

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

DISRUPCIÓN ENDÓCRINA EN EL EJE HIPOTÁLAMO- ADENOHIPOFISARIO: EFECTOS DEL BISFENOL A Y LAS BENZOFENONAS.

Arocena, Paula Andrea – LU: 1058664

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Fernández, Marina Olga

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET

Co-Tutor:

Girotti, María Romina

UADE

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET

Diciembre 15, 2017



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerle a Marina, por enseñarme con tanta dedicación y paciencia, por confiar en mí, aconsejarme, permitirme conocer el ambiente de la investigación y ayudarme a sentirme todos los días un poquito más segura en él. Al laboratorio del Dr. Libertun y la Dra. Lux, por haberme aceptado con tanta buena predisposición, y a mis compañeras de laboratorio por la buena onda de todos los días y por ayudarme cada vez que lo necesité. A la Dra. Romina Girotti, por estar siempre dispuesta a ayudarme y aconsejarme.

También quiero agradecer a mis papás, por acompañarme incondicionalmente, y al mismo tiempo, darme tanta libertad. A Kev, por siempre estar, por escucharme, darme palabras de aliento y sacarme una sonrisa.

Agradezco en especial a las fuentes de financiamiento que permitieron el desarrollo de este trabajo: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad de Buenos Aires (UBA), Asociación ORT Argentina, Fundación Rene Barón y Fundación Williams.

Resumen

Un adecuado desarrollo del sistema neuroendócrino es fundamental para el individuo y la especie. La integración hipotálamo-adenohipofisaria puede modificarse por influencias externas, fisiológicas como la luz, o patológicas, como la acción de ciertos contaminantes ambientales. Entre los contaminantes ambientales a los que los seres vivos pueden estar expuestos se encuentran el Bisfenol A (BPA), monómero de los plásticos de policarbonatos y componentes de resinas epoxi, y las benzofenonas (BPs), ampliamente utilizadas como protectores ultravioleta (UV). En particular, los fetos y neonatos pueden estar expuestos a estos compuestos a través de mamaderas, contenedores de alimentos, latas de comida, protectores solares y cosméticos. Las exposiciones en períodos sensibles del desarrollo tienen efectos duraderos, y se consideran efectos organizacionales. Es por esto que interesa particularmente evaluar el efecto de la exposición a estos compuestos durante la vida intrauterina y la infancia temprana.

Este trabajo se centró en evaluar los efectos de la exposición a BPA y a dos BPs ampliamente usadas en industria, BP2 y BP3. Se estudiaron los efectos de la exposición a dosis relevantes de estos compuestos en la proliferación celular, la expresión y liberación de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), tanto basal como inducida por Kisspeptina (Kiss), y la expresión de los receptores de estrógenos (ER) α en neuronas GnRH inmaduras, células GN11. Todos los compuestos en las dosis estudiadas aumentaron la proliferación celular, y el antagonista de receptores nucleares de estrógenos ICI 182780 bloqueó solamente el efecto de BPA 1×10^{-9} M. Por otro lado, Kiss aumentó la proliferación y este efecto no fue modificado por el co-tratamiento con ninguno de los disruptores. Un pretratamiento de 24 horas con BPA y BP2 disminuyó la expresión de GnRH inducida por Kiss mientras que BP3 no tuvo ningún efecto. En cuanto a la liberación de GnRH, el pretratamiento con BP3 en su menor concentración aumentó la secreción basal de GnRH y Kiss no aumento significativamente la liberación de Kiss en este grupo, mientras que BP2 en su menor concentración inhibió significativamente la liberación de GnRH inducida por Kiss. Por otro lado, ninguno de los contaminantes modificó significativamente la expresión de los ER α .

En conclusión, en este trabajo se demuestra por primera vez un efecto de BPA, BP2 y BP3 sobre la proliferación celular y expresión y liberación de GnRH en una línea celular

de neuronas GnRH inmaduras. El efecto sobre la proliferación celular parecería ser parcialmente dependiente de los ER nucleares solamente en el caso de BPA. Hasta donde sabemos, este es también el primer reporte de que Kiss aumenta la proliferación celular en neuronas GnRH. Se necesitan más experimentos para evaluar los mecanismos de acción por los cuales actúan los contaminantes. Los resultados obtenidos en este trabajo aportan datos novedosos acerca de la acción de disruptores endócrinos producto de la actividad humana como el Bisfenol A y las Benzofenonas.

Abstract

An adequate development of the neuroendocrine system is fundamental for the species. The hypothalamic-pituitary unit can be modified by external stimuli, physiological as light, or pathological like some environmental contaminants. Human and animals can be exposed to a variety of these environmental pollutants, like Bisphenol A (BPA), a monomer of polycarbonate plastics and a component of epoxy resins, and benzophenones, (BPs), used like UV filters. Fetuses and neonates are among the most susceptible groups, as they can be exposed to the contaminants by baby bottles, food containers and cans, sunscreens, lotions and cosmetics. Exposure in sensitive periods of development have long lasting effects, and are considered “organizational effects”. This is why it is particularly interesting to evaluate the effects during the intrauterine period and early infancy.

The effects of exposure to environmentally relevant doses of BPA and two BPs commonly used in industry, BP2 and BP3, were evaluated. Particularly, effects of these compounds on immature GnRH (GN11 cells) cell proliferation, basal and Kisspeptin (Kiss)-induced GnRH expression and release, and estrogen receptor (ER) α expression were studied. All compounds increased cell proliferation and ICI182780, the nuclear ER antagonist, only blocked the effect of BPA 1×10^{-9} M. On the other hand, Kiss increased cell proliferation and this effect was not modified by co-treatment with any of the compounds. Twenty-four-hour pretreatment with BPA and BP2 modified Kiss-induced GnRH expression, whereas BP3 did not have any effect. Pretreatment with the lower dose of BP3 increased basal GnRH release and Kiss did not significantly increase GnRH release in this group, whereas low-dose BP2 significantly inhibited Kiss-induced GnRH secretion. On the other hand, none of the disruptors significantly modify ER α expression.

In conclusion, this work shows for the first time effects of BPA, BP2 and BP3 on cell proliferation, and on GnRH expression and secretion in an immature GnRH neuron cell line. The effect on cell proliferation seems partially dependent on nuclear ERs only in the case of BPA. As far as we know, this is also the first study reporting that Kiss increases cell proliferation in GnRH neurons. Further experiments are needed to evaluate the mechanisms of action of these contaminants. The results obtained in this work provide new interesting data on the action of man-made endocrine disruptors like Bisphenol A and Benzophenones.

Índice

Resumen	2
Abstract	4
1. Introducción	7
2. Antecedentes	9
2.1 El sistema neuroendócrino	9
2.1.1 Sistema GnRH-Gonadotrofinas	9
2.1.1.1 Modelos <i>in vivo</i> para el estudio de neuronas GnRH	11
2.1.2 Kisspeptina	12
2.1.3 Estradiol	13
2.2 Disruptores endócrinos	14
2.2.1 Bisfenol A	14
2.2.2 Benzofenonas	17
3. Hipótesis	20
4. Metodología	21
4.1 Cultivo celular	21
4.2 Proliferación celular	21
4.2.1 Ensayo de MTS	21
4.3 Expresión génica	22
4.3.1 Extracción de ARN	22
4.3.2 RT-PCR	23
4.3.3 PCR en tiempo real	23
4.4 Secreción de GnRH	24
4.4.1 Radioinmunoensayo de GnRH	25

4.5	Análisis estadístico	26
5.	Resultados y Discusión	27
5.1	Efectos de las Benzofenonas 2 y 3, el Bisfenol A y el estradiol sobre la proliferación celular	27
5.2	Efectos de las Benzofenonas 2 y 3, el Bisfenol A y el estradiol sobre la expresión génica de GnRH	32
5.3	Efectos de las Benzofenonas 2 y 3, el Bisfenol A y el estradiol sobre la secreción de GnRH	34
5.4	Efectos de las Benzofenonas 2 y 3, el Bisfenol A y el estradiol sobre la expresión génica de receptores de estrógeno α	36
5.5	Efectos de las Benzofenonas 2 y 3 sobre la expresión génica del receptor de Kisspeptina, GPR54	38
6.	Conclusiones	39
6.1	Los disruptores endócrinos aumentan la proliferación celular	39
6.2	Kisspeptina aumenta la proliferación celular	39
6.3	Los disruptores endócrinos modifican la expresión y la secreción de GnRH inducida por kisspeptina	39
6.4	La línea celular GN11 expresa receptores de estrógeno α	40
7.	Bibliografía	41

1. Introducción

Los disruptores endocrinos son sustancias químicas ajenas al cuerpo, capaces de alterar el equilibrio hormonal en los seres vivos, es decir, de generar la interrupción de algunos procesos fisiológicos controlados por hormonas, o de generar una respuesta de mayor o menor intensidad que lo habitual. Dentro de esta categoría, se destacan dos sustancias comúnmente utilizadas en la sociedad: el Bisfenol A (BPA) y las Benzofenonas (BPs).

El BPA es un compuesto estrogénico pequeño que es polimerizado para la producción de plásticos de policarbonato. También se lo utiliza como aditivo en otros tipos de plástico como el polivinilcloruro (PVC) y el polietilenoftalato (PET), y en la producción de resinas epoxi. Hoy en día se sabe que el BPA se encuentra en la cubierta interna de latas de metal contenedoras de alimento, en juguetes, tuberías de agua, recipientes para microondas y mamaderas, entre muchos otros productos (Vandenberg *et al.*, 2007). Se ha demostrado que el BPA puede desprenderse de ciertos materiales como los contenedores de alimento bajo condiciones normales de uso, y esta liberación se ve incrementada por exposición al calor (Welshons *et al.*, 2006).

Las BPs, por su parte, son compuestos químicos capaces de absorber y disipar la luz ultravioleta (UV). Esta propiedad les permite ser utilizadas como protectores UV tanto en pantallas solares y productos cosméticos, como en plásticos para la envoltura de productos alimenticios (Zhang *et al.*, 2011). Al ser compuestos altamente lipofílicos, se puede esperar la bioacumulación de los mismos en el ambiente.

Estos disruptores endócrinos han sido detectados en el humano en suero, orina, líquido amniótico, entre otros. Uno de los hallazgos que más preocupación en la sociedad ha causado, fue el descubrimiento de la presencia de BPA (Vandenberg *et al.*, 2007) y BPs (Hany y Nagel, 1995) en leche materna y en el tejido placentario, datos que demuestran la exposición de neonatos e infantes a estos contaminantes. La exposición a estas edades en las que el organismo en su totalidad y el sistema nervioso en particular se encuentran en pleno desarrollo, pueden tener consecuencias perjudiciales en los individuos. Esto ha provocado que cada vez más los investigadores focalicen sus estudios en los efectos de estos compuestos durante el desarrollo de los organismos, y que en este trabajo en particular se haya utilizado un modelo

in-vitro compuesto por una línea celular inmadura productora de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), denominada GN11.

El **objetivo general** de este trabajo es evaluar la importancia básica y la eventual implicancia clínica de la contaminación ambiental con disruptores endócrinos, estudiando los efectos del Bisfenol A y las benzofenonas sobre líneas celulares in-vitro. Los **objetivos específicos** se detallan a continuación:

- Analizar los efectos del BPA sobre una línea celular neuronal murina productora de GnRH, la línea GN11, a nivel de síntesis y secreción hormonal, vías de señalización afectadas y proliferación celular.
- Analizar los efectos de las BPs sobre la misma línea celular GN11, a nivel de síntesis y secreción hormonal, vías de señalización afectadas y proliferación celular.
- Analizar posibles mecanismos de acción mediante la evaluación de receptores de estrógeno luego de la estimulación con los disruptores.

A continuación, en este trabajo se describe, en el apartado de antecedentes, los trabajos y desarrollos previos relacionados con el tema aquí estudiado, incluyendo información sobre el funcionamiento y la regulación del el sistema GnRH-gonadotrofinas y sobre los disruptores endócrinos, en particular el BPA y las BPs. Luego, se describe la metodología utilizada para llevar a cabo los experimentos y el análisis estadístico, y por último se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los ensayos realizados y sus respectivas conclusiones.

2. Antecedentes

2.1 El sistema neuroendócrino

La neuroendocrinología estudia los procesos por los cuales el sistema nervioso se relaciona con el sistema endocrino. En particular, se centra en estudiar la regulación de la función hipotalámica por los neurotransmisores, el efecto de la neurosecreción hipotalámica sobre la función de la adenohipófisis, y a su vez la acción de esta sobre sus glándulas blanco.

2.1.1 Sistema GnRH-Gonadotrofinas

La reproducción es esencial para la supervivencia de las especies. Es así como los vertebrados han desarrollado a lo largo de la evolución una compleja red neuronal para mediar los diversos aportes del medio externo e interno que regulan la reproducción. Estos factores afectan en forma directa o indirecta una vía final común: las neuronas que producen la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Ésta estimula la secreción hipofisaria de gonadotrofinas y de esta manera la función gonadal, tanto femenina como masculina (Cheng y Leung, 2005).

GnRH es un decapeptido que se libera a través de neuronas en el hipotálamo de manera pulsátil. El blanco primario de GnRH hipotalámico es el gonadotrofo ubicado en la pituitaria anterior, que responde a la estimulación incrementando la síntesis y secreción de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo-estimulante (FSH), que a su vez regulan la función y el desarrollo gonadal (Figura 1). Las gonadotrofinas son miembros de la familia de hormonas glicoproteicas y estimulan la espermatogénesis, la foliculogénesis y la ovulación. Tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de GnRH son críticos para una liberación de gonadotrofinas normal, viéndose favorecida la liberación de LH por pulsos con frecuencia rápida (más de un pulso por hora) y la liberación de FSH por frecuencias de pulsos lentos (menos de un pulso cada 2 horas). Esta secreción pulsátil de GnRH también evita la regulación negativa del receptor de GnRH en la glándula pituitaria (Tsutsumi y Webster, 2009).

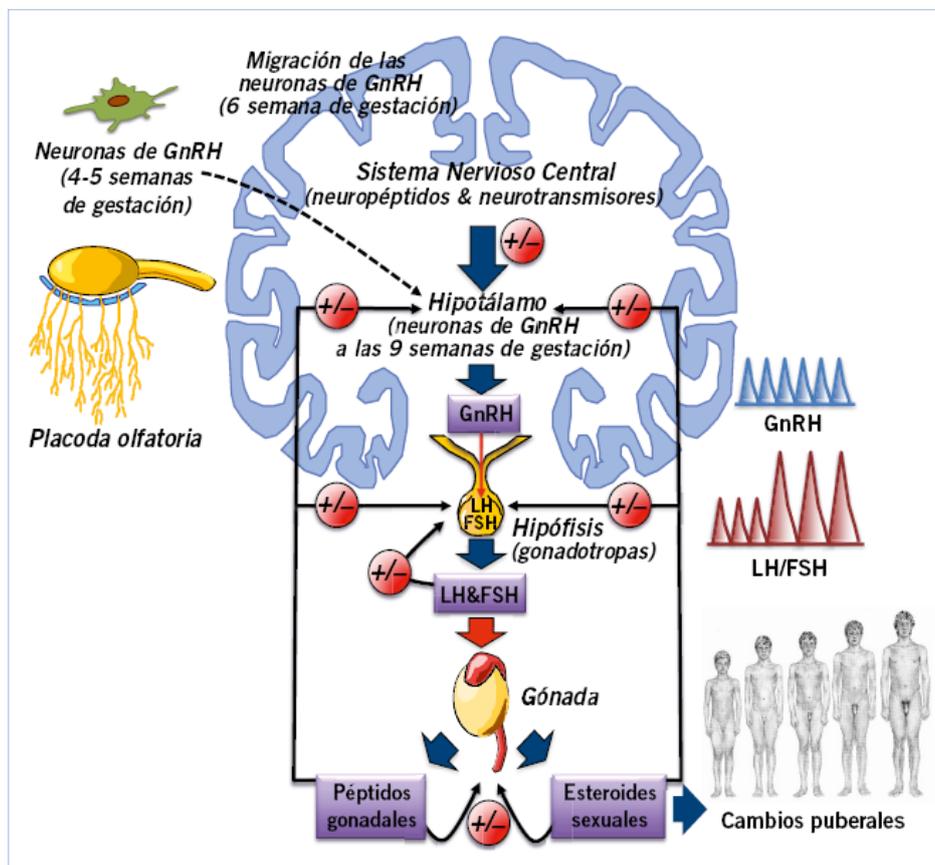


Figura 1: Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG). La hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH) induce, en las células gonadotropas hipofisarias, la síntesis y liberación pulsátil de las gonadotropinas hipofisarias, LH y FSH, que actúan coordinadamente en la gónada para inducir la maduración de las células germinales y la producción de esteroides sexuales (tomado de www.pediatriaintegral.es).

Las neuronas productoras de GnRH se originan por fuera del sistema nervioso central, en la placa olfatoria, y durante su desarrollo migran para alcanzar su destino final en el hipotálamo (Schwanzel y Pfaff, 1989). Este patrón migratorio ha sido observado en el hombre y en otras especies y es fundamental para el desarrollo normal de las funciones reproductivas (Schwanzel y Pfaff, 1990).

El sistema GnRH está caracterizado por una ubicación anatómica peculiar; está compuesto por aproximadamente unos cientos de neuronas distribuidas en grupos que están presentes en muchas áreas extendiéndose desde la preóptica hasta las regiones hipotalámicas anteriores (Merchenthaler *et al.*, 1984). Esta organización dificulta determinar, mediante experimentos in-vivo o ex-vivo, si los diferentes factores influenciando la secreción de GnRH ejercen sus efectos directamente en las neuronas GnRH o si actúan mediante la activación y/o la inhibición de otros sistemas neuronales.

2.1.1.1 Modelos in-vitro para el estudio de las neuronas GnRH

El estudio de la biología molecular del sistema neuronal GnRH se facilitó gracias a la disponibilidad de neuronas secretoras de GnRH inmortalizadas. Dos líneas celulares, GT1-7 y GN11, fueron obtenidas mediante tumorigenesis genéticamente dirigida de neuronas GnRH en ratones. Estudios funcionales y bioquímicos muestran que estas células retienen muchas de las características de las neuronas GnRH hipotalámicas (Wetsel, 1995). Las células GT1-7 derivan de un ratón transgénico que desarrolló un tumor hipotalámico, en otras palabras, derivan de neuronas GnRH que ya migraron hacia su destino final (Mellon *et al.*, 1990); por el contrario, las células GN11 fueron obtenidas de un ratón que poseía un tumor en el bulbo olfatorio, con lo cual se originan a partir de neuronas GnRH bloqueadas en un estadio temprano de su migración (Radovick *et al.*, 1991).

En cuanto a su morfología, las células GT1-7 aparecen como células poligonales similares a las neuronas, crecen principalmente en colonias que establecen conexiones durante el cultivo (Figura 2A). En contraste, las células GN11 no forman *clusters*, pero muestran un crecimiento homogéneo a lo largo de toda la superficie de la placa de cultivo (Figura 2B). Estas últimas parecen ser más grandes que las GT1-7, siendo su tamaño casi el doble, y muestran generalmente una morfología bipolar (Maggi *et al.*, 2000).

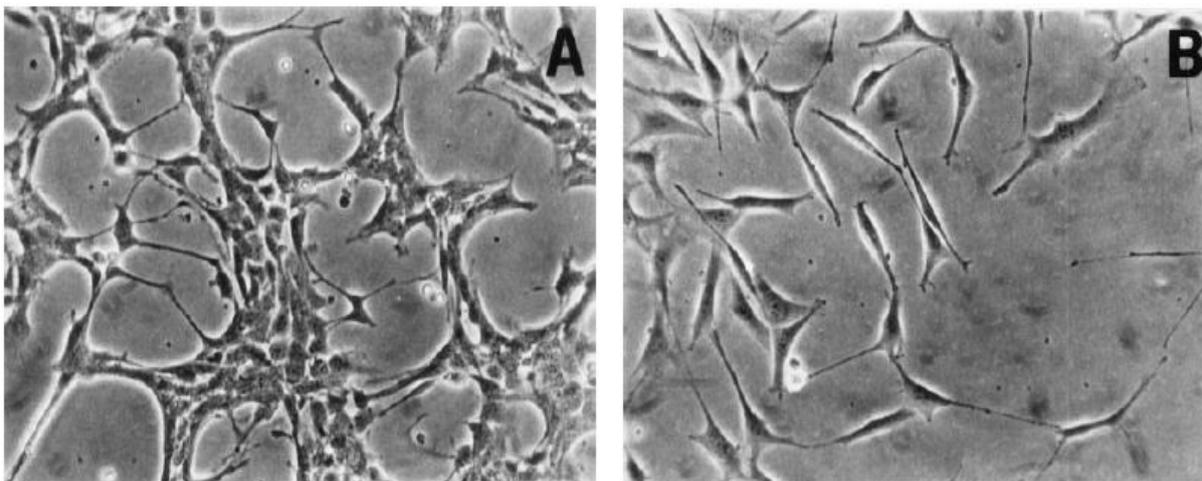


Figura 2: Fotomicrografía en contraste de fase de células GT1-7 (A) y GN11 (B) creciendo en placas plásticas (200X) (tomado de Maggi *et al.*, 2000)

2.1.2 Kisspeptina

El control fisiológico del eje reproductivo tuvo un gran avance al identificarse el rol esencial de kisspeptina (Kiss), el péptido producto del gen *KiSS-1*, y su receptor acoplado a la proteína G 54, GPR54, en la regulación neuroendócrina de la reproducción (Figura 3). Investigaciones de diversos laboratorios llevaron al concepto general de que las neuronas kisspeptinérgicas activan las neuronas GnRH (Caraty *et al*, 2008; Seminara *et al*, 2008).

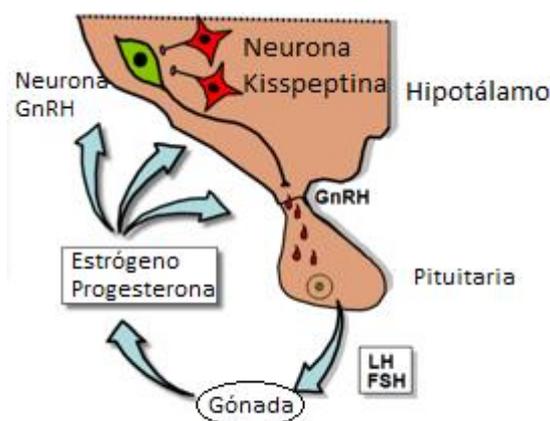


Figura 3: Interacción entre las neuronas GnRH y las neuronas kisspeptinérgicas y su regulación (tomado de www.physoc.org.nz).

Sin embargo, estos estudios se realizaron incubando explantos hipotalámicos completos, impidiendo así distinguir si el efecto de Kiss sobre las neuronas GnRH es directo o está mediado por otros componentes. Los autores Novaira y col. (2009), demostraron en uno de sus estudios la presencia del receptor GPR54 en dos líneas celulares productoras de GnRH, las líneas GT1-7 y Gn11. También observaron que Kiss aumenta la secreción de GnRH y los niveles de su ARNm en estas células de manera dependiente del tiempo y la dosis. Detectaron un efecto máximo de Kiss en la secreción de GnRH al estimular las células por 1 hora con una concentración de 1×10^{-9} M y en la expresión génica de GnRH a la misma concentración de Kiss pero con una incubación de 4 horas, demostrando de esta manera que Kiss tiene un efecto directo en estas líneas celulares.

2.1.3 Estradiol

Se sabe que los estrógenos son los reguladores principales de la función neuronal de GnRH en el cerebro femenino. En un principio, un rol directo del estradiol en las neuronas GnRH fue descartado cuando Shivers y col. (1983) reportaron la ausencia de inmunoreactividad para receptores de estrógeno (ER) en las neuronas GnRH. Sin embargo, hay cada vez más evidencias que demuestran la expresión de ER funcionales en neuronas GnRH tanto en estudios in-vivo (Butler *et al.*, 1999; Hrabovsky *et al.*, 2007) como también en líneas celulares productoras de GnRH (Navarro *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 1999).

Estudios llevados a cabo por Roy y col. (1999) demostraron una disminución en los niveles de mRNA de GnRH en la línea celular productora de GnRH, GT1-7, tratada con 17β -estradiol (E_2) por un período total de 48 horas, pudiéndose ver los efectos del mismo a partir de las 12 horas. Yewade y col. (2009) realizaron un análisis para detectar la presencia de ER en células GT1-7 y en células GN11, encontrando una mayor cantidad de ER α y β en las células GN11, y sin poder detectar niveles de ER α en las células GT1-7. En este estudio también se comprobó que el estrógeno disminuye la expresión génica de GnRH in-vitro.

Novaira y col. (2009), estudiando los efectos de Kiss en neuronas GnRH (GT1-7 y GN11), observaron que Kiss aumenta la secreción y la expresión de GnRH en células co-estimuladas con 17β -estradiol con respecto a aquellas células tratadas únicamente con 17β -

estradiol, alcanzando los niveles basales que presentan las células que no se estimulan con ninguno de los dos compuestos. Estos resultados muestran que el tratamiento con Kiss antagoniza la inhibición producto del tratamiento con estradiol en la secreción y en la expresión de GnRH.

2.2 Disruptores endócrinos (EDCs)

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) ha definido Disruptor Endócrino como “un agente exógeno que interfiere con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales del cuerpo que son responsables del mantenimiento de la homeostasis y la regulación de los procesos del desarrollo” (Kavlock *et al.* 1996).

La exposición de ratones y ratas a EDCs estrogénicos durante el desarrollo impactan en el inicio de la pubertad e inducen fallas reproductivas en adultos (Gore, 2010). Las neuronas GnRH, el último control neuronal que controla la fertilidad, exhiben las consecuencias perjudiciales de los EDCs estrogénicos. Tanto estudios *in-vivo* como *in-vitro* (con exposición pre y postnatal) indican que los EDCs pueden alterar los niveles de expresión y secreción de GnRH, el número de neuronas GnRH y su morfología (Gore, 2010).

2.2.1 Bisfenol A

El Bisfenol A (BPA, 4,4'-dihidroxi-2,2-difenil propano) es un compuesto químico, cuya estructura se puede observar en la figura 4, utilizado en la industria para producir policarbonatos y varios materiales sintéticos (Lyons, 2000). Hoy en día, es uno de los compuestos más producidos y utilizados a nivel mundial.

Los materiales sintéticos que contienen BPA son utilizados para producir artículos como lentes de sol, cascos de seguridad, secadores de pelo, refrigeradores y platos y mamaderas para bebés. Las resinas epoxi que contienen BPA sirven de manera perfecta para el revestimiento de latas de alimentos y bebidas que son almacenadas (Kaur *et al.*, 2015). Se ha demostrado que el BPA es capaz de penetrar en la comida durante el almacenamiento en latas, como también en contenedores de plástico o de papel. También se demostró que el BPA podía verse liberado de la estructura de mamaderas para bebés. Además, se encontró que todas las

operaciones como la limpieza o el calentamiento podrían estimular la liberación de BPA y en consecuencia aumentar su concentración en la comida (Vandenberg *et al.*, 2007).

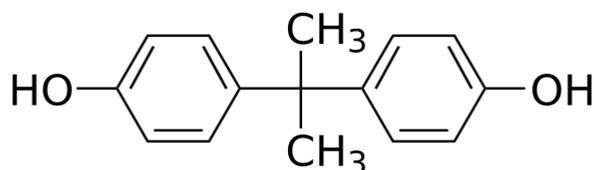


Figura 4: Estructura química del BPA.

Dada la creciente preocupación que ha surgido acerca de la potencial exposición de humanos y animales al BPA, se han definido “bajas dosis” para los estudios in-vitro e in-vivo que involucraran al BPA. Para los estudios in-vitro, se ha considerado “estudios con dosis bajas” aquellos que involucran concentraciones menores o iguales a 1×10^{-7} M (Wetherill *et al.*, 2007). Para los estudios in-vivo, la US-EPA ha definido la menor dosis a la que se observa efecto adverso, LOAEL, (Lowest Observed Adverse Effect Level) como 50 mg/kg/día. Esta dosis se utilizó para calcular la dosis de referencia, que constituye la “dosis segura”, de 50 ug/kg/día. Por esto en muchos trabajos in-vivo se considera “estudios con dosis bajas” a aquellos que involucran dosis menores a 50 mg/kg/día (Ritcher *et al.*, 2007).

Diversos estudios moleculares utilizando un gran conjunto de modelos in-vitro han revelado una variedad de vías de señalización a través de las cuales el BPA puede ejercer sus efectos. En su carácter de estrógeno no esteroide, BPA puede interferir con la actividad de los estrógenos endógenos, alterando la actividad de los receptores de estrógeno en un amplio conjunto de tejidos blanco (Gould *et al.*, 1998; Matthews *et al.*, 2001). En este sentido, el BPA puede ejercer sus efectos uniéndose a los ER α y ER β para inducir señales estrogénicas que modifiquen la expresión génica. Los mecanismos de regulación génica mediados por ER son complejos, y dependen del reclutamiento de factores co-regulatorios tejido-específicos que afectan de manera diferencial la interacción de los ER con los elementos respondedores a estrógenos de los distintos genes blanco. BPA se une selectivamente a ambos ER, teniendo una mayor afinidad por el ER β (Kuiper *et al.*, 1997). Gould y col. (1998), demostraron que el BPA posee también mecanismos de acción diferentes a los del estradiol, por ejemplo, a nivel molecular interactúa de manera distinta al estradiol con los dominios de unión a ligando del

ER α . Bulayeva y Watson (2004) realizaron un ensayo para evaluar la señalización intracelular, a través del análisis de la activación de las kinasas reguladas extracelularmente 1 y 2 (ERK $_{1/2}$), en cultivos de células tumorales expuestos con BPA en una curva de tiempo desde 3 hasta 30 minutos, y no encontraron efectos significativos del BPA sobre la activación de ERK $_{1/2}$, sin embargo observaron una tendencia a disminuir la activación que no fue estadísticamente significativa.

A pesar de haber sido descrito originalmente como un disruptor endócrino de acción estrogénica, las acciones del BPA se extienden más allá, encontrándose efectos del compuesto a través de receptores de andrógenos (Wetherill *et al.*, 2005) y disrupción en la función de las hormonas tiroideas (Kitamura *et al.*, 2005). Además, hay evidencias de que el BPA puede impactar vías de transducción de señales intracelulares a través de mecanismos independientes de los receptores nucleares (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Klenke y col. (2016), se demostraron por primera vez los efectos directos del BPA en neuronas GnRH, utilizando un modelo de explanto de ratón en el cual se mantienen un gran número de neuronas GnRH primarias y expresan una gran cantidad de los receptores encontrados in-vivo. Estos autores demostraron que las concentraciones de BPA 5×10^{-5} y 5×10^{-7} M inducen una reducción en la frecuencia de las oscilaciones de calcio en las neuronas GnRH, que se correlacionan con una disminución en la actividad eléctrica de estas células. Además, observaron que la co-estimulación de BPA e ICI182780 (ICI) no inhibe este efecto en las oscilaciones de calcio, sugiriendo la capacidad del BPA de actuar por una vía independiente a las ER α y β nucleares.

Previamente en el laboratorio, se llevaron a cabo estudios tanto in-vivo en ratas Sprague-Dawley para evaluar los efectos que produce la exposición neonatal a BPA, como in-vitro extrayendo hipófisis para la realización de cultivos primarios. Entre los resultados obtenidos se destaca que la exposición a al BPA altera la función pituitaria en ratas infantiles, disminuyendo los niveles de LH tanto basales como inducidos por GnRH y aumentando la pulsatilidad de GnRH (Fernández *et al.*, 2009). También se demostró que la exposición neonatal al BPA se asocia con una secreción alterada de GnRH in-vitro en ratas adultas (Fernández *et al.*, 2010)

2.2.2 Benzofenonas

Las benzofenonas (BPs) están compuestas por dos anillos aromáticos y un grupo carbonilo (Figura 5). Basados en esta estructura parental, un grupo de diferentes compuestos pueden generarse mediante sustituciones de átomos de hidrógeno en los anillos aromáticos (NTP 2006). En este trabajo se evaluaron los efectos de la Benzofenona 2 (BP2; 2, 2', 4, 4'-tetrahydroxybenzofenona) y de la Benzofenona 3 (BP3; 2-hidroxy-4-metoxybenzofenona) cuyas estructuras se muestran en la figura 5.

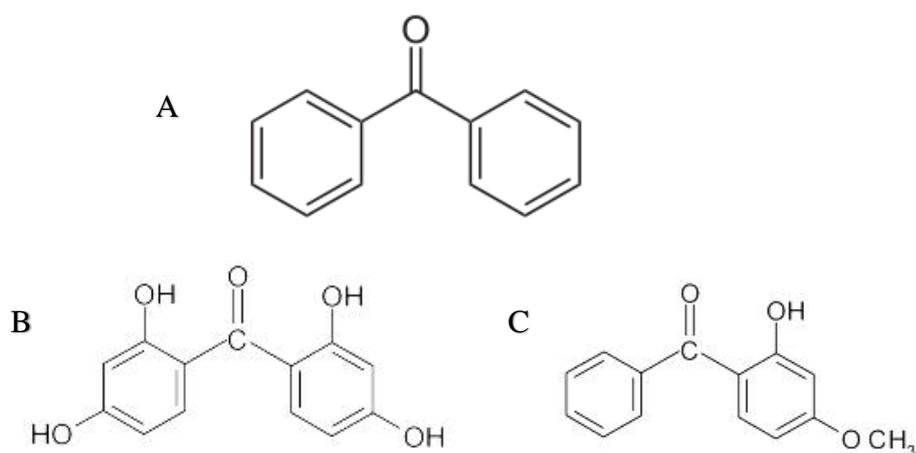


Figura 5: Estructura parental de las Benzofenonas (A),
BP2 (B), BP3 (C)

Las BPs tienen la habilidad de absorber y disipar la luz ultravioleta (UV), y como consecuencia son utilizadas como protectores UV, pudiéndose encontrar en productos como pantallas solares en hasta el 10% de su concentración, cremas y lociones corporales. Además, son ampliamente utilizadas como estabilizadores UV en plásticos para la envoltura de productos alimenticios (Zhang *et al.*, 2011). Estos compuestos son altamente lipofílicos por lo que se puede esperar la bioacumulación de los mismos en el ambiente.

Se ha demostrado que la BP3 presente en los protectores solares comerciales es capaz de penetrar en la piel humana en cantidades significativas (Jiang *et al.*, 1999). Este compuesto también fue detectado en la leche materna de una población alemana (Hany y Nagel, 1995). La aplicación dérmica de estos compuestos es la ruta principal de la exposición humana

a los mismos, por lo que entran en la circulación sistémica sin ser metabolizados por el hígado. La exposición del cuerpo humano es significativa y sigue creciendo. Por ejemplo, en la población de los Estados Unidos, un estudio encontró la presencia de la BP3 y sus metabolitos en el 98% de las muestras de orina analizada (Calafat *et al.*, 2008). La BP3 puede también penetrar de la sangre a la placenta y su alta concentración en la orina de las madres fue asociada con un peso de nacimiento incrementado en varones y disminuido en mujeres (Wolff *et al.*, 2008).

Un amplio rango de estudios in-vitro e in-vivo han identificado a los protectores solares como disruptores endócrinos. La acción más estudiada hasta ahora está relacionada con su efecto a través de los receptores de estrógeno (ER). Estudios in-vitro mostraron la actividad estrogénica de algunos filtros UV mediante la unión a los ER α y β , y su influencia en los niveles de estos receptores (Schlumpf *et al.*, 2001). Estos autores comprobaron un efecto de inducción de la proliferación celular en células MCF-7 por parte de la BP3, efecto que no es revertido por la presencia de ICI 182780 (ICI), un antagonista puro de los ER nucleares. Sin embargo, no se encontró un efecto in-vivo de este compuesto en ratas mediante el ensayo uterotrópico. Blair y col. (2000), demostraron en un trabajo que uno de los metabolitos principales de la BP3, la 2,4-dihidroxibenzofenona, se une a los ER con una afinidad del orden micromolar en contraste a su compuesto madre, lo que podría indicar que el efecto proliferativo in-vitro de la BP3 no es mediado a través de los ER.

Suzuki y col. (2004) reportaron que la BP2 posee efectos estrogénicos tanto in-vitro, en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, como in-vivo en ratas ovariectomizadas. Estos autores describen en su trabajo que el efecto estrogénico de la BP2 es inhibido en presencia de ICI. Sin embargo, no encontraron un efecto estrogénico proveniente de las BP3, resultado que plantean estar ligado a la presencia de tan sólo un grupo hidroxilo en la composición química de este compuesto, mientras que la BP2 posee 4 grupos hidroxilos. Otro de sus resultados establece el aparente efecto anti-androgénico de la BP2, actividad para la cual los grupos hidroxilos son esenciales, y por esta razón el efecto anti-androgénico tampoco estaría presente en la BP3. Ésta es una de las razones por las cuales la presencia de BP2 en protectores solares está prohibida en ciertos lugares como en la Unión Europea. Sin embargo, sigue estando presente en materiales plásticos y en algunos cosméticos, en bajas concentraciones en relación

a las que debe utilizar el protector solar, pero al encontrarse el compuesto en una amplia variedad de productos puede estar en contacto con la piel humana virtualmente todos los días.

Smutzler *et al.* (2007), estudiaron el efecto de la BP2 en el eje de la hormona tiroidea, y en base a sus resultados concluyeron que este compuesto inhibe la síntesis de la peroxidasa tiroidea, enzima clave para la síntesis de la hormona tiroidea, causando hipotiroidismo en ratas.

3. Hipótesis

Nuestra hipótesis general de trabajo se centra en que tanto el Bisfenol A como las Benzofenonas 2 y 3 actúan como xenoestrógenos y tienen un efecto directo en las neuronas productoras de GnRH. Este efecto causaría una alteración en la fisiología de las células GN11, modificando así su proliferación celular y los niveles de secreción y expresión génica de GnRH, tanto basales como inducidos por kisspeptina. También se verían alterados los niveles de expresión génica de los receptores de estrógeno α nucleares si, como suponemos, los compuestos utilizados, tienen acción estrogénica, debido a que concentraciones fisiológicas de estradiol aumentan los niveles ARN mensajero de dichos receptores en el hipotálamo (Liu X y Shi H, 2015).

4. Metodología

4.1 Cultivo celular

La línea celular de origen murino GN11, utilizada en este trabajo, fue desarrollada por la Dra. Susan Wray (NHI, USA) y cedida gentilmente por la Dra. Pamela Mellon (UCSD, USA). Estas células se obtuvieron de un ratón que poseía un tumor en el bulbo olfatorio y, por lo tanto, se originan a partir de neuronas GnRH bloqueadas en una etapa temprana de su migración, con lo cual se puede decir que son neuronas GnRH inmaduras.

Las células fueron cultivadas en botellas en medio Dubelcco's Modified Eagle's Medium con 4,5 g/L glucosa y 548 mg/L de L-glutamina (DMEM, GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Internegocios, Argentina), 1% penicilina/streptomina y 110 mg/L de piruvato de sodio (GIBCO), "medio completo". Las condiciones de cultivo fueron a 37°C en una atmósfera húmeda y con 5% CO₂.

4.2 Proliferación celular

Se plaquearon las células en placas de 96 pocillos a razón de 20000 células por pocillos en medio completo. Luego de 24 horas, el medio completo fue reemplazado por DMEM con 0,1% seroalbúmina bovina (BSA, Sigma Aldrich, USA), 1% penicilina/streptomina y 110 mg/L de piruvato de sodio. Se agregaron los estímulos Bisfenol A (BPA), Estradiol (E₂), y las Benzofenonas 2 y 3 (BP2 y BP3) (todos los compuestos fueron de Sigma Aldrich) en concentraciones de 1x10⁻⁷ M y 1x10⁻⁹ M solos o en combinación con ICI 182780 (ICI) 1x10⁻⁶ M o con Kisspeptina (Kiss) 1x10⁻⁹ M y las placas se incubaron por 24 horas. Como controles se estimularon las células por el mismo período de tiempo con medio solo o con ICI o Kiss en las concentraciones mencionadas anteriormente. Una vez finalizado el período de incubación se procedió al ensayo para evaluar la proliferación celular.

4.2.1 Ensayo de MTS

Para evaluar la proliferación celular, se utilizó el Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, MTS (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente se adicionaron 100 µL de PMS a 2 mL de MTS, y se colocaron 20 µL de esta mezcla en cada pocillo de la placa. En cada cultivo se agregó la mezcla de reactivos a 3 pocillos

sin células, estos pocillos fueron utilizados como blanco de reactivo. A continuación, las placas fueron incubadas durante 45 minutos a 37°C y luego se leyó la absorbancia a 490 nm de los pocillos utilizando un lector de placas para evaluar el desarrollo del color. Por último, se le restó la absorbancia del blanco de reactivo a la absorbancia de cada pocillo y se analizaron los resultados.

4.3 Expresión génica

Se plaquearon las células en placas de 6 pocillos, a razón de 7500000 células por pocillo, en medio completo. Luego de 24 horas de incubación, el medio fue reemplazado por medio completo con 10% SFB charcolizado en lugar de SFB. Se estimularon las células con BPA, E2, BP2, BP3 (1×10^{-9}), o medio solo como control por 24 horas, y al cabo de ese tiempo se renovaron los estímulos y se estimuló con Kiss (1×10^{-9} M) por 4 horas. Finalizada la estimulación se retiró por completo el medio de los pocillos y rápidamente se almacenaron las placas a -70°C.

4.3.1 Extracción de ARN

El ARN total fue extraído de las células GN11 tratadas según protocolo habitual del laboratorio, utilizando el reactivo Tri-Reagent (Molecular Research Center, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células provenientes de los distintos tratamientos fueron homogeneizadas con 1ml del reactivo Tri-Reagent en hielo bajo campana. Luego el homogenato se colocó en tubos eppendorf, se le adicionó cloroformo y se centrifugó para separar la solución en fase acuosa y fase orgánica. Se tomaron 500ul de la fase acuosa y se los trasvasó a otro eppendorf donde se adcionó la misma cantidad de isopropanol 100% y se lo dejó a 4 °C una noche para que el ARN precipite. Al día siguiente, se centrifugó, se retiró el isopropanol y se lavó con etanol 75% para remover las sales. Luego de retirar el etanol, se lo dejó secar, se resuspendió en 20ul de agua tratada con dietilpirocarbonato para eliminar las ARNasas y se almacenó a -70°C.

El ARN total fue cuantificado utilizando el equipo NanoDrop, que mide la absorbancia a 260 nm, y la pureza de las muestras se determinó mediante la relación de absorbancias 260/280nm (la absorbancia a 280 nm indica presencia de proteínas) y 260/230nm (la absorbancia a 230 nm indica contaminación con isopropanol u otros compuestos orgánicos).

El ARN se consideró de “Buena calidad” cuando la relación 260/280 se encontraba entre 1,8 y 2.

4.3.2 RT-PCR

Se realizaron las RT-PCR a partir de 2 ug el ARN extraído previamente utilizando la transcriptasa reversa del Virus de la leucemia murina, la cual a partir de ahora se llamará MMLV, Invitrogen, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se colocaron en tubos de 0,2 mL el volumen correspondiente de cada muestra para asegurar una cantidad de ARN de 2 ug. Luego se colocó 1 µL de oligo dT (Biodynamics S.R.L, Argentina) y 1 µL de dNTPs (Invitrogen, USA) y se llevó a volumen final de 13 µL con agua DEPC. Los tubos se incubaron a 65 °C durante 5 minutos, se colocaron rápidamente en hielo y luego se los centrifugó rápidamente para bajar las gotas que pudieran haber quedado en las paredes del tubo. A continuación, se agregó DTT y First Strand buffer y se incubó por 2 minutos a 37 °C en termocicladora. Una vez finalizada la incubación se colocó la transcriptasa reversa MMLV y se incubó durante 50 minutos a 37 °C para permitir la polimerización y posteriormente a 70 °C por 15 minutos para inactivar la reacción. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

4.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

Se realizaron las PCR en tiempo real (qPCR), utilizando el kit 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX, Solis BioDyne, Estonia) para evaluar la expresión génica de ciclofilina y de receptor de estrógenos α (ER α), y el kit FastStart Universal SYBR Green Master (ROX, Roche, Alemania) para evaluar la expresión de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y el receptor de kisspeptina (rKiss), siguiendo en cada caso las especificaciones del fabricante.

A continuación, se detallan los cebadores específicos utilizados (Tabla I) y las condiciones de ciclado para cada reacción de qPCR (Tabla II).

Nombre	FORWARD (5'-3')	REVERSE (5'-3')
Ciclofilina B	GACCTCCGTGGCCAACGAT	ACGACTCGTCCTACAGATTCATCTC
GnRH	GAACCCAGCACTTCGAATGT	TGGCTTCCTCTTCAATCAGACTTT
ER α	ATGAAAGGCGGCATACGGAAAG	CACCCATTCATTCGGCCTTC
RKiss	TGCAA ATTCGTCAAC TACATC	GGAACACAGTCACATACCAG

Tabla I. Secuencia de los cebadores específicos utilizados en las PCR en tiempo real.

Gen	GnRH	ER α	Ciclofilina B	Receptor kisspeptina
Vol. final	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
Desnaturalización inicial	10 min 95°C	15 min 95°C	10 min 95°C	15 min 95°C
Desnaturalización	15 seg 95°C	15 seg 95°C	30 seg 95°C	15 seg 95°C
Annealing	15 seg 58°C	30 seg 60°C	35 seg 59°C	15 seg 55°C
Elongación-lectura	60 seg 60°C	20 seg 72°C	30 seg 72°C	60 seg 60°C

Tabla II. Protocolos de ciclado para las reacciones de las qPCR.

Se realizaron 40 ciclos para cada reacción, y al final se agregó una curva de disociación para corroborar la presencia de un único producto. Se realizó además para cada gen una curva de diluciones de ADNc para obtener la eficiencia de cada reacción de qPCR. Se calculó la expresión relativa de cada gen utilizando el modelo matemático de Pfaffl, el cual tiene en cuenta la eficiencia de cada par de cebadores (2001). El método deltadelta CT es una simplificación de dicho modelo, que se obtiene cuando la eficiencia de los cebadores es alrededor del 100%.

4.4 Secreción de GnRH

Se plaquearon las células en placas de 24 pocillos, a razón de 200000 células por pocillo. Luego de 24 horas, el medio fue reemplazado por medio completo con 10% SFB charcolizado y los cultivos se estimularon con BP3 o BP2 en concentraciones 1×10^{-7} y 1×10^{-9} M, con BPA o E₂ en concentraciones de 1×10^{-9} M, o con medio solo como control por 24 horas. Al cabo de ese tiempo se cambiaron los medios por medio Krebs-Ringer con bicarbonato,

HEPES, glucosa y BSA. Se renovaron los estímulos y se adicionó Kiss en concentración 1×10^{-9} M por 1 hora. Al finalizar el experimento se recolectaron los medios de cultivo de las placas y se los almacenó a -20°C .

4.4.1 Radioinmunoensayo (RIA) de GnRH

Marcación: El estándar de GnRH (Bachem, CA, USA) fue marcado con ^{125}I (Na^{125}I , NEZ033H New England Nuclear, USA) de acuerdo con el método descrito por Yu y col. (1998). Brevemente, 1 mCi de Na^{125}I en 10 μL de solución fosfosalina 0,5 M, pH 7,5 y 5 μL de cloramina-T en 10 μL de PBS 0,05 M fueron agregados a 10 μg del péptido estándar (disuelto en 10 μL de ácido acético 0,1 M). Esta solución se mantuvo durante 60 segundos bajo agitación suave a temperatura ambiente. Transcurrido dicho período la reacción se detuvo por dilución mediante el agregado de 200 μL de acetato de amonio 2 mM pH 4,5. Para separar el péptido marcado del yodo libre, se emplearon columnas de intercambio iónico de carboximetilcelulosa, preparadas y equilibradas en el laboratorio. El producto de la reacción se sembró inmediatamente en esta columna y se eluyó inicialmente con 15 mL de acetato de amonio 2 mM. Se recolectó el eluido en 5 fracciones de 3 mL cada una, en estas fracciones se eluyó el ^{125}I libre. Luego se incrementó la fuerza iónica eluyendo con acetato de amonio 100 mM pH 4,5 y recuperando fracciones de 3 mL cada una. Las fracciones con marca radiactiva que eluyeron luego del pico del ^{125}I libre fueron ensayadas para evaluar la unión específica en un RIA.

Radioinmunoanálisis: El ensayo se realizó en 500 μL de volumen final. Se tomaron 125 μL de muestra por duplicado, provenientes de los cultivos tratados como se describió anteriormente, 100 μL de anticuerpo HU-60 desarrollado contra GnRH, donado gentilmente por el Dr H. Urbanski (empleado en una dilución final de 1:100.000) y 100 μL de la hormona marcada (aproximadamente 10000 cpm), llevando a volumen final de 500 μL con solución de fosfato de sodio 50 mN, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, azida sódica 15 mM, BSA 0,5% pH 7,6. La curva patrón se extiende de 0,98 a 1000,00 pg por tubo. Luego de incubar 24 horas a 4°C se precipitaron las inmunoglobulinas mediante el agregado de 1,5 mL de etanol 100% a 4°C , se incubó a la misma temperatura durante 30 minutos y luego se centrifugó por el

mismo período de tiempo a 3000 rpm y 4°C, separando de este modo el complejo hormona-anticuerpo (precipitado) de la hormona libre (sobrenadante). El sobrenadante fue descartado y se registró la radiactividad asociada al precipitado, correspondiente al complejo hormona-anticuerpo, en un contador gamma Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA).

La sensibilidad del ensayo fue de 2,5 pg y los coeficientes de variación intra e inter ensayos fueron de 4,5% y 5,3% respectivamente.

4.5 Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como el promedio \pm error estándar. Las diferencias fueron analizadas utilizando Análisis de la Varianza (ANOVA) de uno o dos factores, o de uno o dos factores para medidas repetidas (Statistica[®] versión 5.5, Statsoft Inc., OK, EEUU). Los resultados luego se analizaron utilizando la prueba a posteriori de Fisher para N iguales. Los resultados fueron considerados significativos cuando $p < 0,05$. Los ensayos se realizaron en $n=x$ experimentos independientes, y este dato se incluye en las leyendas de las figuras.

5. Resultados y Discusión

5.1 Efectos de las Benzofenonas 2 y 3, el Bisfenol A y el Estradiol sobre la proliferación celular

Con el objetivo de evaluar los efectos de las benzofenonas en la proliferación celular de la línea GN11, se realizó un ensayo de viabilidad celular por la técnica de MTS. Las células fueron pre-tratadas por 24 horas con BP2, BP3, BPA y E₂ en concentraciones de 1×10^{-7} y 1×10^{-9} M solas o en combinación con el antagonista de receptores de estrógeno ICI 182780 (ICI) en una concentración de 1×10^{-6} M. Se eligieron las dosis mencionadas debido a que se considera que dosis iguales o menores a 1×10^{-7} M son concentraciones bajas para en ensayos que involucren al disruptor endócrino BPA (Wetherill *et al.*, 2007). Cabe aclarar que en este ensayo no se implementó una fase de recuperación del cultivo luego de los tratamientos, lo cual implica una limitación en la técnica ya que los resultados se miden en base a la actividad metabólica de la célula, lo cual no siempre se condice directamente con una modificación en la proliferación de las mismas. Como se observa en la figura 6, el tratamiento con las benzofenonas en ambas concentraciones aumenta la proliferación celular respecto del control, y esto no se ve modificado por el co-tratamiento con ICI.

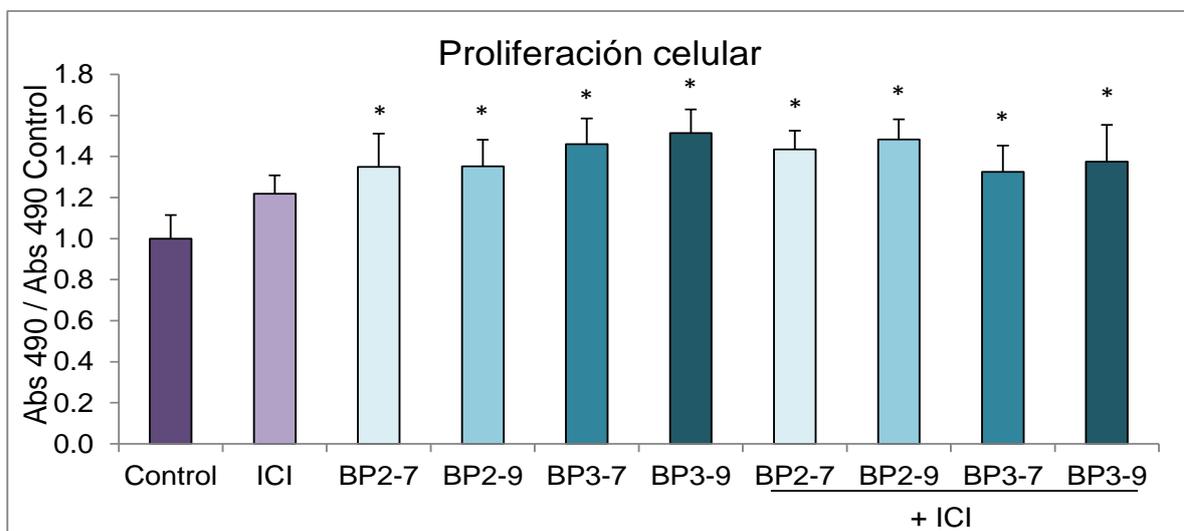


Figura 6: Proliferación de las células GN11 en respuesta al tratamiento con BP2 o BP3 (1×10^{-7} y 1×10^{-9} M) solas o en combinación con ICI 182780 1×10^{-6} . ANOVA para medidas repetidas $p < 0.05$ * = distinto del control, $p < 0,05$, $n = 8$ (8 experimentos independientes, cada uno con 3 réplicas técnicas). BP2-7: BP2 1×10^{-7} M, BP2-9: BP2 1×10^{-9} M, BP3-7: BP3 1×10^{-7} M, BP3-9: BP3 1×10^{-9} M. +ICI: tratamiento correspondiente con co-tratamiento con ICI. El tratamiento con ICI no modifica el efecto de las benzofenonas sobre la proliferación

Estos resultados pueden indicar que el mecanismo de acción de las benzofenonas no está mediado por su interacción con los receptores de estrógeno nucleares, dato que concuerda con lo publicado para la BP3 por Schlumpf y col. (2001). Sin embargo, estos resultados se contradicen con el estudio realizado por Suzuki y col. (2004), en donde se muestra que el aumento en la proliferación celular mediado por BP2 es inhibido en presencia de ICI. Uno de los motivos para esta discrepancia puede deberse a la diferencia en las líneas celulares utilizadas, ya que la de los autores fue MCF-7 que es de cáncer de mama, y la utilizada en este estudio es GN11, una línea productora de GnRH.

En cuanto a la estimulación con BPA y E_2 , podemos observar en la figura 7, que ambos aumentan significativamente la proliferación celular en ambas concentraciones y esto no se ve modificado en las concentraciones más altas por la co-estimulación con ICI. Sin embargo, en el co-tratamiento de BPA 1×10^{-9} M e ICI, se revierte el aumento en la proliferación celular retornando a los valores basales. En cuanto a la co-estimulación del E_2^{-9} e ICI, se ve una reversión parcial del efecto proliferativo del E_2 , no siendo estadísticamente significativo.

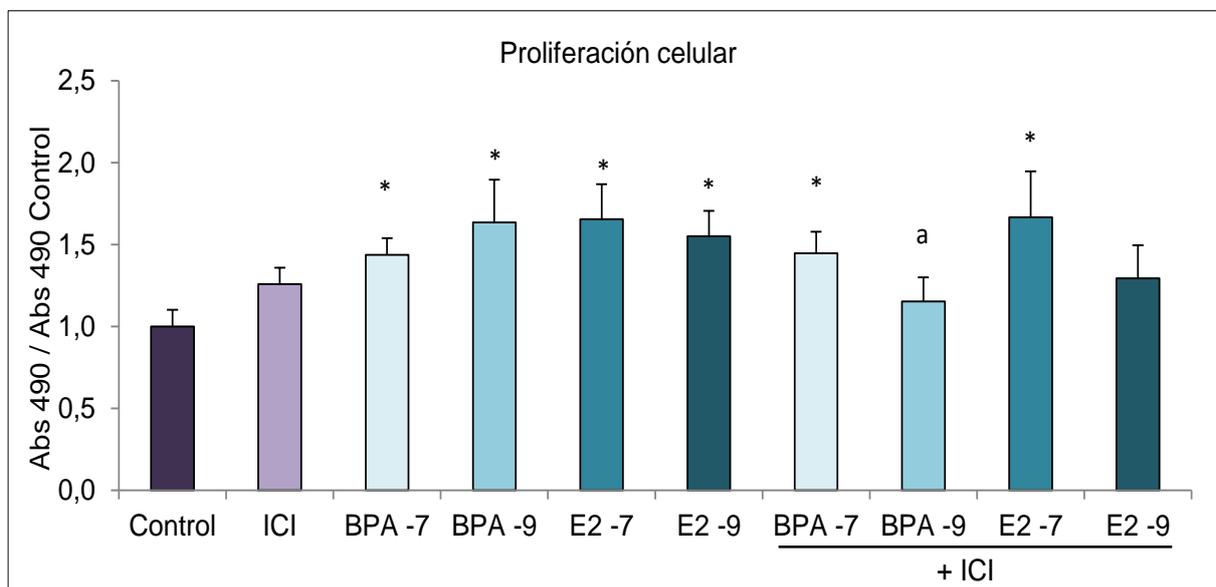


Figura 7: Proliferación de las células GN11 en respuesta al tratamiento con BPA o E2 (1×10^{-7} y 1×10^{-9} M) solas o en combinación con ICI 182780 1×10^{-6} M. ANOVA para medidas repetidas $p < 0.05$ * = distinto del control, $p < 0,05$, a = distinto de BPA⁻⁹, $p < 0,05$, n = 8 (8 experimentos independientes, cada uno con 3 réplicas técnicas).

Estos resultados nos indicarían que BPA podría estar actuando en parte a través de los receptores nucleares de estrógenos. Sin embargo, a concentraciones más altas podría actuar también a través de alguna de las otras vías descritas para el compuesto. E₂ no pareciera actuar a través de los receptores nucleares para ejercer el efecto proliferativo, por lo que probablemente sea otra la vía importante para este efecto. Una posibilidad es que E₂ y el resto de los compuestos actúen aumentando la proliferación celular a través del ER de membrana llamado ER α 36. Esta vía de señalización fue estudiada por Chaudrhi y col. para las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y HCC38. También es posible que actúen a través del receptor acoplado a proteína G 30 (GPR30) o el receptor relacionado con el receptor de estrógenos gamma (ERR γ), dado que se vió que en explantos nasales provenientes de embriones murinos esta vía estaba activada por BPA (Klenke y Wray, 2016). En experimentos futuros evaluaremos acción de estos compuestos a través de los receptores de membrana. Cabe aclarar que no se realizó un control de la actividad biológica del inhibidor de ER utilizado con lo cual no puede descartarse que el mismo haya perdido su actividad razón por la cual no se observa la reversión de los efectos del estradiol en la proliferación. Para el caso del estradiol, este ha sido

utilizado en experimentos en los que se evalúa el efecto sobre la proliferación en células GH3, observándose en este caso el efecto esperado, es decir un aumento de la secreción de prolactina, con lo cual concluimos que se mantiene su actividad biológica (Scilletta *et al.*, 2017).

Es de destacar que no se observa una curva dosis respuesta para el efecto observado. En el caso de los experimentos que evalúan acción de disruptores endócrinos, especialmente para el caso del BPA, que es el disruptor que más ha sido estudiado, se observa a menudo curvas dosis respuesta no monotónicas, es decir, en forma de U o de U invertida (Vandenberg, 2014). Este podría ser el caso de nuestros experimentos, o simplemente podríamos estar en un caso de saturación del efecto sobre la proliferación. Para evaluar estas posibilidades realizaremos una curva dosis-respuesta con mayor cantidad de concentraciones.

Teniendo en cuenta que kisspeptina fue primero identificada como un gen supresor de tumores en melanoma, y que tiene efectos antiproliferativos en células de carcinoma gástrico (Li *et al.*, 2012), se analizó el efecto de Kiss solo o en combinación con BP2, BP3, BPA y E₂ sobre la proliferación celular. En la figura 8 se observa que Kiss aumenta significativamente la proliferación celular y esto no se ve modificado por la combinación con ninguno de los estímulos, con lo que se puede decir que el efecto de Kiss es máximo en las condiciones del ensayo.

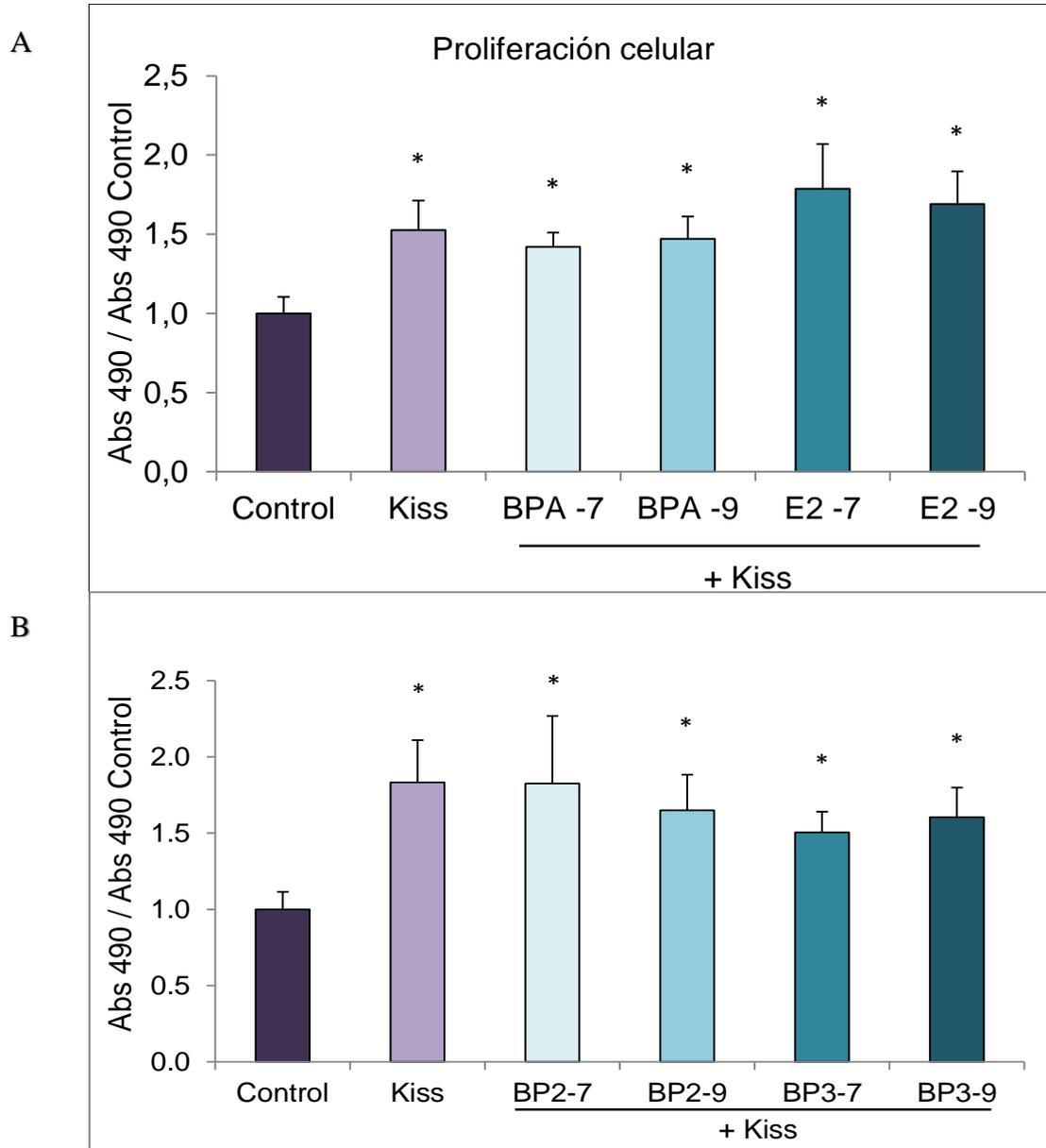


Figura 8: Proliferación de las células GN11 en respuesta al tratamiento por 24hs con Kiss 1×10^{-9} M sola o en combinación con BPA, E₂ (A), BP2 o BP3 (B) 1×10^{-7} o 1×10^{-9} M. ANOVA para medidas repetidas $p < 0.05$ * = distinto del control, $p < 0,05$; n= 8 (8 experimentos independientes, cada uno con 3 réplicas técnicas).

Los resultados indicarían que Kiss y los otros compuestos ensayados compartirían algún componente de su vía de señalización, dado que no se observa un aumento

en la proliferación en los cultivos co-tratados o bien que las respuestas son máximas para cada uno de ellos a las concentraciones ensayadas.

Hasta nuestro conocimiento este es el primer trabajo que demuestre el efecto proliferativo de Kiss en una línea celular productora de GnRH.

5.2 Efectos de las Benzofenonas 2 y 3, el Bisfenol A y el Estradiol sobre la expresión génica de GnRH

Para evaluar la expresión génica de GnRH, se estimularon las células durante 24 hs con BP2, BP3, BPA y E₂ en concentraciones de 1×10^{-9} M o con medio solo. Al cabo de este tiempo se cambió el medio de cultivo, se renovaron los estímulos y se los estimuló con Kiss 1×10^{-9} M o PBS por 4 horas. Se observó un aumento significativo en la expresión génica de GnRH inducida por Kiss en los grupos control (figuras 9 y 10), resultado previamente informado por Navarra y col. (2009). BP2 y BP3 no tuvieron ningún efecto *per se* sobre la expresión de GnRH. El aumento inducido por Kiss no se ve modificado por el pre tratamiento con BP3. Sin embargo, se observa que el tratamiento con Kiss y BP2 disminuye la expresión en comparación con el grupo control tanto estimulado con Kiss como con vehículo, resultado

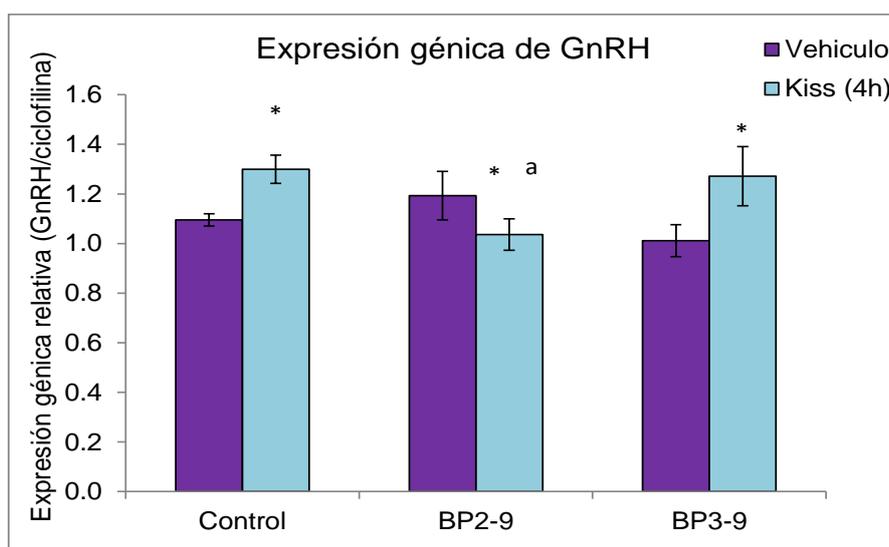


Figura 9: Expresión génica de GnRH en células Gn11 expuestas a BP2 o BP3 (1×10^{-9} M) por 24 hs. Los cultivos fueron tratados por kisspeptina o vehículo por 4 horas. ANOVA para medidas repetidas $p < 0.05$; *= distinto del control-veh, $p < 0.05$; a= distinto de las 4 horas de Kiss (control), $p < 0.05$, $n=8$.

que posiblemente esté ligado a la gran cantidad de grupos hidroxilo que posee la BP2 en comparación con la BP3 como sucede para otros puntos finales ensayados (Suzuki *et al.*, 2008).

Por otro lado, ni el estradiol ni el BPA modificaron *per se* la expresión de GnRH. En el caso de la estimulación con Kiss en los cultivos pre tratados con BPA y E₂, se vio la inhibición del aumento de expresión génica inducida por Kiss, retornando a los niveles de expresión basales. Al BPA tener el mismo efecto que el E₂, se demuestra en este caso el efecto estrogénico que se le adjudica al BPA.

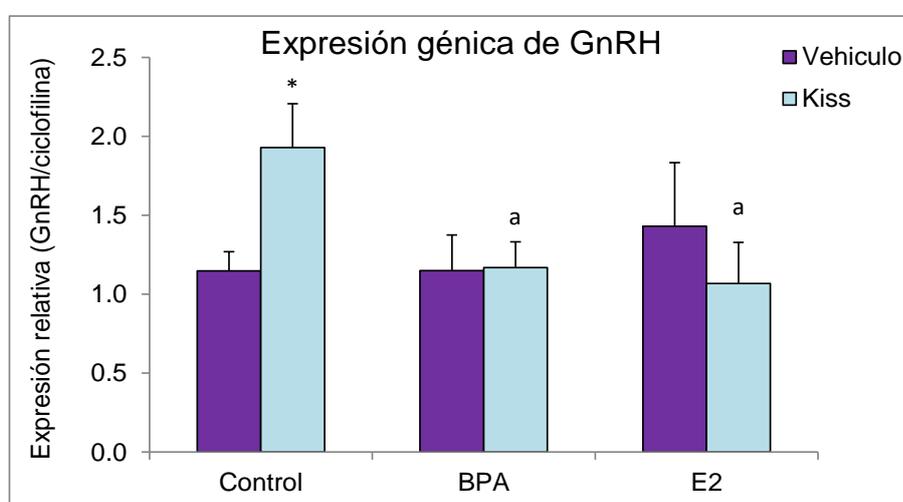


Figura 10: Expresión génica de GnRH en células GN11 expuestas a BPA o E₂ (1x10⁻⁹M) por 24 hs. Los cultivos fueron tratados con kisspeptina o vehículo por 4 horas. ANOVA para medidas repetidas, p <0.05: *= distinto del vehículo (control), p<0,05; a= distinto de Kiss (control), p<0,05, n=8

Roy y col. (1999) plantearon que la incubación con E₂ de la línea celular GT1-7 disminuye los niveles de expresión de GnRH. En nuestro trabajo observamos que la incubación con E₂ en la línea celular GN11 no influye en estos niveles. Comparando los resultados podemos hipotetizar que la diferencia se debe al estadio del desarrollo en el cual las líneas celulares fueron inmortalizadas, viéndose así una sensibilidad al E₂ en la línea GnRH madura, pero no así en la línea inmadura. Sin embargo, estos resultados tienen una contradicción directa con los publicados por Novaira y col. (2009), en donde se muestra que el estradiol inhibe la expresión de GnRH por sí solo, y que Kiss antagoniza esta inhibición en la línea celular GN11, siendo que en nuestros experimentos no se observaron efectos por parte del E₂ solo, y se vió

una inhibición mediada por el E₂ en el efecto inductor de la expresión génica por parte de Kiss. Una explicación posible para esta discrepancia puede ser que los autores del trabajo utilizaron E₂ en una concentración mayor (1×10^{-8} M), e incubaron a las células por 12 horas, cuando en nuestro trabajo se las incubó por 24 horas. Es posible que se produzca una desensibilización de las células hacia el estradiol luego de una incubación prolongada a dosis más altas, lo que explicaría por qué no encontramos efectos directos del E₂ en la expresión génica de GnRH en nuestras condiciones experimentales. Se realizarán experimentos adicionales con mayores rangos de tiempo y concentraciones para probar esta hipótesis.

5.3 Efectos de las Benzofenonas 2 y 3, el Bisfenol A y el Estradiol sobre la secreción de GnRH

Para analizar la secreción de GnRH se estimularon las células por 24 hs con BP2 o BP3 en concentraciones 1×10^{-7} M o 1×10^{-9} M, o con BPA o E₂ en concentración de 1×10^{-9} M. Al cabo de las 24 horas el medio fue renovado junto con los estímulos, y se estimuló con Kiss 1×10^{-9} M o vehículo durante 1 hora, para evaluar el efecto del pretratamiento sobre la liberación de las vesículas de GnRH listas para ser secretadas ante el estímulo de Kiss. Al finalizar la estimulación se recolectó el medio y se evaluó la concentración de GnRH por RIA.

En concordancia con lo publicado por Navarra y col. (2009), se vio en todos los casos que Kiss por si sola aumenta de manera significativa la secreción de GnRH en los cultivos (Figuras 11 y 12).

En el caso de las benzofenonas, se observó que la BP3 en su menor concentración aumenta significativamente la secreción de GnRH basal, y este aumento no se ve modificado por la estimulación con Kiss, resultado que podría deberse al agotamiento de vesículas que contienen GnRH durante la estimulación con BP3, no quedando hormona disponible para liberar durante la estimulación con Kiss. Para el caso de la BP2, podemos ver que en su mayor concentración presenta un aumento significativo en la secreción en co-estimulación con Kiss, y en la concentración más baja se vio que inhibe el efecto inductor de secreción de Kiss en comparación con el control (Figura 11). Previamente se observó que BP2 1×10^{-9} inhibe la expresión de GnRH estimulada con Kiss, lo cual se condice con lo que observamos respecto a la expresión génica. La falta de inhibición observada con la dosis más

alta puede deberse a que a mayores concentraciones BP2 puede estar activando otras vías de señalización adicionales a las responsables del efecto observado a la dosis menor. Experimentos adicionales agregando un rango mayor de concentraciones serán llevados a cabo para evaluar esta hipótesis. Por otro lado, muchas veces los disruptores endócrinos presentan curvas dosis respuesta en forma de U o de U invertida, lo cual también puede ser evaluado usando un rango mayor de concentraciones (Vandenberg, 2014). Estas curvas dosis-respuesta no monotónicas son probablemente la explicación por lo cual BP3 aumenta la secreción de GnRH en su concentración más diluida mientras que no tiene efecto a una concentración mayor.

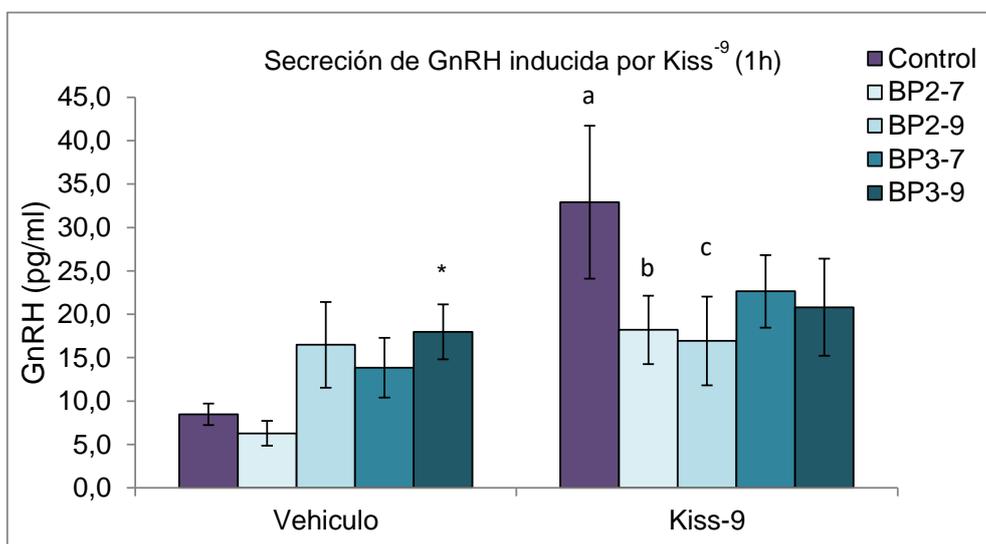


Figura 11: Secreción de GnRH en células GN11 estimuladas por 24 horas con BP2 o BP3 (1×10^{-7} o 1×10^{-9} M). Los cultivos fueron tratados con Kiss o vehículo por 1h. ANOVA para medias repetidas $p < 0.05$: *= diferente del control, $p < 0.05$; a= diferente del vehículo (control), $p < 0.05$; b= diferente del vehículo (BP2⁻⁷), $p < 0.05$; c= diferente de Kiss (control), $p < 0.05$, n=9

Analizando los efectos del BPA, podemos ver un aumento en los niveles basales de secreción de GnRH en los cultivos, mientras que no se observa un aumento mayor en la secreción de GnRH inducida por Kiss (Figura 12). En el caso de estradiol, no se ven cambios significativos en las condiciones basales y se pierde la estimulación en presencia de Kiss, con lo cual se puede pensar que el estradiol inhibe completamente el efecto de Kiss en la secreción de GnRH en esta línea celular. Este resultado es una contradicción al publicado por Novaira y

col. (2009), en donde se reportó que el efecto del E₂ inhibe significativamente la secreción de GnRH, y que esto se ve revertido con la co-estimulación con Kiss.

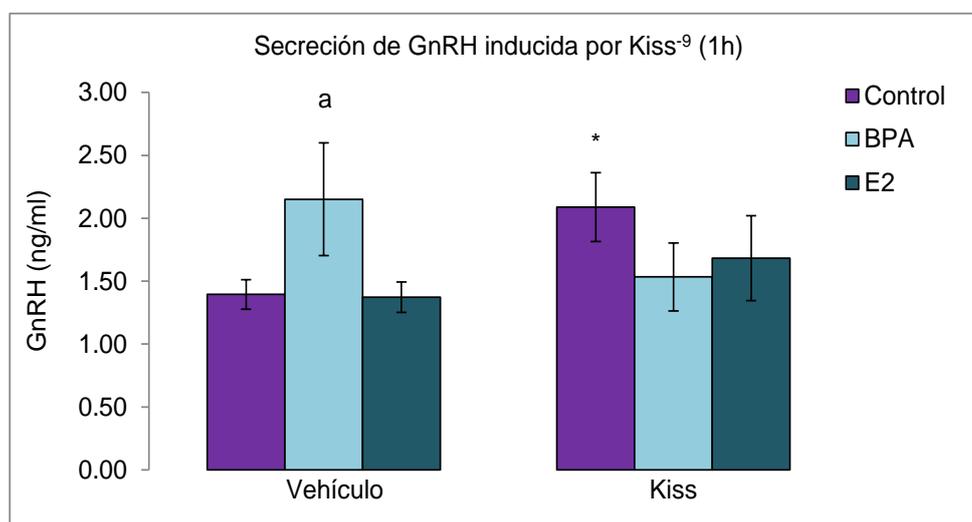


Figura 12: Secreción de GnRH en células GN11 estimuladas por 24 horas con BPA o E₂ (1×10^{-9} M). Los cultivos fueron tratados con Kiss o vehículo por 1h. ANOVA para medias repetidas $p < 0.05$: *= diferente del control-Veh, $p < 0,05$; a= diferente de control-Veh, $p < 0,05$, $n=7$

5.4 Efectos de las Benzofenonas 2 y 3, el Bisfenol A y el Estradiol sobre la expresión génica de receptores de estrógeno α

Para evaluar la expresión génica de receptores de estrógeno α (ER α), se estimularon las células durante 24 horas con BP2, BP3, BPA y E₂ en concentraciones de 1×10^{-9} M o con medio solo, ya que se considera que dosis menores a 1×10^{-7} M son dosis bajas para experimentos que involucren a estos disruptores endócrinos (Wetherill *et al.*, 2007). Como se observa en las Figuras 12 y 14, no se observaron diferencias significativas en los niveles de ER α en ninguno de los cultivos. Sin embargo, en los casos en los que se estimuló a las células con BPA o E₂, se puede ver una tendencia a un aumento en la expresión que podría descartarse o confirmarse aumentando el número de casos. BP3 por otro lado pareciera disminuir la expresión respecto del control, aunque esto tampoco alcanza significancia estadística.

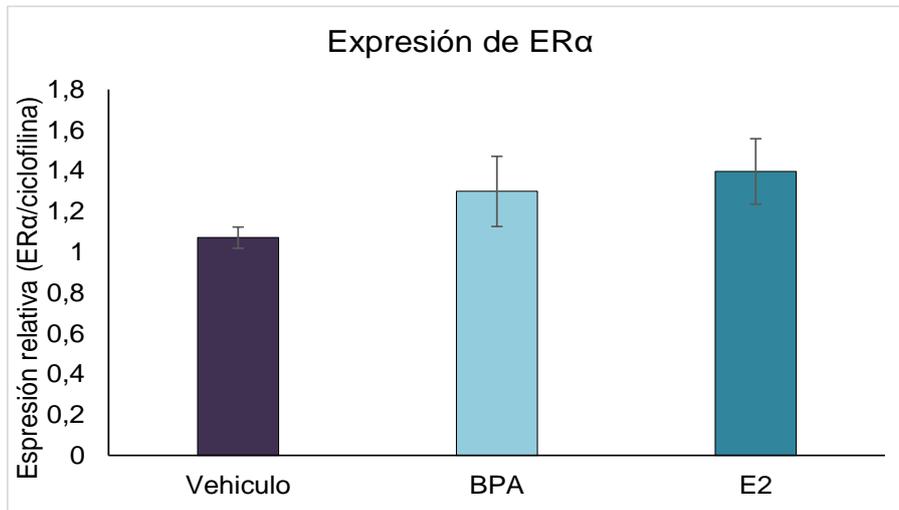


Figura 13: Expresión génica de ERα (ERα) en células GN11 expuestas a BPA o E2 (1×10^{-9} M) por 24 hs. ANOVA para medidas repetidas ns, n=6

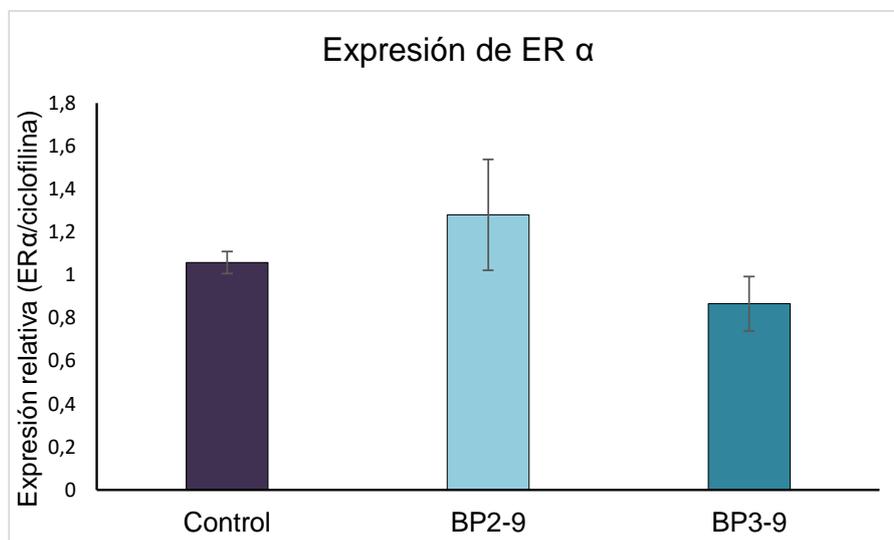


Figura 14: Expresión génica de ERα en células GN11 expuestas a BP2 y BP3 (1×10^{-9} M) por 24 hs. ANOVA para medidas repetidas ns, n=10

Cabe aclarar que estos resultados fueron obtenidos a nivel de ARNm, y utilizando un único tiempo de estimulación. Si bien existe controversia acerca de la presencia o ausencia de receptores de estrógeno α en las neuronas GnRH, nuestros resultados

confirmarían la expresión del receptor de estrógenos α , al menos a nivel de ARNm, en neuronas GnRH inmaduras, resultado que coincide con el publicado por Yewade y col. (2009).

5.5 Efectos de las Benzofenonas 2 y 3 sobre la expresión génica del receptor de Kisspeptina, GPR54

Dado que el pretratamiento con BP2 1×10^{-9} M disminuye la expresión génica de GnRH inducida por Kiss, y que el pretratamiento con BP2 y BP3 disminuye la liberación de GnRH inducida por Kiss, se evaluó si estaba disminuida la expresión del receptor de Kisspeptina, GPR54. Para evaluar la expresión génica de GPR54 se estimularon las células con BP2 o BP3 en concentraciones de 1×10^{-9} M o con medio solo. No se observaron cambios significativos a nivel de expresión de GPR54 en ninguno de los casos ensayados (Figura 15).

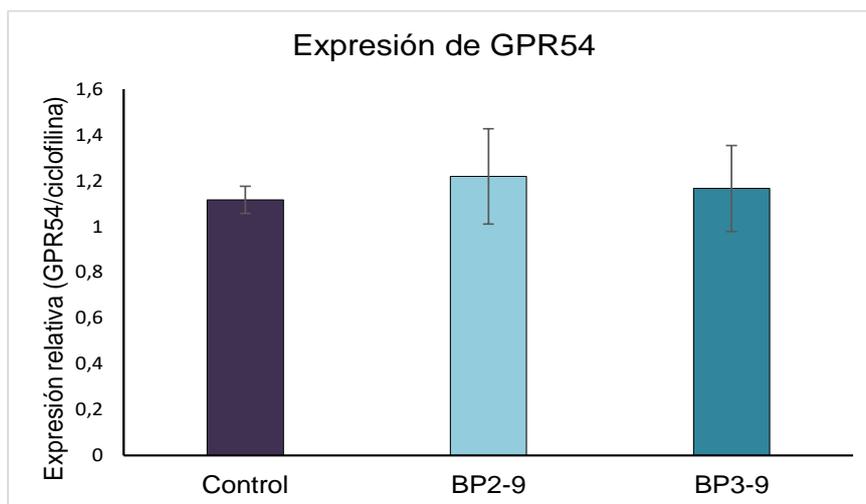


Figura 15: Expresión génica de GPR54 en células GN11 expuestas a BP2 o BP3 (1×10^{-9} M) por 24 hs. ANOVA para medidas repetidas ns, n=10

6. Conclusiones

En este trabajo se estudiaron los efectos causados por tres disruptores endócrinos encontrados frecuentemente en el ambiente, el Bisfenol A (BPA) y las Benzofenonas 2 y 3 (BP2 y BP3), en la fisiología de una línea celular murina inmadura, productora de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), denominada GN11. Los principales hallazgos de este estudio indican que:

6.1 Los disruptores endócrinos aumentan la proliferación celular

- Este aumento está mediado por un mecanismo independiente al de receptores de estrógeno (ER) α y β nucleares en el caso de las BPs.
- En el caso del BPA, el mecanismo que induce la proliferación celular parecería ser parcialmente dependiente de los ER α y β nucleares.
- La diferencia entre la dependencia parcial del BPA y la independencia de las BPs de los ER creemos radica en las diferencias estructurales entre ambos tipos de compuestos, que pueden fácilmente alterar completamente la afinidad de los compuestos por los receptores.

6.2 Kisspeptina aumenta la proliferación celular

- Es muy probable que kisspeptina (Kiss) y los disruptores compartan algún componente en su vía de señalización, dado que no se observa un aumento en la proliferación de cultivos co-tratados. Hasta donde conocemos, este es el primer indicio de una acción de Kiss sobre la proliferación celular de neuronas GnRH.

6.3 Los disruptores endócrinos modifican la expresión y la secreción de GnRH inducida por kisspeptina.

- El pretratamiento con BP2 inhibe la expresión génica de GnRH tanto basal como inducida por Kiss, mientras que BP3 no modifica la expresión. La diferencia probablemente se deba a que la BP2 posee un mayor número de grupos hidroxilo que la BP3, tal como lo plantean en su trabajo Suzuki y col. (2004).

- En cuanto a la secreción de GnRH, el resultado depende de la dosis utilizada, para la dosis más baja, BP3 aumenta la secreción de GnRH por sí sola y esto no se modifica por el co-tratamiento con Kiss, lo cual posiblemente se debe al agotamiento de vesículas de GnRH. En la dosis más baja, BP3 inhibe la secreción inducida por Kiss mientras que BP2 no la modifica.
- BPA inhibe el aumento de la expresión y secreción de GnRH inducido por Kiss, y aumenta por sí solo la secreción de GnRH basal.

6.4 La línea celular GN11 expresa receptores de estrógeno α

- De acuerdo a otros autores, demostramos que las células Gn11 expresan ER α , por lo menos a nivel de ARNm.
- Los disruptores no modifican los niveles de expresión de ER α en las condiciones experimentales evaluadas.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la exposición de células productoras de GnRH a BPA, BP2 y BP3, genera una alteración en la fisiología celular de manera directa. Estos efectos podrían en algunos casos estar mediados en parte por ER α y β , así como también por mecanismos alternativos, como a través del receptor GPR30. El mecanismo de acción de los disruptores deberá ser estudiado a futuro para comprender el efecto específico a nivel molecular.

Finalmente, podemos concluir que nuestros resultados evidencian la importancia de conocer y evaluar el efecto de los contaminantes ambientales aquí estudiados, ya que como se expuso en la sección de antecedentes, la población se encuentra expuesta a los mismos en la vida diaria. Más aún, estos resultados muestran la susceptibilidad de una línea celular inmadura a estos compuestos, siendo así necesario cuidar especialmente la potencial exposición a los contaminantes en bebés y niños pequeños.

7. Bibliografía

- Alonso-Magdalena P., Laribi O., Ropero A., Fuentes E., Ripoll C., Soria B. Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca²⁺ signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. *Environ Health Perspect.* 2005, vol. 113, p. 969-977.
- Blair R., Fang H., Branham S., Hass S., Dial L., Moland C., Tong W., Shi L., Perkins R., Sheenan D. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol Sci.* 2000, vol. 54, p. 138-153.
- Bulayeva N., Watson C., Xenoestrogen-Induced ERK-1 and ERK-2 Activation via Multiple Membrane-Initiated Signaling Pathways. *Environmental Health Perspectives.* 2004, vol. 112, p. 1481-1487.
- Calafat M., Wong Y., Ye X., Reidy A., Needham L. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the united states; national health and nutrition examination survey 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* 2005, vol. 116, p. 893-897.
- Caraty A., Franceschini I. Basic aspects of the control of GnRH and LH secretions by kisspeptin: Potential applications for better control of fertility in females. *Reproduction in domestic animals.* 2008, vol. 43, p. 172–178.
- Chaudhri R., Navarrete R., Cuenca N., Hadadi A., Boyan B., Schwartz Z. Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via ER α 36. *J Biol Chem.* 2012, vol. 287, p. 7169-7181.
- Cheng C., Leung P. Molecular Biology of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and Their Receptors in Humans. *Endocrine Reviews* 26(2):283–306.
- Fernández M., Bianchi M., Lux-Lantos V., Libertun C. Neonatal exposure to bisphenol A alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. *Environmental Health Perspectives,* 2009, vol. 117, p. 757-762.
- Fernández M., Bourguignon N., Lux-Lantos V., Libertun C. Neonatal exposure to bisphenol A and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environmental Health Perspectives,* 2010, vol. 118, p. 1217-1222

- Gore C. Neuroendocrine targets of endocrine disruptors. *Hormones (Athens)*. 2010, vol. 9, p. 16-27.
- Gould J., Leonard L., Maness S., Wagner B., Conner K., Zacharewski T. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol*. 1998, vol. 142, p. 203-214.
- Hany J., Nagel R. Detection of sunscreen agents in human breast milk. *Deutsche Lebens.-Rund*. 1995, vol. 91, p. 341-345.
- Jiang R., Roberts M., Collins D., Benson H. Absorption of sunscreens across human skin: an evaluation of commercial products for children and adults. *Blackwell Science Ltd Br J Clin Pharmacol*. 1999, vol. 48, p. 635-637
- Kaur K., Simon A., Chauhan V., Chauhan A. Effect of bisphenol A on *Drosophila melanogaster* behavior – A new model for the studies on neurodevelopmental disorders. *Behav Brain*. 2015, vol. 284, p. 77–84.
- Kavlock R., Daston G., DeRosa C., Fenner-Crisp P., Gray L., Kaattari S., Lucier G., Luster M., Mac M., Maczka C., Miller R., Moore J., Rolland R., Scott G., Sheehan D., Sinks T., Tilson H. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect*. 1996, vol. 104, p. 715-740.
- Kitamura S., Kato T., Iida M., Jinno N., Suzuki T., Ohta S. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sciences*. 2005, vol. 76, p. 1589-1601.
- Klenke U., Constantin S., Wray S. BPA directly decreases GnRH neuronal activity via noncanonical pathway. *Endocrinology*. 2016, vol. 157, p. 1980-90.
- Kuiper G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997, vol. 138, p. 863-870.
- Liu X., Shi H. Regulation of Estrogen Receptor α Expression in the Hypothalamus by Sex Steroids: Implication in the Regulation of Energy Homeostasis. *International Journal of Endocrinology*. Volume 2015 (2015), Article ID 949085.

- Li N, Wang H, Zhang J, Ye Y, He G. KISS-1 inhibits the proliferation and invasion of gastric carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology* 2012 April 21; 18(15): 1827-1833
- Lyons G. Bisphenol A: a known endocrine disruptor. A WWF European Toxics Programme Report. *WWF European Toxics Programme: Godalming*, 2000.
- Maggi R., Pimpinelli F., Molteni L., Milani M., Martini L., Piva F. Immortalized Luteinizing hormone-releasing hormone neurons show a different migratory activity *in vivo*. *Endo*. 2000, vol. 141, p. 2105-2112.
- Matthews J., Twomey K., and Zacharewski T. *In vivo* and *in vivo* interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol*. 2001, vol. 14, p. 149-157.
- Mellon P., Windle J., Goldsmith P., Padula C., Roberts J., Weiner R. Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron*. 1990, vol. 5, p. 1–10.
- Merchenthaler I., Gorcs T., Setalo G., Petrusz P., Flerko B. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell Tissue Res*. 1984, vol 237, p. 15–29.
- Novaira H., Ng Y., Wolfe A., Radovick S. Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 2009, vol. 311, p. 126-134
- NTP (2006) Toxicology and carcinogenesis studies of benzophenone (CAS No. 119–61–9) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). NTP TR 533. Technical report. National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services. NIH Publication no. 06–4469
- Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001, vol. 29, p. 45-53.
- Radovick S., Wray S., Lee E, Nicols D., Nakayama Y., Weintraub B., Westphal H., Cutler G., Wondisford F. Migratory arrest of gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, vol. 88, p. 3402–3406.

- Richter C., Birnbaum L., Farabollini F., Newbold R., Rubin B., Talsness C. *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol.* 2007, vol. 24, p. 199-224.
- Schlumpf M., Cotton B., Conscience M., Haller V., Steinmann B., Lichtensteiger, W. *In vivo* and *in vivo* estrogenicity of UV screens. *Environ. Health Perspect.* 2001, vol. 109, p. 239–244.
- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff D. The migration of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neurons from the medial olfactory placode into the medial basal forebrain. *Experientia.* 1990, vol. 46, p. 956–962.
- Schwanzel-Fukuda M., Pfaff D. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature.* 1989, vol. 338, p. 161–165.
- Scilletta NA, Fernández M, Arocena P, Bellino MG, Lux-Lantos V, Catalano PN. Steroid-releasing Nanostructured Biomaterial Coating for Controlling Cell Proliferation and Hormone Secretion. *Medicina.* 2017, vol. 77 supl. I, p. 435, abstract 418.
- Seminara S., Crowley W. Jr. Kisspeptin and GPR54: Discovery of a novel pathway in reproduction. *Journal of neuroendocrinology.* 2008, vol. 206, p. 727–731.
- Suzuki T., Kitumara S., Khota R., Sugihara K., Fujimoto N., Ohta S. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivates used as UV stabilizers and sunscreens. 2004
- Tsutsumi R., Webster N. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocrine journal.* 2009, vol. 56, p. 729-737.
- Vandenberg L. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose Response.* 2004, vol. 12, p. 259-276.
- Vandenberg L., Hauser R, Marcus M., Olea N., Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* 2007, vol. 24, p. 139–177.
- Welshons W., Nagel S., Vom Saal F. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology.* 2006, vol. 147, p. 56-69.

- Wetherill B., Akingbemi B., Kanno J., McLachlan J., Nadal A., Sonnenschein C, et al. *In vitro* molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol.* 2007, vol. 24, p. 178-198.
- Wetherill Y., Fisher N., Staubach A., Danielsen M., Vere White R., and Knudsen K. Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Research.* 2005, vol. 65, p. 54-65.
- Wetsel W. Immortalized hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons: a new tool for dissecting the molecular and cellular basis of LHRH physiology. *Cell Mol Neurobiol.* 1995, vol. 15, p. 43–78.
- Wolff, M.S., Engel, S.M., Berkowitz, G.S., Ya, X., Silva, M.J., Zhu, C., Wetmur, J., Calafat, A.M., 2008. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ. Health Perspect.* 116 (8), 1092-1097.
- Xu X., Lu Y., Zhang G., Chen L., Tian D., Shen X., Yang Y., Dong F. Bisphenol A promotes dendritic morphogenesis of hippocampal neurons through estrogen receptor-mediated ERK_{1/2} signaling pathway. *Chemosphere.* 2014, vol. 96, p. 129-137.
- Zhang Z., Ren N., Li Y., Kunisue T., Gao D., Kannan K. Determination of benzotriazole and benzophenone UV filters in sediment and sewage sludge. *Environ Sci Technol.* 2011, vol. 45, p.3909–3916.