

## Trabajo Original

### Efectos de una dosis baja de bisfenol A sobre el eje reproductor de ratas machos prepúberes

*Effects of a low dose of bisphenol A on the reproductive axis of prepuberal male rats*

Méd. Juan Manuel Gámez; Méd. Romina Penalba; Dra. Nancy Cardoso; Dr. Osvaldo Ponzo; Bioq. Silvia Carbone; Dr. Matías Pandolfi; Dr. Pablo Scacchi; Dra. Roxana Reynoso

Laboratorio de Endocrinología, Facultad de Medicina UBA. Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina. Laboratorio de Neuroendocrinología y Comportamiento, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA  
E-mail: rroxam@yahoo.com.ar

#### Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de una dosis baja de bisfenol A (BPA) sobre el eje reproductor de ratas macho prepúberes, expuestas durante la gestación y la lactancia.

Se trató a ratas hembra preñadas con una dosis aproximada de exposición de BPA de 3 µg, administrado en el agua de bebida, y el tratamiento continuó durante la lactancia. Las crías macho fueron sacrificadas a los 35 días de vida, etapa prepuberal. Se evaluó el peso corporal durante el desarrollo de las crías y al momento del sacrificio, como así también los pesos testiculares y de vesículas seminales y sus respectivos pesos relativos. Las ratas se sacrificaron por decapitación y se recolectó sangre troncal para la determinación de LH, FSH y testosterona. Se realizó además estudio histológico de tejido testicular. El peso corporal al momento del sacrificio fue significativamente superior en el grupo expuesto a BPA en comparación con el grupo control; el peso testicular disminuyó significativamente; el peso de vesículas seminales y los pesos relativos de testículo y de vesículas seminales no se modificaron con el tratamiento.

Los niveles de LH y FSH se incrementaron significativamente con el tratamiento y los de testosterona no mostraron cambios significativos. El estudio histológico mostró la luz de los túbulos seminíferos disminuida por la presencia de células inmaduras de la serie espermática. Nuestros resultados demuestran que la exposición a bajas dosis de BPA durante la gestación y la lactancia altera la normal función del eje reproductor de ratas macho prepúberes.

**Palabras clave:** bisfenol A, eje reproductivo, ratas macho prepúberes.

#### Abstract

*The objective of the present work was to study the effect of a low dose of bisphenol+ A (BPA) on the reproductive axis of prepuberal male rats, exposed to it*

*during gestation and lactation period. Pregnant female rats were treated with an estimated average dose of exposure of 3 ug/kg/day of BPA, administered in drinking water, this treatment continued during lactation period. Male pups were sacrificed at 35 day of life, at prepuberal stage. Body weight was evaluated during development of the pups and at the moment of sacrifice, testis and seminal vesicles weight was determined and relative weights were also analyzed. Rats were sacrificed by decapitation and troncal blood was collected in order to determined LH, FSH and testosterone serum levels. Histological studies of testis tissue were also performed. Body weight at the moment of sacrifice was significantly higher than control group body weight, testis weight decreased significantly, meanwhile seminal vesicle weights and relative weights were not modify by treatment. LH and FSH serum level were increased by treatment and testosterone did not show changes. Histological studies showed the lumen of seminal tubes was reduced due to the presence of immature cells of the spermatic lineage. Our results demonstrated that exposure to a low dose of BPA during gestation and lactation alters the normal function of the reproductive axis of prepuberal male rats.*

**Key words:** bisphenol A, reproductive axis, prepuberal male rats.

#### Introducción

Los disruptores endocrinos (DE) han sido definidos por la Agencia de Protección Ambiental Norteamericana (U.S. EPA), como: “Sustancias exógenas al organismo, naturales o sintéticas, que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción biológica o eliminación de las hormonas responsables del mantenimiento de la homeostasis y regulación del desarrollo” (1).

Datos bibliográficos sugieren que los DE son capaces de actuar sobre los distintos niveles del eje reproductor (hipotálamo-hipófisis-gónadas). Actualmente se

considera que los mecanismos de desarrollo y la programación del eje durante la vida fetal pueden ser la ventana de mayor sensibilidad para afectar de forma permanente la actividad de este eje endocrino. Los estadios más vulnerables a la disrupción endocrina parecen ser el período prenatal y posnatal temprano, ya que es el momento en que los órganos y los sistemas neurales experimentan cambios rápidos. La organización del control neuroendocrino del eje reproductor, por ejemplo, no está completa al momento del nacimiento y permanece sensible, por lo tanto, a la interacción de los esteroides o de los DE en el período neonatal. La pubertad y la perimenopausia también son períodos sensibles a la disrupción, debido a los cambios hormonales que ocurren durante su transcurso (2).

El bisfenol A (BPA) es un DE utilizado en la fabricación de plásticos policarbonatos, que están presentes en la mayoría de los envases alimenticios, resinas epoxi que cubren el interior de las latas de conserva, fabricación de pegamentos de uso habitual, cañerías y selladores dentales usados en odontología. Estudios previos han demostrado que el BPA interfiere con la actividad de los estrógenos endógenos, modificando las vías de transducción y mecanismos de acción de estas hormonas sexuales en los diversos tejidos blanco. Algunos de estos efectos estarían mediados por la capacidad del BPA de unirse a ambas isoformas del receptor estrogénico, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , lo que pondría en marcha vías de señalización intracelular, que modificarían de manera variable la expresión de genes respondedores a los estrógenos (3-6). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el BPA actuaría vía receptores de membrana y podría activar cascadas de señalización intracelular a muy bajas concentraciones. Por otra parte, se ha descrito que el BPA posee también actividad antiandrogénica ya que al unirse al receptor de andrógenos (AR) inhibe su interacción con la hormona esteroidea, la translocación nuclear del propio receptor y la interacción de AR con su coactivador (7). Asimismo, estudios de Ramos y cols. han demostrado que la exposición a BPA durante la gestación produce disminución de la expresión del receptor androgénico (8).

Datos epidemiológicos muestran un incremento notorio de trastornos de la función reproductiva tanto en animales como en el hombre, lo que sugiere una posible relación entre éstos y el creciente número de DE presentes en el medio ambiente. Los principales efectos de la exposición a los DE sobre la fertilidad masculina incluyen: deterioro de la calidad del esperma, alta incidencia de criptorquidia e hipospadias, aumento de la incidencia de cáncer testicular y de próstata, entre otros (9,10).

Reportes previos demuestran que en ratas macho la exposición a una dosis de BPA de 2,4  $\mu\text{g}$  entre

los días 21 y 35 de vida posnatal disminuye los niveles séricos de LH y testosterona. Dicha exposición se asoció además a un aumento del tamaño prostático, disminución del peso del epidídimo y de la producción diaria de espermatozoides (11).

Considerando estos hallazgos previos, el objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de una dosis baja (3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) de BPA sobre el eje reproductor de ratas macho prepúberes expuestas al DE durante la gestación y la lactancia.

## Materiales y métodos

### *Animales y tratamiento*

Se utilizaron ratas Wistar hembra (peso 250-300 g) provenientes del Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron alojados individualmente en jaulas metálicas con viruta de madera, mantenidos en un ambiente de luz y temperatura controladas (período de luz de 07:00 a 19:00 h, T: 22-24 °C) y con acceso al alimento y al agua de bebida *ad libitum*. Los experimentos comenzaron luego de la aclimatación al ciclo de luz-oscuridad durante una semana, momento en el cual una rata Wistar macho (peso 300-350 g) y una hembra fueron alojadas en una misma jaula, hasta que el apareamiento fue confirmado por la presencia del tapón vaginal. El día de su aparición fue considerado día de gestación 0 (DG0). Las hembras preñadas fueron separadas y colocadas individualmente en cajas metálicas. Se administró a las ratas madre etanol 0,1% (grupo control, n=10) o BPA (4,4' isopropylidene-diphenol, MP Biomedicals LLC, Germany) disuelto en etanol (grupo tratado, n=10), desde el inicio de la gestación (DG 0) y durante el período de lactancia, 21 días luego del nacimiento (DPN 21), momento en el cual las crías macho fueron destetadas, finalizando así el período de tratamiento. Los animales fueron sacrificados a los 35 días de vida, etapa prepuberal.

El BPA fue disuelto en etanol 100% hasta una concentración de 0,3 mg/ml; se realizó posteriormente una dilución 1:10 con agua corriente para obtener una concentración de BPA de 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  realizando luego una dilución 1:1000 para llegar a la concentración final de 30  $\mu\text{g}$ . La dosis aproximada de exposición (DAE) fue de 3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ . Estas estimaciones fueron realizadas mediante la observación y medición de la diferencia de cantidad de agua colocada inicialmente en la botella y la cantidad remanente al día siguiente. Los cálculos asumen que toda el agua faltante en la botella fue consumida, no se tuvo en cuenta una posible pérdida o evaporación del agua o la pérdida de actividad del BPA durante el período de 24 h. El nivel de BPA que afectó a las crías durante la gestación o el ingerido posnatalmente por las crías durante el período de lactancia no fueron tenidos

en cuenta en estos experimentos. Es importante tener en cuenta que la dosis baja que produce efectos adversos (LOAEL) establecida para el BPA por la U.S. EPA es de 50 mg/kg/día y la dosis considerada segura para el humano es de 50 µg/kg/día (12). La dosis utilizada en estos experimentos fue similar a la mayor dosis de exposición humana reportada en trabajos previos (13,14). Por otra parte, es importante aclarar que la ruta de administración oral fue elegida para mimetizar la ruta más común de exposición al BPA en los humanos.

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

Luego del nacimiento, se determinó el número de crías, se realizó un examen físico detallado y se controló el peso a lo largo de su crecimiento y hasta el día del sacrificio, momento en el cual se determinó el peso de órganos sexuales y el peso corporal. Finalmente se calcularon los pesos relativos de cada órgano ([peso órgano/peso corporal-peso órgano] x 100).

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

Para evaluar los efectos del BPA sobre las gonadotrofinas, la secreción de testosterona y la morfología de órganos reproductores, luego de la decapitación se recolectó sangre troncal y se determinó la concentración sérica de LH y FSH por radioinmunoensayo (RIA), y de testosterona por electroquimioluminiscencia (EQLIA). A su vez, se extrajeron los testículos para realizar los estudios histológicos correspondientes.

### **Determinación de LH, FSH y testosterona**

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

### **Estudios histológicos**

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

### **Análisis estadístico**

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

## **Resultados**

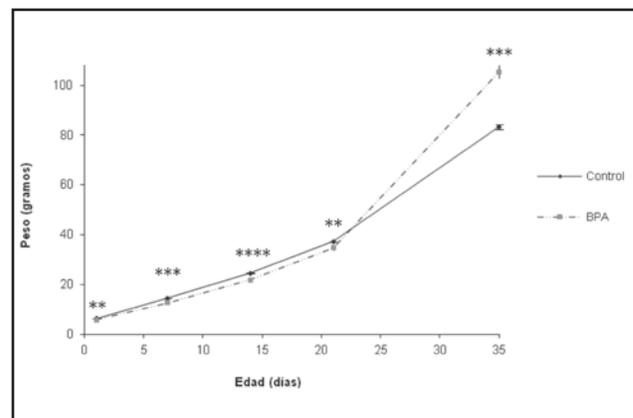
### **Efectos del bisfenol A sobre el desarrollo**

#### **1. Determinación del peso corporal**

El peso de los animales fue controlado periódicamente desde el día del nacimiento hasta el día del sacrificio (días 1, 7, 14, 21 y 35 días). Los animales tratados con BPA mostraron un descenso significativo de su peso corporal al nacer y a los 7, 14 y 21 días de vida; se observó un aumento significativo de este a los 35 días de vida, \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. control (FIGURA 1).

#### **2. Observación de descenso testicular**

Se realizó por examen macroscópico la observación de descenso testicular entre los días 16 y 22 de vida de los animales, no se encontraron alteraciones en este parámetro del desarrollo en los animales tratados.



**Figura 1.** Peso corporal de los animales desde el día del nacimiento hasta el día del sacrificio (días 1, 7, 14, 21 y 35 días). \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. control.

### 3. Peso testicular, peso de vesículas seminales y pesos relativos

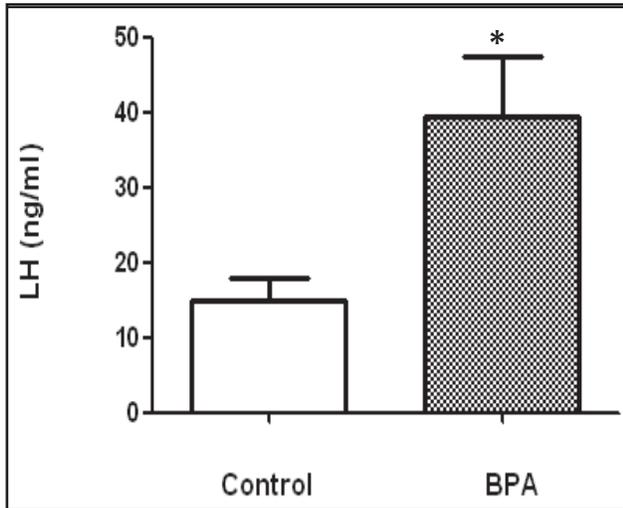
Se pesaron los testículos y vesículas seminales (VS) extraídos luego del sacrificio y se calculó su peso relativo (PR),  $PR = (\text{peso tejido/peso corporal}) - (\text{peso tejido}) \times 100$ , relacionando así el peso del tejido al peso corporal del animal. Se observó una disminución estadísticamente significativa del peso testicular. El peso de vesículas seminales mostró una tendencia a la disminución, que no fue estadísticamente significativa. Los pesos relativos correspondientes no sufrieron modificaciones. En la Tabla I se muestra además el peso corporal al momento del sacrificio (35 días), como se comentó previamente este mostró un aumento significativo en los animales expuestos a BPA con respecto al grupo control (TABLA I). \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  vs. control.

### Efectos del BPA sobre la hipófisis y órganos reproductores

#### Efectos del bisfenol A a nivel hipofisario

#### 1. Determinación de los niveles séricos de gonadotropinas, LH y FSH

Se observó un aumento significativo de los niveles de LH y FSH en los animales expuestos a BPA (FIGURAS 2 y 3), \*  $p < 0,05$  vs. control.



**Figura 2.** Niveles séricos de LH. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM (n=6-11), \*  $p < 0,05$  vs. control.

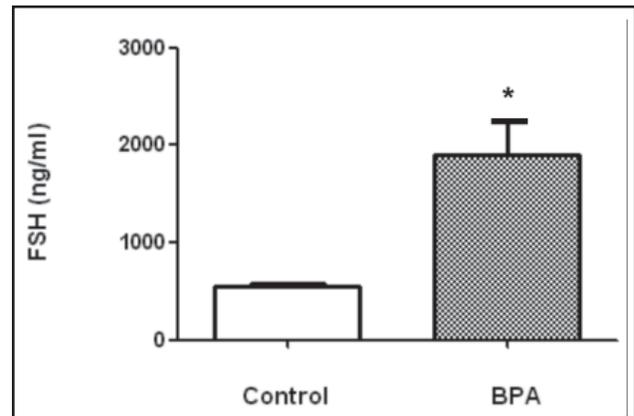
### Efectos del bisfenol A a nivel testicular

#### 1. Niveles de testosterona

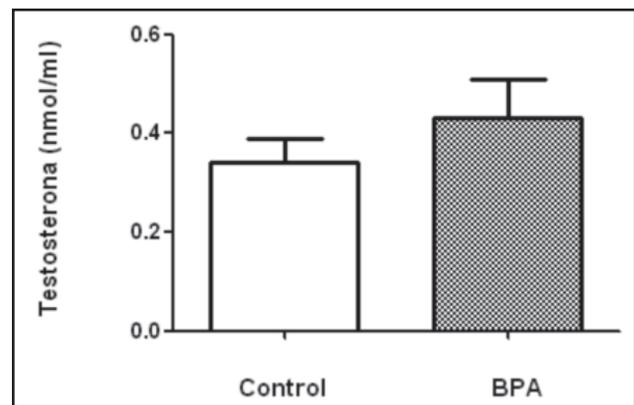
Los niveles séricos de testosterona no se modificaron significativamente en los animales tratados respecto de los controles (FIGURA 4).

#### 2. Estudios histológicos

El estudio histológico mostró que la luz de los túbulos seminíferos de los animales expuestos a BPA se encontraba ocupada por células inmaduras de la serie espermática (FIGURAS 5 y 6).



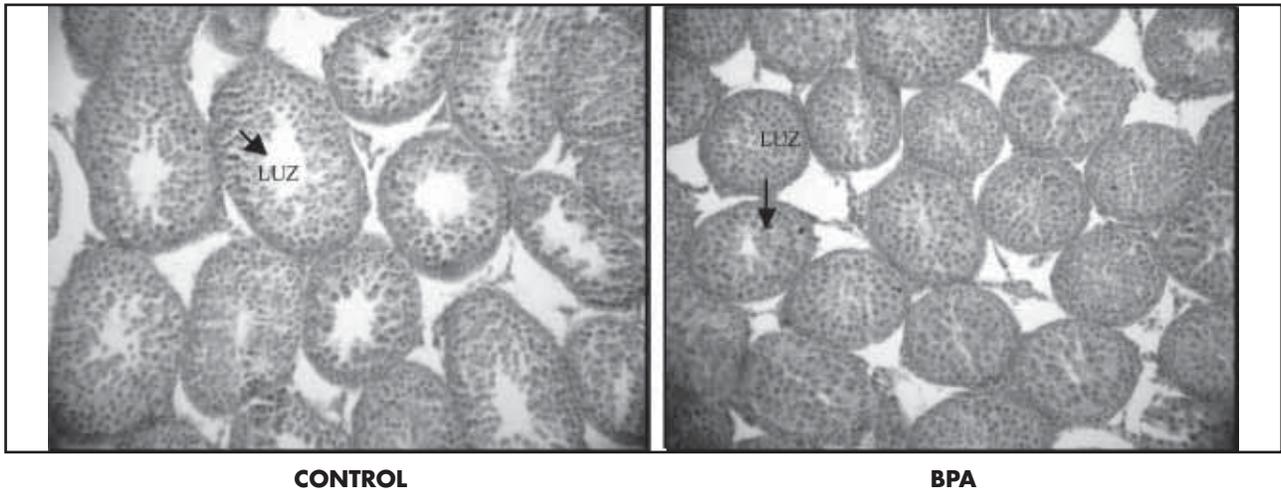
**Figura 3.** Niveles séricos de FSH. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM (n=6-11), \*  $p < 0,05$  vs. control.



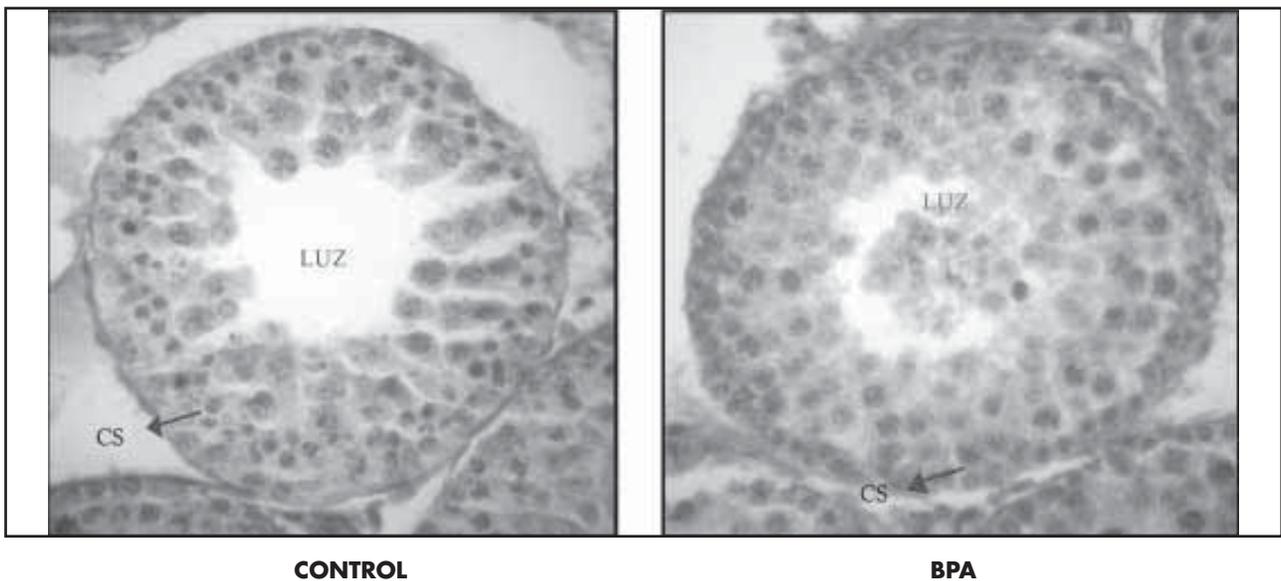
**Figura 4.** Niveles séricos de testosterona. Cada columna representa la media  $\pm$  SEM (n=8-12).

	CONTROL	BPA
<b>Peso corporal (g)</b>	83,3 $\pm$ 1,0	105,5 $\pm$ 2,6***
<b>Peso testicular (g)</b>	0,358 $\pm$ 0,007	0,304 $\pm$ 0,007 **
<b>Peso de vesícula seminal (g)</b>	0,050 $\pm$ 0,005	0,040 $\pm$ 0,006
<b>Peso testicular relativo</b>	0,363 $\pm$ 0,008	0,339 $\pm$ 0,004
<b>Peso de VS relativo</b>	0,058 $\pm$ 0,007	0,049 $\pm$ 0,004

**Tabla I.** Peso corporal, testicular y vesículas seminales y pesos relativos al momento del sacrificio.. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  vs. control



**Figura 5.** Detalle de túbulos seminíferos en cortes transversales de testículos de ratas control y tratadas. Aumento: 125X.



**Figura 6.** Se observa a mayor detalle la ocupación de las luces de los túbulos seminíferos por restos celulares de la serie espermática. CS: células de Sertoli. Aumento: 400X.

## Discusión

Los resultados demuestran que la exposición a una dosis baja de BPA durante las etapas pre y posnatal modifica la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en ratas macho prepúberes.

Al analizar los parámetros de desarrollo, se observó en los animales tratados con BPA una disminución significativa de su peso corporal al nacer y a los 7, 14 y 21 días de vida, y se observó un aumento significativo de éste a los 35 días de vida. Otros autores han reportado variaciones en el peso corporal y los resultados al respecto son controvertidos. Kwon y cols. (15) no observaron cambios en el peso corporal de ratas de la cepa Sprague-Dawley expuestas a altas dosis de BPA durante

la gestación y la lactancia, administrando BPA por vía oral mediante una sonda. Rubin y cols. (16) reportaron aumento de pesos corporales en crías hembra de madres tratadas desde el día 6 de preñez y hasta la lactancia, cuando el BPA se administró por vía oral en el agua de bebida, en un diseño experimental semejante al empleado por nosotros. Los distintos resultados obtenidos por los grupos de trabajo podrían estar relacionados con la dosis y vía de administración, o bien con la cepa de animales utilizados, como ha sido reportado previamente (17). El incremento de peso corporal observado en nuestros animales a los 35 días de vida podría estar relacionado con la presencia de receptores para estrógenos en el tejido adiposo. El metabolismo del tejido adiposo es

modulado por hormonas esteroideas, por lo tanto, puede ser afectado por los DE; en este sentido, estudios realizados in vitro con líneas celulares humanas han demostrado que el BPA estimula la acumulación de lípidos (18). Por otra parte, se ha reportado que la exposición a BPA durante el período peri y posnatal incrementa la masa de tejido adiposo y los niveles de colesterol sérico en ratones (19). La unión de BPA a receptores estrogénicos podría regular la función del adipocito y ser responsable del incremento de peso observado a los 35 días de vida en nuestros animales. El peso testicular mostró una disminución significativa, mientras que el peso de las vesículas seminales, efector androgénico, mostró una tendencia a la disminución pero esta no resultó estadísticamente significativa. Los respectivos pesos relativos mostraron también una tendencia a la disminución que no fue significativa. El peso testicular depende en gran medida del número de células de Sertoli. La proliferación de estas células ocurre en un preciso período que se inicia durante la vida fetal y continúa durante la vida neonatal (20). En nuestros animales, el peso testicular descendió con el tratamiento y de acuerdo con las observaciones histológicas, las células de Sertoli podrían encontrarse afectadas en su morfología. Estos efectos estarían dados por la unión del BPA a los receptores estrogénicos (ER $\beta$ ) presentes en las células de Sertoli. Estos receptores se expresan en etapas tempranas del desarrollo, precisamente en la etapa fetal y en etapas posteriores (21). El BPA al unirse a ellos podría alterar la morfología de estas células y, además, podría reducir su número y, consecuentemente, ocasionar modificación del peso testicular y la organización tubular (22). En este sentido, el estudio histológico mostró que la luz tubular se encontraba ocupada por células inmaduras de la serie espermática, este hallazgo sugiere un efecto indirecto del BPA sobre el epitelio germinal, como se ha descrito previamente (23). Es conocido que la translocación de células germinales del compartimiento basal al luminal ocurre por cambios conformacionales en el margen lateral de las células de Sertoli, por lo tanto, la presencia de células inmaduras de la serie espermática en la luz del túbulo podría deberse a hipoplasia o hipertrofia de las células de Sertoli. Con respecto al efecto del BPA a nivel hipofisario, observamos un aumento significativo de los niveles séricos de gonadotropinas, LH y FSH, los cuales no fueron acompañados de cambios significativos en los niveles séricos de testosterona. En un trabajo previo hemos reportado disminución significativa de los niveles de testosterona, LH y FSH en animales expuestos durante la gestación y la lactancia a una dosis aproximada de exposición de 2,5 mg/kg/día y estudiados durante la etapa prepuberal (24). Akingbemi y cols. (11) observaron efectos similares cuando los animales fueron expuestos

durante la misma etapa a dosis bajas de BPA (2,4  $\mu$ g). Sin embargo, cuando los animales fueron expuestos a la misma dosis pero desde la etapa prepuberal hasta la adultez, encontraron un patrón similar al obtenido por nosotros en este trabajo; aumento de LH sin cambios en los niveles de testosterona. De lo expuesto en este trabajo y en otros realizados por diversos autores, se desprende que los niveles de gonadotropinas y de testosterona también serían dependientes de la dosis de exposición y de la etapa del desarrollo en la que se exponen y estudian los animales.

El aumento de los niveles séricos de LH observado en nuestros animales podría deberse a que a esta dosis baja el BPA podría estar ejerciendo su efecto antiandrogénico interfiriendo en la unión de testosterona a sus receptores en hipotálamo e hipófisis, como así también provocando una disminución de la expresión del receptor androgénico a estos niveles, como se ha reportado previamente (7,8). De esta manera, el BPA impediría el *feed-back* negativo ejercido fisiológicamente por la testosterona. Por otra parte, los animales tratados mostraron también un aumento significativo de los niveles séricos de FSH, el que podría deberse a un efecto del BPA sobre la secreción de inhibina. Es probable que el BPA disminuya la secreción de esta hormona, lo que llevaría a un aumento en los niveles séricos de esta gonadotropina. Sería importante entonces determinar los niveles de inhibina en futuros trabajos para confirmar los efectos del BPA sobre las células de Sertoli y sobre la secreción de esta hormona (25). Con respecto al efecto del BPA sobre la testosterona, se ha reportado previamente un efecto inhibitorio de este DE sobre las enzimas de biosíntesis de este esteroide (11). Este efecto no fue observado en nuestros resultados, los niveles séricos de testosterona no mostraron cambios significativos y es probable que esto se deba a un mecanismo compensatorio activado "in vivo", como por ejemplo, el incremento de la secreción de LH.

Nuestros datos demuestran que la exposición a una baja dosis de BPA durante la gestación y la lactancia altera el normal funcionamiento del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal de animales prepúberes. Estos resultados además refuerzan los hallazgos planteados por diversos autores sobre la importancia del momento de exposición del individuo al DE y la dosis a la cual está expuesto.

## Referencias

1. COM706. Comisión de las Comunidades Europeas. Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos (Sustancias de las que se sospecha interfieren en lo sistemas hormonales de seres humanos y animales). Bruselas, 1999.

2. Mostafa RM, Mirghani Z, Moustafa KM, Moustafa YM, El Hefnawi MH. New chapter in old story: Endocrine disrupters and male reproductive system. *Journal of Medical Sciences Research*. 2007; 2:33-41.
3. Adachi T, Yasuda K, Mori C, Yoshinaga M, Aoki N, Tsujimoto G, et al. Promoting Insulin secretion in pancreatic islets by means bisphenol A and non-ylphenol via intracellular estrogen receptors. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(5):713-719.
4. Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect*. 2006;114(1):106-112.
5. Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, et al. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol*. 1998;142(1/2):203-214.
6. Wetherill Y, Akingbemi B, Kanno J, McLachlan J, Nadal A, Sonnenschein C, et al. In vitro molecular mechanisms of Bisphenol A action. *Toxicol*. 2007;24:178-198.
7. Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and non-ylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci*. 2003;75(1):40-6.
8. Ramos J, Varayoud J, Kass L, Rodriguez L, Muñoz de Toro M, Luque E. Bisphenol a induces transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology*. 2003;144:3208-3215.
9. Carlsen E, Giwerman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J*. 1992;305:609-13.
10. Bay K, Asklund C, Skakkebaek NE, Andersson AM. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20:77-90.
11. Akingbemi B, Sottas C, Koulova A, Klinefelter G, Hardy M. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen Bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*. 2004;145:592-603.
12. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, et al. Endocrine disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009;30:293-342.
13. Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect*. 1996;104:298-305.
14. Tohei A, Suda S, Taya K, Hashimoto T, Kogo H. Bisphenol A inhibits testicular functions and increases luteinizing hormone secretion in adult male rats. *Exp Biol Med*. 2001;226(3):216-221.
15. Kwon S, Stedman DB, Elswick BA, Cattley RC, Welsch F. Pubertal development and reproductive functions of Crl:CD Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development. *Toxicol Sci*. 2000;55:399-406.
16. Rubin B, Murray M, Damassa D, King J, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of Bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity and plasma LH levels. *Environ Health Perspect*. 2001;109:675-680.
17. Watanabe S, Wang RS, Miyagawa M, Kobayashi K, Suda M, Sekiguchi S, et al. Short communication imbalance of testosterone level in male offspring of rats perinatally exposed to bisphenol A. *Ind Health*. 2003;41(4):338-341.
18. Wada K, Sakamoto H, Nishikawa K, et al. Lifestyle related diseases of the digestive system: endocrine disruptors stimulate lipid accumulation in target cells related to metabolic syndrome. *J Pharmacol Sci*. 2007;105:133-7.
19. Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol A increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb*. 2007;14:245-52.
20. Sharpe RM, Atanassova N, McKinnell C, Parte P, Turner KJ, Fisher JS, et al. Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats treated neonatally with diethylstilbestrol: a possible role of estrogens in Sertoli cell development. *Biol Reprod*. 1998;59:1084-1094.
21. Williams K, McKinnell CM, Saunders PTK, Walker M, Fisher JS, Turner KJ, et al. Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Human Reproductive Update*. 2001;7(3):236-247.
22. Berndtson WE, Thompson TI. Changing relationship between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. *J Androl*. 1990;11:429-435.
23. Atanassova N, McKinnell C, Turner KJ. Comparative effects of neonatal estrogen exposure of male rats to potent and weak environmental estrogens on pubertal onset of spermatogenesis and the relationship to adult testis size and fertility; evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology*. 2000;141:3898-3907.

24. Cardoso N, Pandolfi M, Ponzo O, Carbone S, Szwarcfarb B, Scacchi P, et al. Evidence to suggest glutamic acid involvement in Bisphenol A effect at the hypothalamic level in prepubertal male rats. *Neuroendocrinol Lett.* 2010;31(4):101-105.
25. Cardoso N, Pandolfi M, Lavalle J, Carbone S, Ponzo O, Scacchi P, et al. Probable gamma amino

butyric acid involvement in Bisphenol A effect at the hypothalamic level in adult male rats. *J Physiol Biochem.* 2011;67(4):559-67.

**Agradecimientos:** este trabajo se llevó a cabo con fondos provistos por Subsidio UBACYT. Proyecto M434, Universidad de Buenos Aires.