *stocks* de EE2 y BPA se prepararon en etanol absoluto mientras que el 4-MBC debido a su baja solubilidad debió ser disuelto en aceite de oliva. En los casos en que se empleó etanol como vehículo, éste no superó el 0,1 % en la solución final administrada.

### 3.4.4- Sacrificio de los animales

Al DPN 7 se sacrificó una parte de las crías mientras que el resto fue sacrificado al DPN 135 para estudiar posibles efectos de los compuestos en la etapa adulta. Las crías de 7 días fueron sacrificadas por decapitación; los macho adultos utilizados para estudios espermáticos fueron sacrificados por dislocación cervical, método recomendado para la realización de estudios espermáticos, y las hembras en cámara de CO<sub>2</sub>.(54)

### 3.4.5- Disgregación de células germinales de testículo

Luego de extraer y disecar las gónadas bajo lupa, debido a su pequeño tamaño, se removió la túnica albugínea y los testículos fueron colocados en una placa de 12 pocillos en PBS-BSA 2 % para su tipificación visual empleando un microscopio de epifluorescencia (*OlympusIX81*). Para la disgregación de las células germinales los testículos fueron colocados en tubos *ependorf* conteniendo 1mL de colagenasa 1mg/mL (SIGMA) e incubados por 15 min en termobloque a una temperatura de 32-35°C, agitándolos en vortex cada 5 min. Transcurrido este tiempo, los tubos fueron centrifugados nuevamente a 300g por 5 min. Posteriormente, se descartó la colagenasa, se lavó 2 veces con PBS y se descartó el sobrenadante. Se agregó tripsina-EDTA y se incubó nuevamente en un termobloque por 20 min a 32-35°C. Finalizada la incubación, la tripsina se inactivó con SFB, se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió en 1 mL de DMEM con 10% v/v SFB, se homogeneizó la suspensión con pipeta varias veces para terminar de disociar los cúmulos celulares y se filtró con membrana de filtración con un poro de 50 µm.

La suspensión filtrada se centrifugó a 300 g por 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en PFA 4%, manteniendo la suspensión en esta solución durante 2 h para su fijación. Finalizada la fijación se centrifugaron y resuspendieron las muestras en PBS BSA 2% para su almacenamiento. Transcurridas 24 h de la fijación se procedió al análisis por citometría de flujo.

### 3.4.6- Análisis por citometría de flujo

Las suspensiones celulares testiculares fueron analizadas con un citómetro de flujo CyAn™ ADP (Beckman Coulter) equipado con un láser azul de 488 nm y uno rojo de 635 nm. Los datos fueron analizados con los programas *Summit v4.3* (Dako Inc, CO, USA) y *FlowJo* (TreeStar, Ashland, OR, USA). Se llevó a cabo el análisis de los siguientes parámetros: FSC vs SSC (tamaño vs complejidad celular), FSC vs ancho de pulso (para la discriminación de dobletes), FL 1 (filtro 530/40) para la

detección de Oct4-GFP. Para cada muestra celular se colectaron 10.000 eventos de la población de interés a una velocidad de entre 500 y 800 eventos por segundo. El porcentaje de células Oct4-GFP positiva y la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) fueron evaluados utilizando un gráfico de puntos de SSC vs FL1. La MFI de Oct-4/GFP positiva fue normalizada en función de la MFI de la población Oct4-GFP negativa, para lo cual se definió el parámetro Incremento de la Media de Intensidad de Fluorescencia (Incremento MFI), definida como:

$$\text{Incremento MFI} = \frac{(\text{MFI GFP}^+ - \text{MFI GFP}^-)}{\text{MFI GFP}^-}$$

GFP<sup>+</sup> corresponde a la fracción de la población que expresa GFP y GFP<sup>-</sup> a la fracción de la población negativa para GFP.

Los recuentos se realizaron con perlas de conteo *CountBright absolute* (Invitrogen).

### 3.4.7- Análisis espermático

Al DPN 135 los machos adultos fueron sacrificados por dislocación cervical. Los espermatozoides fueron obtenidos de la cola del epidídimo, disgregados con una aguja para liberar los espermatozoides y colocados en 1 mL de PBS a 37°C e incubados durante 10 min. Finalizado este período de tiempo se recuperó el volumen y se homogeneizó la suspensión celular a partir de la cual se realizaron los ensayos de viabilidad celular, recuento y motilidad espermática.

#### 3.4.7.1- Viabilidad y recuento espermático

La viabilidad espermática se evaluó por tinción con Ioduro de Propidio (10) por citometría de flujo, el recuento espermático se llevó a cabo utilizando perlas de conteo.

Se tomó una alícuota de 30 µL de la suspensión de espermatozoides y se le agregó 3 µL de perlas de conteo *CountBright absolute* y 267 µL de PBS para llegar a un volumen final de 300 µL. Para el análisis de viabilidad se agregaron 2 µL de IP 200 µg/mL. Se llevó a cabo el conteo con los siguientes parámetros: FSC vs SSC (tamaño vs complejidad celular), FSC vs FL 2 (575/25) para estimar las células permeables a IP (células muertas) y para las perlas FL4 (670/20)/FL5(740LP). Se fijó el límite de adquisición en 1000 eventos en la región correspondiente a las perlas de conteo a una velocidad de entre 500 y 800 eventos por segundo. Se calculó la concentración de espermatozoides presentes en la muestra conociendo que las 1000 perlas contabilizadas se encontraban en un volumen de 100 µL de muestra.

#### 3.4.7.2- Evaluación de motilidad

Se tomó una alícuota de 10 µL y se lo colocó en un portaobjetos, se lo recubrió con un cubre objetos de 20 mm x 20 mm. Se observó al microscopio y se contaron 200 espermatozoides en al menos 5 campos por duplicado. Se evaluaron 3 tipos de motilidad.

- Motilidad progresiva: espermatozoides que se mueven linealmente o en círculos.
- Motilidad no progresiva: se mueven pero no se desplazan.
- No mótil: no tienen movimiento.

## 3.5- Análisis estadístico

En todos los casos los datos se expresaron como la media +/- el desvío estándar (SD).

En los ensayos *in vitro*, cada condición fue realizada por triplicado o cuadruplicado en al menos dos o tres experimentos independientes. Los resultados de los ensayos *in vivo* se obtuvieron de 2 ensayos independientes para el caso de las crías y de un solo ensayo en el caso de análisis de adultos.

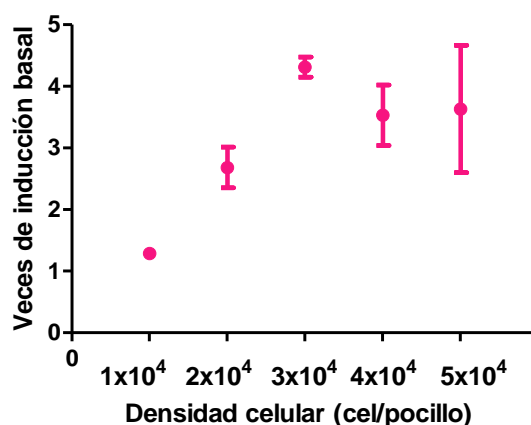
Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando el test ANOVA y en los casos donde se encontraron diferencias significativas, se aplicó el test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Tanto el análisis estadístico como el ajuste al modelo de dosis respuesta fueron realizados con el programa *Graph Pad Prism v5*.

## 4-Resultados

### 4.1- Optimización del modelo *in vitro* para evaluación de PE

#### 4.1.1- Determinación de la densidad celular a emplear

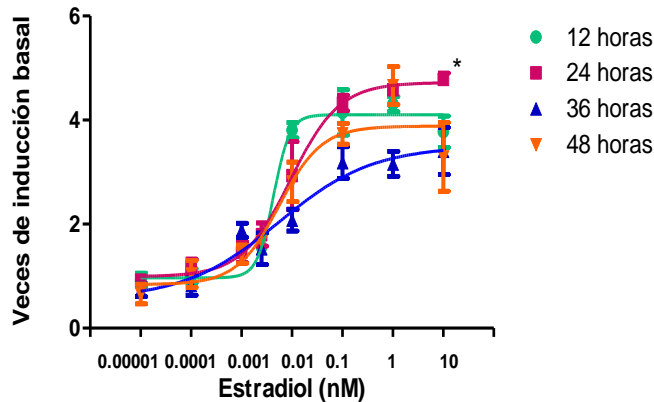
Para establecer las condiciones óptimas del modelo *in vitro* utilizando la línea celular reportera T47D-KBluc se procedió a evaluar la respuesta a EE2 10 nM utilizando cinco densidades celulares diferentes  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$  y  $5 \times 10^4$  células/pocillo. Cada densidad celular se evaluó por duplicado. Como se muestra en la figura 4 la densidad celular que generó la máxima respuesta fue  $3 \times 10^4$  células/pocillo. Densidades menores alcanzaron niveles de inducción menor, mientras que a mayores densidades celulares, si bien el nivel de inducción fue el mismo que con  $3 \times 10^4$  células/pocillo, la dispersión entre las réplicas fue mayor. Por lo que se seleccionó la densidad de  $3 \times 10^4$  células/pocillo para emplear en los sucesivos experimentos.



**Figura 4. Determinación de la densidad celular óptima a utilizar en los ensayos de transactivación.** Se comparó la respuesta luego de 24 h de estimulación con EE2 10 nM a diferentes densidades celulares iniciales. Los resultados se expresaron como veces de inducción y fueron calculados con respecto al valor obtenido para el vehículo.

#### 4.1.2- Determinación del tiempo de estimulación

Con el fin de determinar el tiempo de incubación óptimo para la expresión de la luciferasa, se realizó una prueba a distintos tiempos de estimulación (12, 24, 36, 48 h) empleando E2 como estímulo estrogénico. En la figura 5 se observa que a partir de las 12 h de estimulación se detectó actividad de luciferasa y que la respuesta a E2 se mantuvo al menos hasta 48 h luego de la estimulación. La respuesta a la máxima concentración de E2 fue significativamente mayor a las 24 h de incubación, por lo que se definió 24 h como período óptimo a emplear en los siguientes ensayos.



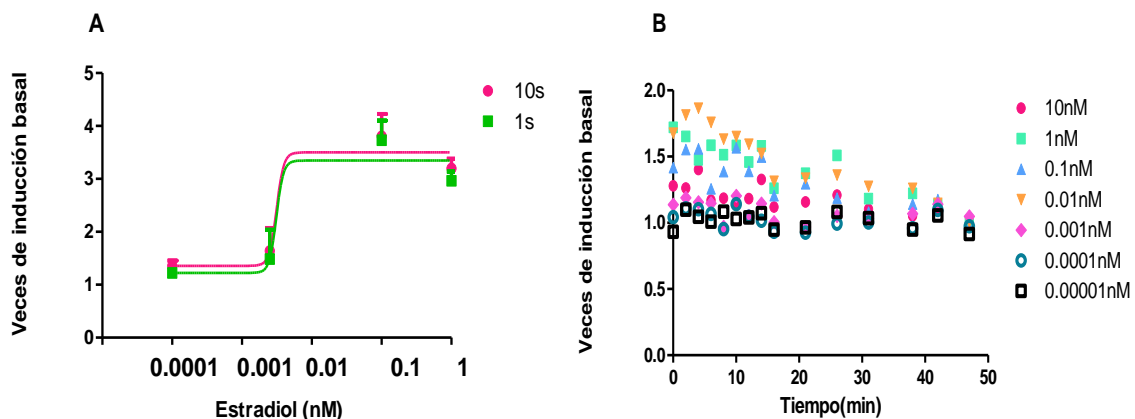
**Figura 5. Determinación del tiempo óptimo de estimulación.** Respuesta obtenida en los ensayos de transactivación a 12, 24, 36 y 48 h de incubación con E2. \*= $p < 0,05$  respecto a los otros tiempos para una misma concentración.

#### 4.1.3- Determinación del protocolo para medición de luz

Se realizaron medidas de luz con diferentes protocolos, según lo descrito en Materiales y Métodos, para establecer las mejores condiciones de medición de luz producida por la luciferasa. La Figura 6 panel A, muestra los valores obtenidos con 2 protocolos de luminómetro diferentes. En uno de ellos el tiempo de adquisición de la lectura se fijó en 10 s mientras que para el otro fue de 1 s, en ambos la ganancia se mantuvo en 4095. No se observaron diferencias significativas entre ambos protocolos, por lo que se optó por el mínimo tiempo de lectura, a fin de agilizar la medición.

Otro parámetro evaluado fue la ganancia. La misma muestra se midió durante 1 s con una ganancia de 2000 o 4095. Cuando se redujo el valor de la ganancia a 2000 (datos no mostrados) no se pudo observar respuesta dosis dependiente, por lo que se fijó la ganancia a 4095.

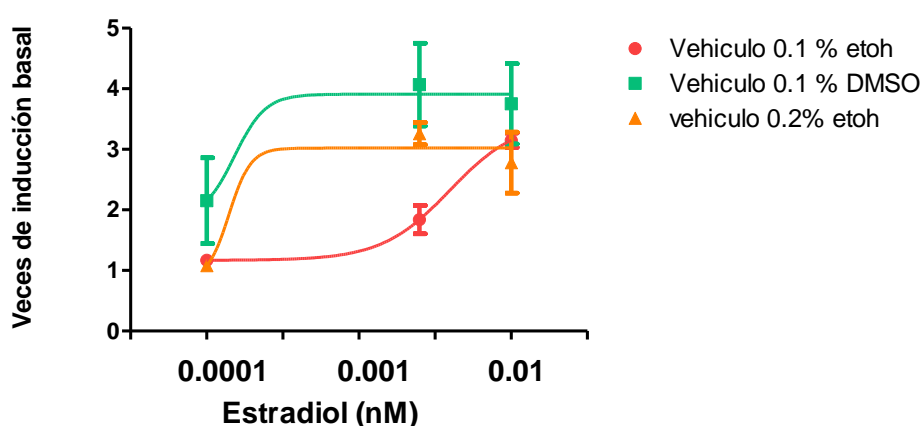
Una vez establecidos el tiempo de lectura (1 s) y la ganancia (4095) se procedió a evaluar la estabilidad de la lectura tomando mediciones de las mismas muestras a intervalos de tiempo cortos durante un lapso máximo de 45 min. En la figura 6 panel B, se observa que los valores permanecieron estables en el tiempo durante los primeros 10 min, y que pasado este tiempo las diferencias entre las lecturas de las distintas concentraciones de E2 se redujo, implicando una disminución de la sensibilidad del método para tiempos mayores a 10 min.



**Figura 6. Determinación del protocolo óptimo para medición de luz.** A) Protocolos con diferentes tiempos de lectura. La misma muestra fue leída durante dos tiempos diferentes (1 y 10 s) ambos con una ganancia máxima de 4096. B) Variación de las medidas de luz en el tiempo. La misma muestra se midió cada 2 min durante los primeros 15 min y luego cada 10 min durante 50 min. Como estímulo se emplearon diferentes concentraciones de EE2.

#### 4.1.4- Elección del vehículo

Dado que los compuestos a evaluar en los ensayos *in vivo* poseen una baja solubilidad en agua, se probaron diferentes sustancias para vehicularlos: DMSO 0,1% y etanol 0,2% y 0,1% (valores de concentración final). Para ello se evaluó la respuesta a tres concentraciones de E2 (baja, media y alta), empleando los tres vehículos antes mencionados. En la figura 7 se observa que si bien no se encontraron diferencias significativas entre los valores de respuesta máximo y mínimo para los tres vehículos, el uso de etanol 0,1% permitió distinguir claramente entre los tres niveles de respuesta (bajo, medio ,alto), por lo que se estableció su uso como vehículo para aquellos compuestos solubles en etanol.



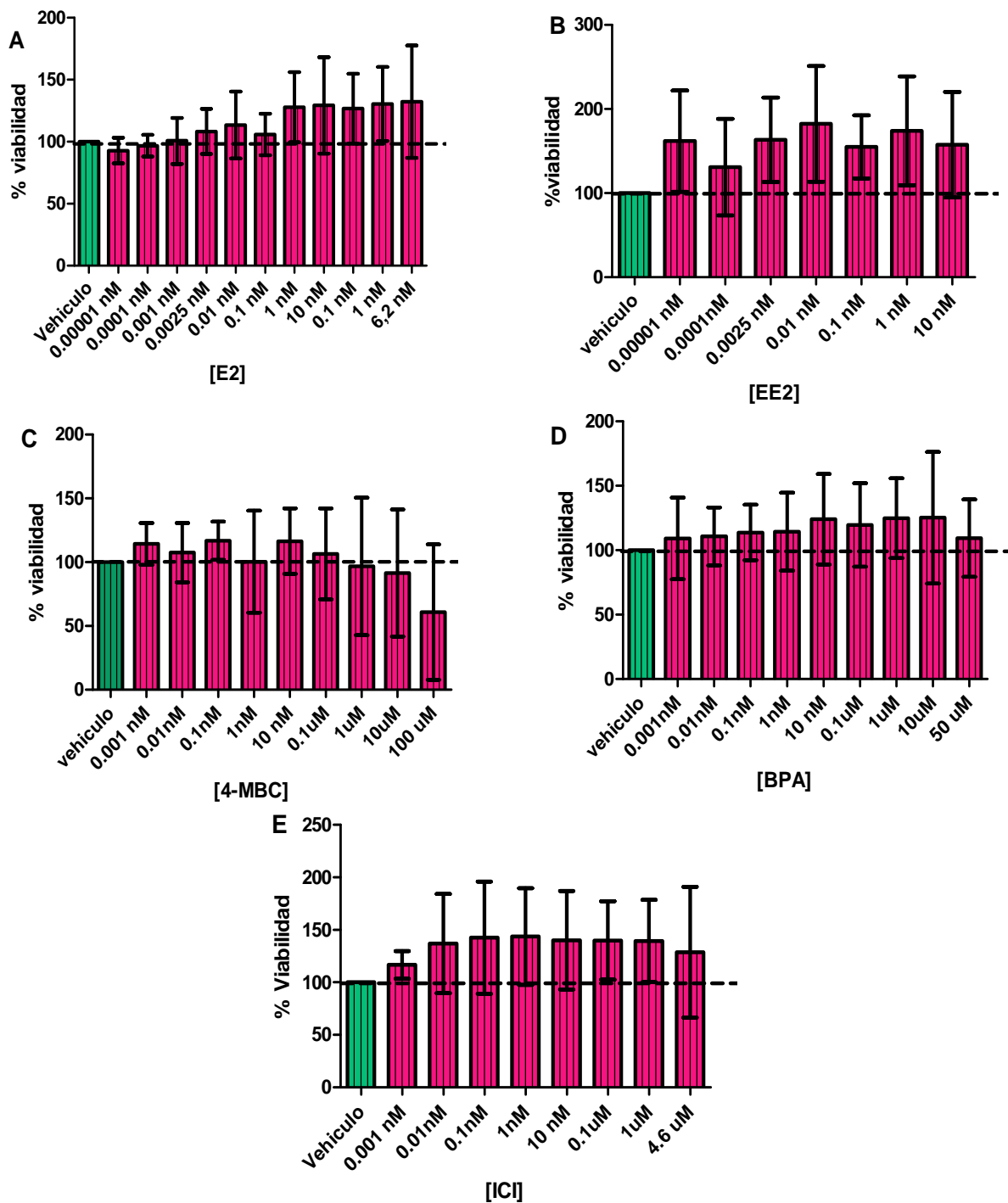
**Figura 7. Elección del vehículo.** Se evaluaron diferentes vehículos (DMSO 0,1 %, ETOH 0,1 % y 0,2 %) para solubilizar E2 en tres concentraciones (0,0001; 0,0025; 0,01 nM).

## 4.2- Evaluación de la capacidad de diferentes compuestos como PE utilizando un modelo *in vitro* reportero

### 4.2.1- Ensayos de citotoxicidad

Previo al desarrollo de los ensayos de transactivación, para descartar un posible efecto tóxico, se evaluó la citotoxicidad de los compuestos E2, EE2, BPA y 4-MBC en distintas concentraciones y usando el reactivo WST-1, de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos.

Los resultados mostraron que a las concentraciones empleadas en los ensayos de transactivación, ninguno de los compuestos utilizados resultó tóxico (figura 8) ya que no hubo diferencias entre las diferentes concentraciones utilizadas y el vehículo. En el caso del BPA y del 4-MBC concentraciones mayores a 50 y 100  $\mu$ M respectivamente, produjeron muerte celular (datos no mostrados) por lo que concentraciones mayores o iguales a esas fueron eliminadas de los ensayos de transactivación.



**Figura 8. Ensayos de citotoxicidad de los compuestos estudiados.** Las concentraciones máximas a emplear de los compuestos en los ensayos de transactivación, se definieron en función a aquellas que no produjeran muerte celular. A) E2; B) EE2; C) BPA; D) 4-MBC; E) ICI. Los resultados se expresaron como % de viabilidad con respecto al vehículo considerándolo a éste como 100 %.

## 4.2.2- Ensayos de transactivación con PE

Para evaluar la capacidad para actuar como PEG de los compuestos EE2, BPA y 4-MBC se llevaron a cabo ensayos de transactivación con la línea celular reportera T47D-KBluc. El E2, un estrógeno puro, se utilizó como control positivo del ensayo. En la figura 9 se observa la respuesta generada por los compuestos evaluados. En los casos donde fue posible, los valores obtenidos se ajustaron a un modelo dosis-respuesta, a partir del cual se calculó el EC50 (dosis de compuesto necesaria para obtener el 50% de respuesta máxima). Para el caso de EE2, el EC50 fue de 0,01 nM, al igual que para el E2. El EC50 para el compuesto BPA fue de 0,47  $\mu$ M y en el caso del 4-MBC no fue posible ajustar los valores al modelo por lo que no se calculó el EC50.

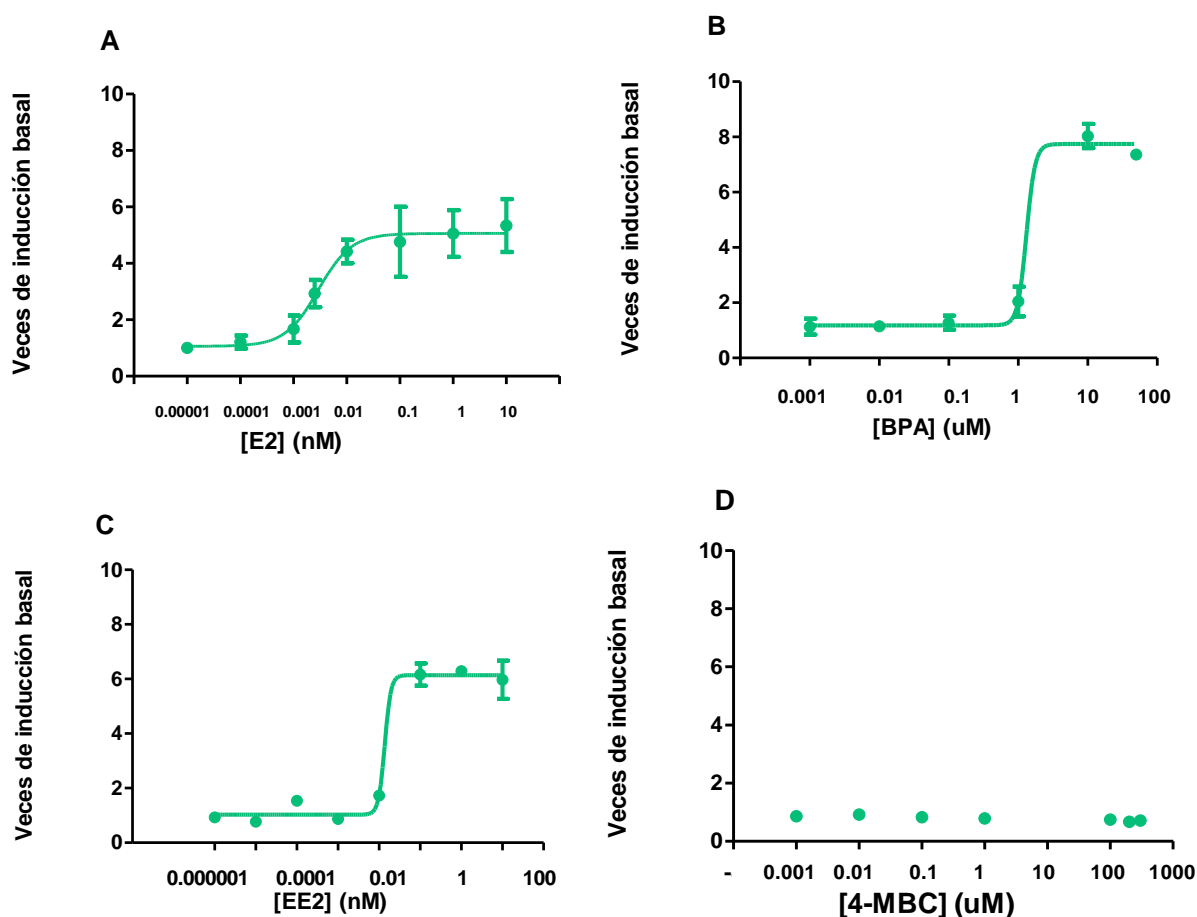
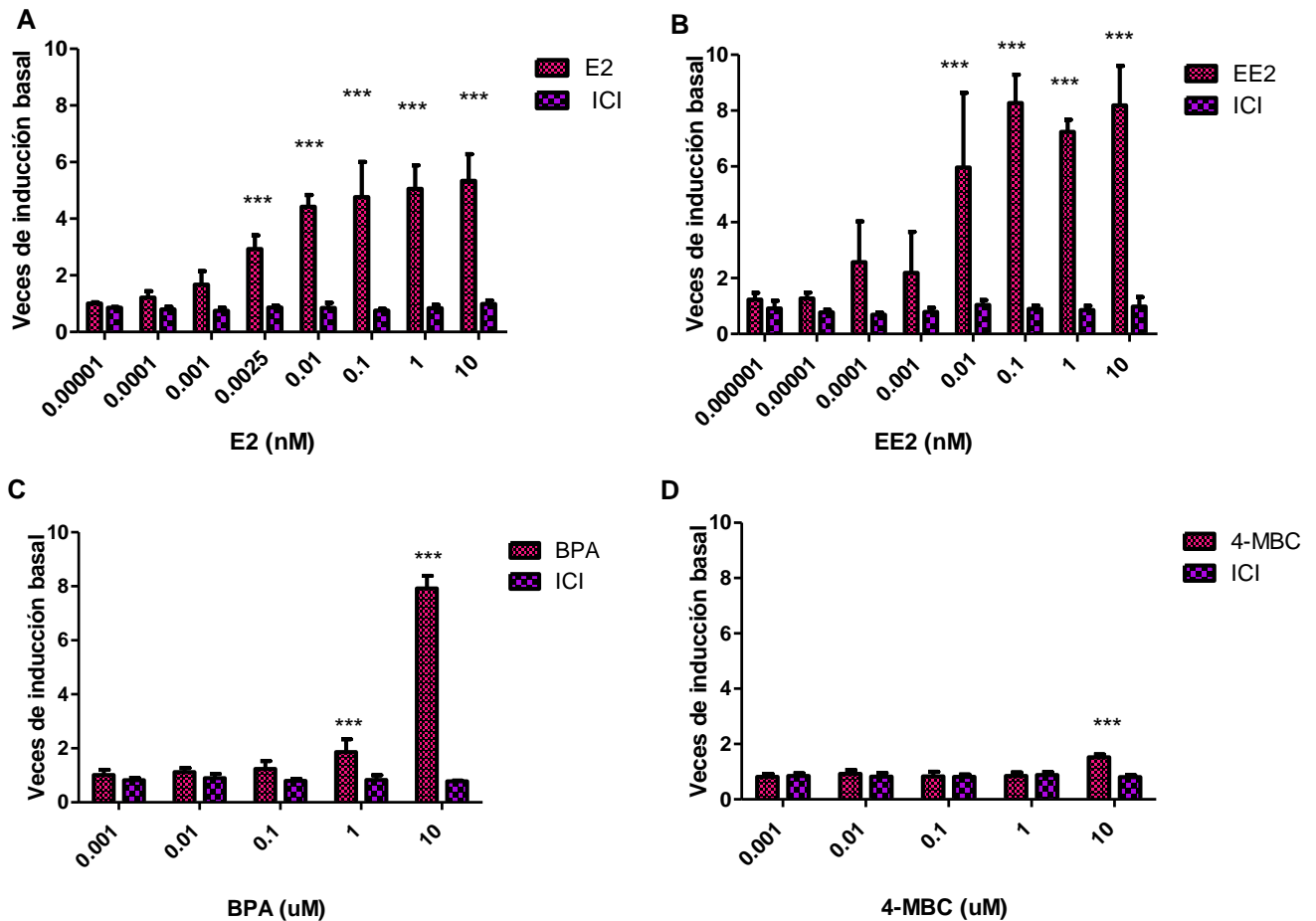


Figura 9. Respuesta de la línea celular T47DKBluc a los compuestos evaluados en los ensayos de transactivación. A) E2, B) BPA, C) EE2, D) 4-MBC.

## 4.2.3- Especificidad de la respuesta estrogénica

Con el fin de confirmar que la respuesta obtenida en los ensayos de transactivación fuera debido a la unión específica de los compuestos al ER, se realizó una incubación conjunta con el antagonista puro del ER, ICI, en una concentración 1  $\mu$ M. En la figura 10 se puede observar que la coincubación del estímulo estrogénico en presencia del antagonista ICI disminuyó significativamente la respuesta, revirtiendo el efecto observado con el estímulo solo, incluso para el 4-MBC.



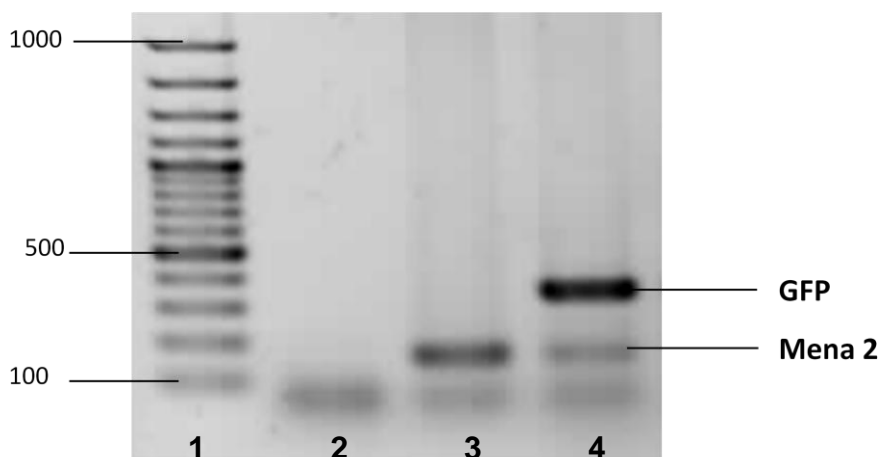
**Figura 10. Especificidad de la respuesta estrogénica.** Las células T47DKBluc fueron incubadas con el estímulo estrogénico en ausencia (barras rojas) y presencia (barras violetas) del antagonista puro ICI 1 μM durante 24 h. A) E2; B) EE2; C) BPA; D) 4-MBC. \*\*\*  $p < 0,0001$  respecto a la misma concentración del estímulo sin ICI.

### 4.3- Evaluación de la capacidad de diferentes compuestos como PE utilizando un modelo *in vivo*

Para evaluar los efectos de la exposición perinatal a PE sobre el desarrollo de células germinales masculinas y la capacidad reproductiva adulta, se llevó a cabo un ensayo *in vivo* utilizando ratones transgénicos OCT4-GFP, de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos.

#### 4.3.1- Tipificación por PCR

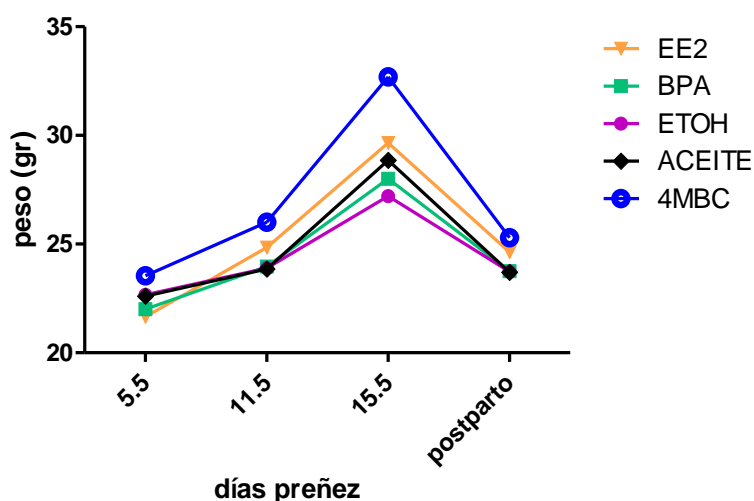
Para discriminar los ratones Oct4- de los Oct4+ necesarios para los ensayos se realizó la tipificación por PCR a partir de ADN extraído de la cola. En la figura 11 se muestra un gel de agarosa en el cual se corrieron los productos de la reacción de PCR. En los carriles 3 y 4 se observan las muestras obtenidas a partir de cola, en todos los casos se observa la banda correspondiente al gen Mena 2 (165 pb) y en las muestra del carril 4 se puede observar la banda correspondiente al gen de la GFP (355 pb).



**Figura 11. Tipificación de ratones Oct-GFP por PCR.** 1) Marcador de peso molecular; 2) Control de H<sub>2</sub>O ; 3) Control negativo para GFP ; 4) Control positivo para GFP .

#### 4.3.2- Parámetros evaluados durante la gestación

Durante el transcurso de la preñez se monitorearon los pesos de las hembras. La figura 12 muestra los cambios en el peso durante los 2 ensayos. Por otro lado la tabla 2 muestra la duración de la preñez y la media de este parámetro para cada tratamiento. En ambos ensayos se observó que el peso y el tiempo de gestación de los grupos EE2, BPA, ETOH y ACEITE estuvo dentro de los parámetros normales para la cepa en estudio (19,5-20,5 días de gestación) mientras que para el tratamiento con 4-MBC si bien la evolución del peso fue similar al resto de los tratamientos, se produjo un retraso en la fecha de parto, aumentando el período de gestación (21,5 y 22,5 días), comparado con su respectivo control. Además con este tratamiento no se pudo realizar el análisis de crías a 7 días por citometría de flujo ya que las mismas sufrieron canibalismo.



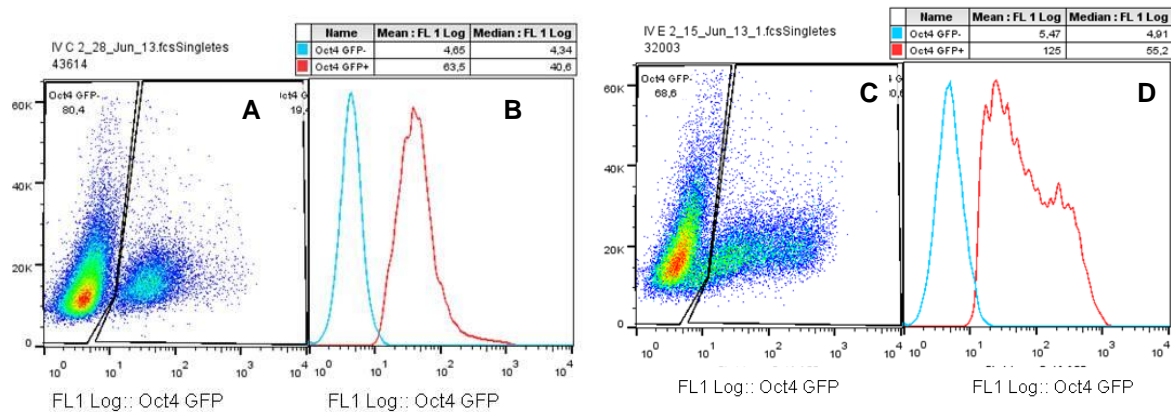
**Figura 12. Peso de las hembras durante el período de gestación.** Hembras Oct4-GFP preñadas y tratadas con los estímulos indicados en el gráfico fueron pesadas a distintos tiempos, a fin de evaluar la evolución de su peso durante la gestación. Se grafican las medias de los pesos obtenidos para cada tratamiento.

**Tabla 2. Tiempo de gestación para los diferentes tratamientos. Los valores de la tabla hacen referencia a número de días de gestación por cada animal utilizado en los ensayos.**

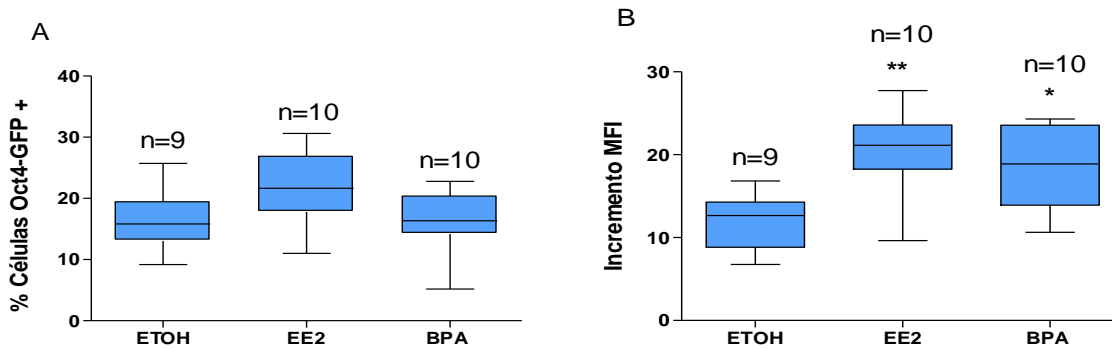
	Control ETOH	EE2	BPA	Control Aceite	4-MBC
	20,5	19,5	20,5	20,5	22,5
	19,5	19,5	20,5	19,5	21,5
	20,5	19,5	19,5		
		19,5	19,5		
<b>Media</b>	<b>20,2</b>	<b>19,5</b>	<b>20,0</b>	<b>20,0</b>	<b>22,0</b>
<b>SD</b>	<b>0,7</b>	<b>0</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>

#### 4.3.3- Análisis por citometría de flujo de células testiculares de crías DPN 7

Con el objeto de evaluar un posible efecto de los compuestos estudiados sobre el desarrollo de las células germinales masculinas, se analizaron por citometría de flujo las células obtenidas de las gónadas de las crías DPN7. Para ello se calculó la diferencia de la media de la intensidad de fluorescencia (Incremento de MFI, ver Materiales y métodos) y el porcentaje de células GFP positivas (%GFP) para cada tratamiento. La figura 13 muestra perfiles citométricos representativos para una muestra de animales control (ETOH) (Figura 13 A) y tratados con EE2 (figura 13 C) así como sus respectivos histogramas de intensidad de fluorescencia (Figura 13 B y D, respectivamente). Como se puede ver en la figura 14, el tratamiento con EE2 y BPA produjo un aumento significativo en el Incremento de la MFI en comparación con el control.



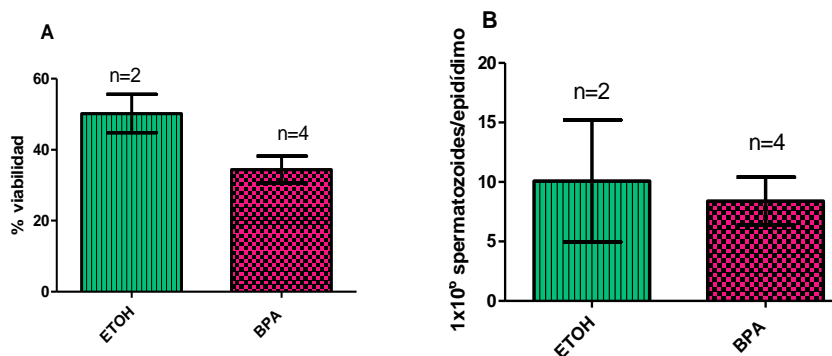
**Figura 13. Análisis citométrico de las suspensiones celulares testiculares de crías DPN 7 tratadas perinatalmente con putativos PE. A,C) Diagrama de puntos (SSC vs Oct-4/GFP) representativos del grupo ETOH y EE2, respectivamente. B, D) Histogramas correspondientes a la intensidad media fluorescente del grupo ETOH y EE2, respectivamente. En rojo se observan las poblaciones GFP positivas y en celeste, las GFP negativas. Cada muestra contiene material proveniente de un solo espécimen y fue analizada individualmente mediante citometría de flujo**



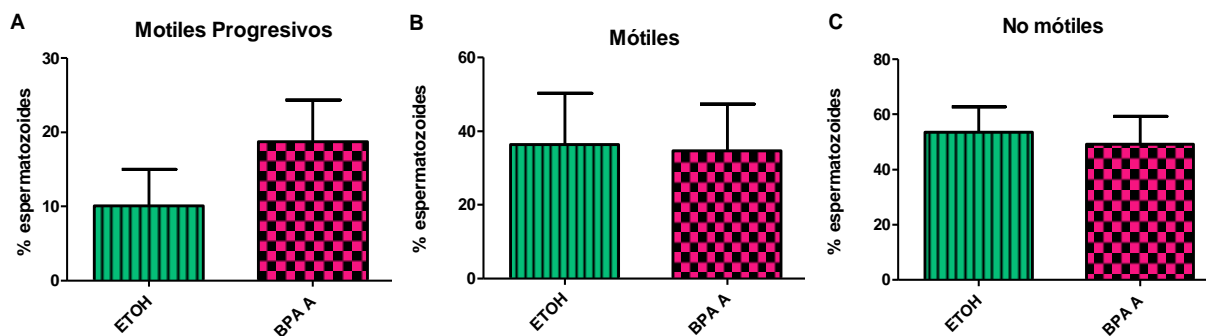
**Figura 14. Evaluación del tratamiento perinatal con PE sobre el desarrollo de células germinales masculinas de crías DPN 7.** Los resultados fueron representados en gráficos de caja *whiskers*.) Porcentaje de células GFP positivas para los distintos tratamientos. B) Incremento de la MFI para los distintos tratamientos. En la parte superior de cada caja se indica el número de animales pertenecientes a cada grupo (n=). \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ , respecto del grupo control (ETOH).

#### 4.3.4- Evaluación de la capacidad reproductiva en adultos tratados perinatalmente con PE

Para evaluar los efectos de los PE en la adultez se realizaron estudios de viabilidad, recuento y motilidad espermática en machos adultos tratados perinatalmente con PE. Sólo se pudieron analizar los grupos ETOH y BPA, ya que no se contó con crías suficientes en el resto de los tratamientos. El análisis de viabilidad y de recuento espermático se llevó a cabo por citometría de flujo, de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos. Para el análisis de motilidad se consideraron espermatozoides mótiles progresivos y mótiles. No se observaron diferencias significativas con respecto a los valores del grupo control (ETOH) en ninguno de los parámetros analizados (Figuras 15 y 16).



**Figura 15. Evaluación de la capacidad reproductiva de adultos tratados perinatalmente con PE.** A) Viabilidad espermática. B) Recuento espermático. El número sobre cada barra indica el número de animales evaluados por grupo.



**Figura 16. Evaluación de motilidad de adultos tratados perinatalmente con PE.** A) Espermatozoides mótiles progresivos. B) Espermatozoides mótiles. C) Espermatozoides no mótiles.

## 5- Discusión

Los PE son sustancias químicas que interfieren con la homeostasis del sistema endócrino afectando tanto a humanos como a la vida salvaje. Una gran cantidad de sustancias ya sea naturales como fabricadas por el hombre son capaces de actuar como PE. Estos se pueden encontrar en pesticidas, metales, aditivos, comida y productos de cuidado personal, por lo que la exposición a los mismos ocurre mediante la ingestión de agua o comida, inhalación de gases, a través de la piel o a través de una madre a sus hijos por medio de la placenta o la leche materna. Entre sus efectos se encuentran la alteración de las funciones reproductivas en hombres y mujeres, aumentos en la incidencia de cáncer de mama y problemas metabólicos y neurológicos (55).

Existen evidencias de que cientos de compuestos químicos son capaces de interferir con los receptores de hormonas, con la síntesis hormonal o la conversión de las mismas. Sin embargo, solamente una pequeña fracción de estos compuestos han sido evaluados en ensayos capaces de identificar ampliamente sus efectos como PE en diferentes organismos (55).

Desde el año 2009 la EPA (*Environment Protection Agency*) de los Estados Unidos comenzó un programa de cribado de 2 etapas para identificar compuestos con posibles efectos sobre el sistema endócrino. En la primera etapa se pretende evaluar si los compuestos presentan o no actividad como PE mediante una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo*, mientras que en la segunda fase se pretende identificar mediante ensayos *in vivo* el modo de acción de los PE identificados en la primera etapa (47).

En este trabajo se propuso estudiar la capacidad de actuar como PE de algunos compuestos de 2 formas diferentes, un ensayo *in vitro* que permite un rápido chequeo con posibilidad de escalarlo a un alto número de compuestos y un método *in vivo* que permite analizar el efecto de los compuestos seleccionados a nivel del organismo entero.

### 5.1- Evaluación de PE mediante ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* proporcionan una manera de realizar un primer cribado de forma rápida (43) y económica sin la necesidad de utilizar un gran número de animales. Idealmente podrían cumplir una función preventiva ya que se pueden emplear para testear compuestos químicos que van a ser utilizados en la industria alimentaria, o aquellos que van a ser ampliamente distribuidos en el ambiente como por ejemplo, los pesticidas. La evaluación de estas sustancias por su calidad de PE durante la etapa de diseño y desarrollo, permitiría reducir la producción o utilización de los mismos en caso de presentar actividad como PE (45).

El ensayo al cual se refiere este trabajo, proporciona una alternativa para determinar si un compuesto presenta o no actividad estrogénica. En este caso el modelo *in vitro* consiste en una línea celular reportera de cáncer de mama (T47D-KBluc), que permite detectar agonistas y antagonistas estrogénicos de una manera precisa, sensible y con poca variabilidad entre ensayos. Además permite obtener un resultado confiable en un periodo de 24 h de forma muy económica.

Considerando que este ensayo nunca había sido llevado a cabo en nuestro laboratorio, fue necesario evaluar ciertos parámetros con el fin de optimizar el ensayo antes de comenzar a testear los compuestos. En primer lugar fue necesario establecer la densidad celular necesaria para obtener una respuesta óptima ya que con el número de células indicado en la bibliografía (51),  $1 \times 10^4$  células/pocillo, prácticamente no se observaba respuesta. Se encontró que la densidad celular inicial óptima para el ensayo fue  $3 \times 10^4$  células/pocillo. Con un menor número de células la respuesta obtenida fue menor mientras que con un número mayor de células la intensidad de la respuesta no varió.

Otro parámetro optimizado fue el protocolo de lectura de la luminiscencia. Se realizó una prueba para evaluar la estabilidad de luz producida por la enzima en el tiempo. Debido a que la lectura permaneció estable en los primeros 10 min de medición y luego comenzó a variar, se concluyó que la lectura de la luz debía ser realizada dentro de los primeros 10 min de agregado el sustrato de la luciferasa.

En lo que se refiere a los tiempos de adquisición de la señal lumínica, se obtuvo la misma sensibilidad con 1 s y con 10 s, siempre que la ganancia fuera la máxima, por esta razón se optó por utilizar el protocolo de 1 s debido a que es más rápido y permite medir una mayor cantidad de pocillos por unidad de tiempo.

Por último, se optimizó el tiempo de estimulación para así evaluar el tiempo óptimo para la duración del ensayo y el efecto del tiempo en la respuesta obtenida. En base a los resultados se estableció un período de estimulación de 24 h como suficiente para generar la máxima cantidad de luciferasa sin comprometer su estabilidad.

Una vez establecidos los parámetros antes mencionados se llevaron a cabo los ensayos de transactivación para evaluar la capacidad de PE de 4 compuestos: E2, EE2, BPA y 4-MBC. Se obtuvo una curva dosis dependiente para tres de los cuatro compuestos evaluados. Con E2, un estrógeno puro, se obtuvo la misma respuesta que para el EE2, siendo sus EC50 muy similares, lo que coincide con los datos de afinidad por el ER reportados en bibliografía para ambos compuestos(56-57). Los resultados para BPA demostraron que este compuesto tiene un poder estrogénico mucho menor que los anteriores, ya que fue necesario emplear concentraciones mucho mayores para poder generar una respuesta. Esto se refleja claramente en los valores de EC50 obtenidos, ya que el valor para el BPA (0,47 $\mu$ M) fue mucho mayor que el correspondiente al E2 y al EE2 (0,01nM). Por otro lado, el 4-MBC no generó respuesta en ninguno de los ensayos de transactivación realizados, ya que la máxima concentración no tóxica empleada no logró superar 3 x el valor basal. Esto puede deberse a que el compuesto no presenta riesgo de PE, aunque no podemos descartar la posibilidad de que el modelo empleado no haya sido adecuado para evidenciar dicho efecto. El 4-MBC es un compuesto que se une preferencialmente a los ER $\beta$  (29) (58) y no a los ER $\alpha$  (59), a diferencia del resto de los compuestos evaluados y según un estudio llevado a cabo por Kulakosky y col, los ER $\beta$  se unen con mucha menor afinidad que los ER $\alpha$  a la mayoría de los elementos de respuesta a estrógenos, siendo menos activos transcripcionalmente y, por lo tanto, induciendo una menor respuesta en los ensayos de transactivación (60). Esto explicaría por qué no se pudo obtener una respuesta dosis dependiente para el 4-MBC a las concentraciones utilizadas.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo demostraron que el modelo planteado presenta una limitación, ya que sólo permitiría detectar aquellos compuestos que ejercen su acción estrogénica mediante la interacción preferencial con el ER $\alpha$  al mismo tiempo que ponen en evidencia la necesidad de evaluar la capacidad de PE con más de un ensayo, a fin de contemplar al menos una parte de la gran variedad de formas de ejercer la acción estrogénica. El uso de más de un ensayo *in vitro*, como por ejemplo el ensayo de proliferación celular o los ensayos de unión a receptor, hubiesen sido útiles para definir la cualidad PE del 4-MBC. De hecho este punto es fuertemente considerado por la EPA, quien propone realizar más de un ensayo en diferentes etapas para poder definir a un compuesto como PE.(47)

Como ya se mencionó, los ensayos *in vitro* presentan algunas desventajas. Su principal limitación es que la información que proporcionan no siempre es extrapolable a la realidad de individuos más complejos. Un sistema *in vitro* no presenta las mismas capacidades metabólicas que un animal (44), por ejemplo, no puede detectar pro-estrógenos, es decir compuestos que son metabolizados *in vivo* a estrógenos y que *in vitro* no presentarían actividad (45). Tampoco permiten estudiar la farmacodinamia y farmacocinética del metabolismo endócrino, y en estos casos, es necesario emplear un modelo *in vivo* que permita tener una aproximación más global de los posibles efectos de los PE, por lo que son los más aceptados por las agencias gubernamentales de protección ambiental como la EPA (42). Sin embargo, los ensayos *in vitro* utilizados en forma combinada son una herramienta útil para una primera aproximación al estudio de PE, ya que son rápidos, económicos y pueden reducir el uso de animales de experimentación en una segunda etapa evaluadora.

## 5.2- Evaluación de PE mediante ensayos *in vivo*

En este trabajo se planteó un modelo *in vivo* como una herramienta novedosa para evaluar el efecto de los PE sobre las células germinales masculinas empleando la citometría de flujo como método de análisis.

Hembras preñadas OCT4-GFP fueron administradas con los compuestos a evaluar por vía intragástrica desde el DPC 5 hasta el DPN 7, para luego evaluar por citometría de flujo los parámetros de Incremento MFI y % GFP. A partir de estos resultados, se pudo observar que los tratamientos con EE2 y BPA generaron un aumento significativo en el incremento MFI, que podría estar relacionado con el nivel de expresión del gen Oct4 y, por ende, con el grado de madurez de las células. En lo que respecta al otro parámetro evaluado, la cantidad de células Oct4-GFP positivas (%GFP), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, por lo que el EE2 y el BPA no afectarían la cantidad de células germinales, sino su estadio de diferenciación (61). No se pudo evaluar por citometría de flujo ninguna muestra proveniente de ratones tratados con 4-MBC debido a que en ambos ensayos hubo canibalismo y las crías no sobrevivieron hasta los 7 días. Con este compuesto en particular se observó un aumento en la duración de la preñez lo que pudo haber generado un estrés adicional que aumentó la incidencia de canibalismo. Para futuros experimentos se propone reducir la dosis de 4-MBC para poder identificar si estas anomalías en la preñez se deben a la alta concentración de compuesto utilizada y poder llegar a analizar las muestras obtenidas de las crías por CF.

Con respecto a la evaluación de la capacidad reproductiva de machos adultos tratados perinatalmente con PE, no se observaron diferencias significativas en cuanto a viabilidad, recuento y motilidad espermática, por lo que estos resultados sugerirían la existencia de un efecto compensador durante el desarrollo por el cual el efecto detectado sobre las células germinales a los 7 días no tuvo consecuencias al menos en los parámetros evaluados. De todas maneras no podemos descartar la posibilidad de que el tratamiento perinatal haya afectado la capacidad de los espermatozoides de fecundar al oocito. Se ha reportado que el BPA es capaz de producir alteraciones epigenéticas en los espermatozoides, las cuales sólo pueden ser detectadas con técnicas específicas (por ejemplo, bisulfitación del ADN) o mediante la evaluación de la capacidad de fecundar (62). En la actualidad se están desarrollando en el laboratorio ensayos de reproducción forzada que permitirán definir si el tratamiento perinatal con PE afectó la capacidad reproductiva de los machos tratados.

El modelo propuesto demostró ser útil para evaluar los efectos de la exposición perinatal a estrógenos sobre las células germinales masculinas. En la actualidad no existe otro modelo que permita evaluar por citometría de flujo estos efectos. Además la mayoría de los modelos existentes para el estudio de los PE evalúan parámetros en las hembras, mientras que los ensayos en machos son escasos y complejos ya que requieren de castración previa al ensayo (ensayo *Hershberger*), mediciones de niveles hormonales en sangre y extracción y peso de órganos del sistema endócrino (ensayo de la pubertad masculina en rata), por lo que el modelo propuesto presenta una alternativa más sencilla y con la ventaja de que se pueden obtener datos cuantitativos en un período de tiempo relativamente corto gracias al empleo de la citometría de flujo como herramienta de análisis (43).

## 6- Análisis económico

En este trabajo se optimizaron 2 modelos de estudio: un método *in vitro* para evaluar la capacidad de activar al receptor de estrógenos empleando la línea celular T47D-KBLuc y un modelo *in vivo* que permitió evaluar los efectos endócrinos de PE sobre el desarrollo germinal y la capacidad reproductiva masculina de mamíferos.

A fin de realizar una comparación económica entre ambas metodologías se calcularon los costos asociados al estudio de un único compuesto. De acuerdo a lo detallado en la tabla 3, el costo del método *in vivo* resultó ser aproximadamente 5 veces mayor que el *in vitro*, y demandó 17 veces más tiempo. Además el ensayo *in vivo* demandó una mayor cantidad de horas de recursos humanos, al menos dos operarios calificados para la manipulación de animales y la aprobación del protocolo por parte del Comité de Ética de la Institución.

Los datos expuestos permiten concluir que el modelo *in vitro* sería una herramienta apropiada para el cribado primario de putativos PE, donde los compuestos a evaluar son numerosos, y, por lo tanto, un bajo costo y una duración reducida serían cualidades valiosas de la metodología. Además cuenta con la ventaja de ser altamente reproducible, en comparación con la metodología *in vivo* en la cual se debe considerar la variación intrínseca de cada animal y las condiciones a la que los mismos están expuestos. Sin embargo este tipo de ensayo no permite obtener datos respecto al efecto endócrino que el perturbador podría tener en un organismo vivo, lo cual constituye una limitación al momento de definir dosis seguras del compuesto.

**Tabla 3. Comparación de los costos de ensayos *in vitro* e *in vivo* para el análisis de 1 compuesto con su control correspondiente.**

<b>IN VITRO (1 compuesto)</b>		<b>IN VIVO (1 compuesto)</b>	
<b>Medios de cultivo</b>	1,7 U\$S	<b>Animales</b>	33,6U\$S
<b>Sustrato Luc.</b>	1,3 U\$S	<b>Mantenimiento cajas</b>	24 U\$S
<b>Material plástico</b>	8 U\$S		
<b>Duración del ensayo</b>	48 h	<b>Duración del ensayo</b>	34 días
<b>Tiempo RRHH</b>	3 h (15 U\$S)	<b>Tiempo RRHH</b>	17 h (85 U\$S)
<b>Total</b>	<b>26,0 U\$S</b>	<b>Total</b>	<b>142.6 U\$S</b>

## 7- Conclusión

En este trabajo se presentaron dos metodologías para el monitoreo de PE. Se optimizó exitosamente el ensayo *in vitro* con la línea celular T47D-KBLuc y se utilizó este modelo para evaluar la capacidad estrogénica del E2, EE2, BPA y 4-MBC. Además mediante la utilización de un modelo animal, el ratón transgénico OCT4-GFP, se estudió el efecto de la exposición perinatal a estrógenos en crías de 7 días de edad y en adultos.

Ambos modelos presentaron ventajas y limitaciones propias, las cuales fueron discutidas en detalle en las secciones anteriores y los resultados obtenidos permitieron plantear una nueva alternativa para la evaluación de los efectos de PE: el empleo combinado de ambas metodologías.

La implementación combinada de estos modelos *in vitro* e *in vivo* permitiría reducir el uso de animales de laboratorio, tiempos y costos del proceso de evaluación a través de un cribado preliminar (*in vitro*) de compuestos, a partir del cual se seleccionaría sólo una fracción de los mismos para su posterior estudio fisiológico, empleando el modelo *in vivo* aquí propuesto.

De esta manera, ambos modelos podrían ser utilizados en forma conjunta por organismos públicos y privados como herramientas para el monitoreo de sustancias ya presentes en el ambiente y/o para evaluar el potencial riesgo endócrino de nuevos productos previo a su introducción en el mercado, impactando positivamente en la salud humana y animal.

## Referencias Bibliográficas

1. Reece J, Urry L, Cain M, Wasserman S, Minorsky P, Jackson R. Hormones and the endocrine system. En Pearson. Campbell Biology. 10ma Ed. EEUU:Pearson;2013.p974-995.
2. Guillette LJ, Jr., Gunderson MP. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction*. 2001;122(6):857-64.
3. Woodruff T. Bridging epidemiology and model organisms to increase understanding of endocrine disrupting chemicals and human health effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2011(127):108–117.
4. Boivin J, Bunting L, Collins J, Nygren K. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*. 2007(22):1506–1512.
5. Woodruff T, Carlson A, Schwartz J, Giudice L. Proceedings of the summit on environmental challenges to reproductive health and fertility: executive summary. *Fertility and Sterility*. 2008(89):281–300.
6. Letcher RJ, Bustnes JO, Dietz R, Jenssen BM, Jorgensen EH, Sonne C, Verreault J, Vijayan MM, Gabrielsen GW. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. *Science of the Total Environment*. 2010;408(15):2995-3043.
7. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*. 2009;30(4):293-342.
8. Marques-Pinto A, Carvalho D. Human infertility: are endocrine disruptors to blame? *Endocrine Connections*. 2013;2(3):R15-29.
9. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;127(3-5):204-15.
10. Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Phillips TM, Jefferson WN. Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Reproductive Toxicology*. 2007;23(3):290-6.
11. Hanson MA, Gluckman PD. Developmental origins of health and disease: new insights. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2008;102(2):90-3.
12. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*. 2007;8(4):253-62.
13. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS One*. 2013;8(1):e55387.
14. Walker DM, Gore AC. Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. *Nature Reviews Endocrinology*. 2011;7(4):197-207.
15. Susiarjo M, Sasson I, Mesaros C, Bartolomei MS. Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *PLoS Genetics*. 2013;9(4):e1003401.
16. Delbes G, Levacher C, Habert R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction*. 2006;132(4):527-38.
17. Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology*. 2000;30(1):71-133.

18. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 1992;305(6854):609-13.
19. El Kholy M, Hamza RT, Saleh M, Elsedfy H. Penile length and genital anomalies in Egyptian male newborns: epidemiology and influence of endocrine disruptors. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2013;26(5-6):509-13.
20. Grun F, Blumberg B. Endocrine disruptors as obesogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009;304(1-2):19-29.
21. Karoutsou E, Polymeris A. Environmental endocrine disruptors and obesity. *Endocrine Regulations*. 2012;46(1):37-46.
22. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, Quesada I, Nadal A. Bisphenol-A: a new diabetogenic factor? *Hormones (Athens)*. 2010;9(2):118-26.
23. Pflieger-Bruss S, Schuppe HC, Schill WB. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. *Andrologia*. 2004;36(6):337-45.
24. Vermeulen A, Kaufman JM, Goemaere S, van Pottelberg I. Estradiol in elderly men. *Aging Male*. 2002;5(2):98-102.
25. Prossnitz ER, Barton M. Estrogen Biology: New Insights into GPER Function and Clinical Opportunities. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014. En prensa.
26. Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environmental Health Perspectives*. 2001;109(3):239-44.
27. Balmer ME, Buser HR, Muller MD, Poiger T. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. *Environmental Science and Technology*. 2005;39(4):953-62.
28. Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New England Journal of Medicine*. 1971;284(15):878-81.
29. Schlumpf M, Jarry H, Wuttke W, Ma R, Lichtensteiger W. Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology*. 2004;199(2-3):109-20.
30. Durrer S, Ehnes C, Fuetsch M, Maerkel K, Schlumpf M, Lichtensteiger W. Estrogen sensitivity of target genes and expression of nuclear receptor co-regulators in rat prostate after pre- and postnatal exposure to the ultraviolet filter 4-methylbenzylidene camphor. *Environmental Health Perspectives*. 2007;115 Suppl 1:42-50.
31. Schlumpf M, Durrer S, Faass O, Ehnes C, Fuetsch M, Gaille C, Henseler M, Hofkamp L, Maerkel K, Reolon S et al. Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: a review. *International Journal of Andrology*. 2008;31(2):144-51.
32. Nash JP, Kime DE, Van der Ven LT, Wester PW, Brion F, Maack G, Stahlschmidt-Allner P, Tyler CR. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives*. 2004;112(17):1725-33.
33. Linden KG, Rosenfeldt EJ, Kullman SW. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation of endocrine-disrupting chemicals in water evaluated via toxicity assays. *Water Science and Technology*. 2007;55(12):313-9.
34. Desbrow C, Routledge E, Brighty G, Sumpter J, Waldock M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science and Technology*. 1998(32):1559-1565.

35. Fusani L, Della Seta D, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F. Altered reproductive success in rat pairs after environmental-like exposure to xenoestrogen. *Proceeding of the Royal Society: Biological Sciences*. 2007;274(1618):1631-6.
36. Aherne G, Briggs R. The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1989(41):735-736.
37. Ryan BC, Vandenberg JG. Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Hormones and Behaviour* 2006;50(1):85-93.
38. Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*. 2007;128(4):747-62.
39. Western PS, van den Bergen JA, Miles DC, Sinclair AH. Male fetal germ cell differentiation involves complex repression of the regulatory network controlling pluripotency. *FASEB J* .2010;24(8):3026-35.
40. Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(3):210-22.
41. Bouskine A, Nebout M, Brucker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environmental Health Perspectives*. 2009;117(7):1053-8.
42. Borgert CJ, Mihaich EM, Quill TF, Marty MS, Levine SL, Becker RA. Evaluation of EPA's Tier 1 Endocrine Screening Battery and recommendations for improving the interpretation of screening results. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2011;59(3):397-411.
43. Clode SA. Assessment of in vivo assays for endocrine disruption. *Best Practice and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006;20(1):35-43.
44. Zacharewski T. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in vivo and in vitro assays. *Environmental Health Perspectives*. 1998;106(2):577-82.
45. Soto AM, Maffini MV, Schaeberle CM, Sonnenschein C. Strengths and weaknesses of in vitro assays for estrogenic and androgenic activity. *Best Practice and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006;20(1):15-33.
46. Svobodova K, Cajthaml T. New in vitro reporter gene bioassays for screening of hormonal active compounds in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;88(4):839-47.
47. EPA, Endocrine disruptor screening program [Internet]. EEUU; Febrero 2014 [citado 2014 Marzo 10] Disponible desde: <http://www.epa.gov/endo/>.
48. Goldman LR. Linking research and policy to ensure children's environmental health. *Environmental Health Perspectives*, 1998;106(3):857-62.
49. Matthiessen P, Johnson I. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environmental Pollution*. 2007;146(1):9-18.
50. Informe de la Cuarta Reunión Regional de América Latina y el Caribe sobre el Enfoque Estratégico para la Gestión Internacional de Productos Químicos. Informe presentado en: Cuarto Encuentro Latinoamericano y Regional del Caribe sobre el Enfoque Estratégico para la Gestión de Productos Químicos. 2013.
51. Wilson VS, Bobseine K, Gray LE, Jr. Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists. *Toxicological Sciences*. 2004;81(1):69-77.

52. Berthois Y, Katzenellenbogen J, Katzenellenbogen B. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83(8):2283-2287.
53. Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, Yeom YI, Ohbo K, Masuko K, Obinata M, Abe K, Scholer HR, Matsui Y. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Development, Growth and Differentiation*. 1999;41(6):675-84.
54. Stutler S, Johnson E, Still K, Schaeffer DJ, Hess RA, Arfsten D. Effect of method of euthanasia on sperm motility of mature Sprague-Dawley rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2007;46(2):13-20.
55. WHO/UNEP. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012. EEUU: Bergman A, Heindel J, Jobling S, Kidd KA y Zoeller T;2013 [citado 2014 Marzo 10] .Disponible desde: <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/>
56. Rider CV, Hartig PC, Cardon MC, Wilson VS. Development of a competitive binding assay system with recombinant estrogen receptors from multiple species. *Toxicology Letters*. 2009;184(2):85-9.
57. Blair RM, Fang H, Branham WS, Hass BS, Dial SL, Moland CL, Tong W, Shi L, Perkins R, Sheehan DM. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences*. 2000;54(1):138-53.
58. Mueller SO, Kling M, Arifin Firzani P, Mecky A, Duranti E, Shields-Botella J, Delansorne R, Broschard T, Kramer PJ. Activation of estrogen receptor alpha and ERbeta by 4-methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: comparison with phyto- and xenoestrogens. *Toxicology Letters*. 2003;142(1-2):89-101.
59. Morohoshi K, Yamamoto H, Kamata R, Shiraishi F, Koda T, Morita M. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicology In Vitro*. 2005;19(4):457-69.
60. Kulakosky PC, McCarty MA, Jernigan SC, Risinger KE, Klinge CM. Response element sequence modulates estrogen receptor alpha and beta affinity and activity. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2002;29(1):137-52.
61. Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walsler-Kuntz DR, vom Saal FS. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology*. 2007;24(2):199-224.
62. Guerrero-Bosagna CM, Skinner MK. Epigenetic transgenerational effects of endocrine disruptors on male reproduction. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2009;27(5):403-8.