

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



**Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias
Biológicas**

Impacto de la exposición a xenoestrógenos sobre las poblaciones de células germinales

Lic. Valentina Galliani

Director de Tesis: Dr. Horacio A. Rodríguez

Co-director de Tesis: Dr. Julián E. Abud

**Lugar de realización: Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL,
UNL-CONICET)**

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento, en primer lugar, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, al Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL).

A mi director, Horacio, por haber confiado en mí y elegirme para trabajar en su grupo; fue una experiencia que aportó muchísimo tanto a mi formación académica como humana. A mi codirector, Julián, cuyo apoyo fue un gran pilar en estos años; gracias a los dos por ser personas tan maravillosas.

A mi familia, Martín y Agos, su apoyo es lo que hizo que todo esto fuera más fácil, gracias una vez más. A mi papá y a mis estrellas, por sostenerme siempre.

Este doctorado no solo me dio formación académica, sino que me dio otra familia. El apoyo diario, además de Horacio y Julián, me lo dieron ellas, mis amigas: Vichi, Pau, Ailín, Aye y Pame ¡Las que están apoyando y ayudando siempre! ¡Gracias!.

Agradezco a mi prima Guille, ya que formó parte de todo esto desde los inicios, gracias!

Agradezco a la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación, que permitió el inicio de la beca para realizar esta tesis, y al CONICET por brindarme la beca para poder finalizarla.

Finalmente, gracias a todos los que conforman el ISAL; cada uno de ustedes aportó algo a lo largo de estos cinco años que me ayudó en el día a día.

Aportes científicos-tecnológicos

Galliani, V., Abud, J. E., Zenclussen, M. L., & Rodríguez, H. A. (2024). Female offspring of mice perinatally exposed to benzophenone-3 showed early subfertility linked to a poor oocyte stockpile. *Archives of Toxicology*, 98(6). <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03730-5>

Abud, J. E., Pagotto R, **Galliani V.**, Teglia, C., Culzoni, J., Bollati-Fogolin, M., Zenclussen, M. L. & Rodriguez, H. A. (2024). In vitro blastocyst implantation and trophoblast migration are disrupted by the UV filter benzophenone-3 (BP3). *Environmental Pollution*. 123840. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123840>.

Galliani, V., Fessia, J., Santamaría, C. G., Abud, J. E., & Rodríguez, H. A. (2025). Benzophenone-3 (BP3), bisphenol A (BPA), and their combination impair ovarian response to gonadotropin stimulation in a multi-exposure multiparity model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 119, 104821. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104821>

Índice

Agradecimientos	1
Aportes científicos-tecnológicos	2
Abreviaturas	8
Resumen	10
Abstract.....	12
1. Introducción general.....	14
1.1. Salud reproductiva, infertilidad y exposición ambiental a sustancias químicas.....	14
1.2. Disruptores endocrinos	18
1.2.1. ¿Qué son los disruptores endocrinos? Definiciones y criterios.....	20
1.2.2. Actualización del informe sobre el estado de la ciencia en disruptores endocrinos	21
1.2.3. Mecanismos de acción de los disruptores endocrinos.....	22
1.2.4. Conceptos clave en perturbación endocrina	24
1.2.4.1. Efectos a bajas dosis y curvas de dosis-respuesta no monotónicas.....	24
1.2.4.2. Ventanas críticas de susceptibilidad	25
1.2.4.3. El "Efecto Cóctel": exposición a mezclas complejas	27
1.2.4.4. Multiparidad	28
1.2.4.5. Disruptores endocrinos relevantes: benzofenona-3 y bisfenol-A	28
1.2.5. Benzofenona-3	29
1.2.6. Bisfenol-A	31
1.3. Desarrollo ovárico y función reproductiva	32
1.3.1. Ontogenia y determinación sexual de la gónada	32
1.3.2. Histogénesis ovárica, ruptura de nidos y establecimiento de la reserva folicular	33
1.3.3. Foliculogénesis y Ovulación	36
1.4. Esteroides ováricos: estradiol, progesterona y andrógenos.....	37
1.4.1. Estradiol	38
1.4.2. Progesterona.....	39
1.4.3. Andrógenos	39
1.5. El ovario como blanco de acción de los disruptores endocrinos, bisfenol-A y benzofenona-3 en particular	40
2. Objetivos	43
2.1. Objetivos generales.....	43
2.2. Objetivos específicos.....	43

3. Capítulo 1: Disminución de la fertilidad en ratones C57BL/6 expuestos perinatalmente a una dosis diaria de benzofenona-3.....	45
3.1. Introducción	45
3.2. Objetivos	47
3.3. Materiales y métodos	47
3.3.1. Animales.....	47
3.3.2. Diseño experimental.....	48
3.3.3. Evaluación de la fertilidad por cría continua (FACB) de las crías F1	48
3.3.4. Selección de la dosis.....	50
3.3.5. Procedimiento de administración del compuesto	50
3.3.6. Recuento de espermatozoides.....	51
3.3.7. Análisis de la dinámica folicular de hembras F1	52
3.3.8. Diámetro de los folículos primordiales	53
3.3.9. Medición de estradiol, progesterona y testosterona.....	54
3.3.10. Estadística.....	54
3.4. Resultados	55
3.4.1. La exposición a benzofenona-3 no alteró el peso materno ni la duración de la gestación.....	55
3.4.2. La exposición a benzofenona-3 no tuvo efecto sobre el número de crías ni sobre la proporción de sexos en la progenie	56
3.4.3. La ganancia de peso de la progenie F1 durante la lactancia fue alterada transitoriamente por la exposición a benzofenona-3	56
3.4.4. La exposición a benzofenona-3 no alteró el inicio de la pubertad ni el ciclo estral en las hembras F1	57
3.4.5. Benzofenona-3 provocó una disminución del porcentaje de folículos primordiales en los ovarios de hembras F1, sin afectar el número de espermatozoides.....	58
3.4.6. Los niveles hormonales fueron similares entre las hembras F1 de ambos grupos	59
3.4.7. La exposición a benzofenona-3 resultó en una disminución de la fertilidad de la F1	60
3.5. Discusión.....	61
3.6. Conclusiones	65
4. Capítulo 2: Benzofenona-3, bisfenol A y su combinación afectan la respuesta ovárica frente a la estimulación con gonadotrofinas en un modelo de multi-exposición.....	67
4.1. Introducción	67
4.2. Objetivos	68
4.3. Materiales y métodos	69

4.3.1.	Animales.....	69
4.3.2.	Dosis de benzofenona-3 y bisfenol-A.....	69
4.3.3.	Diseño experimental.....	71
4.3.4.	Protocolo de superovulación.....	73
4.3.5.	Conteo de ovocitos ovulados.....	75
4.3.6.	Dinámica folicular.....	75
4.3.7.	Medición de estradiol, progesterona y testosterona.....	76
4.3.8.	PCR en Tiempo Real (qRT-PCR).....	77
4.3.9.	Estadística.....	78
4.4.	Resultados	79
4.4.1.	Parámetros gestacionales maternos.....	79
4.4.1.1.	Benzofenona-3, bisfenol-A o la mezcla incrementan el porcentaje de partos fuera de término en los grupos de la segunda gestación	79
4.4.1.2.	Impacto de benzofenona-3, bisfenol-A y la mezcla sobre el número de crías y la proporción de sexos de crías nacidas.....	81
4.4.2.	Parámetros de la descendencia.....	82
4.4.2.1.	El peso total de las crías es alterado de forma transitoria por benzofenona-3, bisfenol-A y la mezcla	82
4.4.2.2.	Los pesos de los ovarios son similares en todos los grupos	83
4.4.2.3.	Benzofenona-3, bisfenol-A y la mezcla inhiben la tasa de ovulación sólo en las crías de la segunda gestación.....	83
4.4.2.4.	Las poblaciones foliculares están alteradas en F1.P2.....	84
4.4.2.5.	Benzofenona-3 y su mezcla con bisfenol-A modifican los niveles de estradiol y testosterona.....	84
4.4.2.6.	Los niveles de ARNm de enzimas esteroidogénicas y receptores de gonadotrofinas permanecieron inalterados.....	87
4.5.	Discusión.....	87
4.6.	Conclusiones	92
5.	Capítulo 3: Proteómica del ovario prepuberal en un modelo de multiparidad expuesto a benzofenona-3.....	95
5.1.	Introducción	95
5.2.	Objetivos	96
5.3.	Materiales y métodos	96
5.3.1.	Obtención de muestras y diseño experimental	96
5.3.2.	Recolección y preservación de tejido.....	96
5.3.3.	Extracción y solubilización de proteínas totales.....	97
5.3.4.	Cuantificación de proteínas (ensayo de BCA)	97

5.3.5.	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	97
5.3.6.	Tinción de geles con coomassie blue coloidal.	98
5.3.6.1.	Preparación de soluciones	99
5.3.6.2.	Protocolo de tinción	99
5.3.6.3.	Análisis Proteómico por NanoHPLC-MS/MS	99
5.3.6.4.	Tratamiento de las muestras y digestión triptica	100
5.3.6.5.	Configuración del sistema LC-MS/MS (Orbitrap)	100
5.3.7.	Procesamiento de datos y análisis bioinformático integrativo	100
5.4.	Resultados	101
5.4.1.	Análisis proteómico de ovarios F1.P1: alteraciones en la integridad epitelial y activación de vías de señalización compensatorias	101
5.4.2.	Análisis proteómico de ovarios F1.P2: Estrés metabólico y reprogramación epigenética ante la exposición prenatal a BP3	104
5.5.	Discusión.....	107
5.6.	Conclusiones	110
6.	Capítulo 4: Cultivos <i>in vitro</i> 3D de folículos revelan que benzofenona-3, bisfenol-A y su combinación inhiben la ovulación de forma directa a dosis ambientalmente relevantes	113
6.1.	Introducción	113
6.2.	Objetivos	115
6.3.	Materiales y métodos	115
6.3.1.	Animales.....	115
6.3.2.	Selección y preparación de soluciones	116
6.3.3.	Diseño experimental.....	117
6.3.3.1.	Cultivo de folículos en un modelo 2D	117
6.3.3.2.	Cultivo de folículos en un modelo 3D	118
6.3.3.3.	Concentraciones de gonadotrofinas en el cultivo (aplicable a ambos modelos)	119
6.3.4.	Composición de los Medios de Cultivo	120
6.3.4.1.	Medio de mantenimiento (MM).....	120
6.3.4.2.	Medio de crecimiento (GM)	120
6.3.5.	Medición de diámetros foliculares	120
6.3.6.	Cuantificación de estradiol y estrona mediante sistemas UHPLC	121
6.3.6.1.	Sustancias químicas y reactivos	121
6.3.6.2.	Análisis UHPLC-FLD para estradiol y estrona	122
6.3.7.	Análisis de la expresión génica	122
6.3.7.1.	Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	122

6.3.7.2.	PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	122
6.3.7.3.	Normalización de datos y análisis estadístico.....	123
6.3.8.	Estadística.....	124
6.4.	Resultados	124
6.4.1.	Cultivo de folículos 2D vs. cultivo de folículos 3D.....	124
6.4.1.1.	Tasa de ovulación y dinámica de crecimiento folicular en un modelo 2D de rata	124
6.4.1.2.	Tasa de ovulación y dinámica de crecimiento folicular en un modelo 3D de rata	126
6.4.1.3.	Perfil de producción de hormonas esteroides en cultivo 3D de rata	128
6.4.2.	Evaluación del rol del receptor de estrógeno beta en la mediación de los efectos del bisfenol-A	129
6.4.2.1.	Bisfenol-A y PHTPP inhiben la ovulación <i>in vitro</i>	129
6.4.2.2.	Cinética de crecimiento folicular.....	130
6.4.2.3.	Análisis de la expresión génica	131
6.4.2.4.	Perfil de producción de hormonas esteroides en folículos ovulados y no ovulados	132
6.4.3.	Tasa de ovulación y dinámica de crecimiento folicular en un modelo 3D de ratón.	133
6.4.3.1.	Perfil de producción de hormonas esteroides en cultivo 3D de ratón	135
6.5.	Discusión.....	136
6.6.	Conclusiones	141
7.	Conclusiones	143
8.	Bibliografía	145
Anexo I: Análisis proteómico en ovarios de crías expuestas a BP3 prenatalmente (primera gestación).....		164
Anexo II: Análisis proteómico en ovarios de crías expuestas a BP3 prenatalmente (segunda gestación).....		168
Anexo III: Galliani et al., 2024.....		176
Anexo IV: Abud et al., 2024		186
Anexo V: Galliani et al., 2025		194
Anexo VI: Galliani et al., 2026		206

Abreviaturas

ACTB	b-actina
AR	Andrógenos
BP3	Benzofenona-3
BPA	Bisfenol-A
BSA	Albúmina sérica bovina
CGPs	Células germinales primordiales
COC	Complejo cúmulo-ovocito
Cyp11a	Citocromo P450scc
Cyp17a	17a-hidroxilsasa
Cyp19	P450aromatasa
DES	Dietilstilbestrol
DEs	Disruptores endocrinos
dg	Día gestacional
DoHaD	Developmental Origins of Health and Disease
dpn	Día postnatal
Dsp	Desmoplaquina
E1	Estrona
E2	Estradiol
EFSA	European food safety authority
F1	Primera generación
FA	Folículo antral
FACB	Protocolo de cría continua
FAO	β -oxidación
FF	Fluido folicular
FIV	Fertilization <i>in vitro</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHr	Receptor de hormona folículo estimulante
Gn	Gonadotrofinas
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
HK	Housekeeping
kg.pc.d	Kilogramo de peso corporal por día
L19	Proteína ribosomal L19

LH	Hormona leutenizante
LHr	Receptor de hormona leutinizante
M&M	Materiales y métodos
MC	Medio de crecimiento
MDA	Administración guiada por micropipeta
MM	Medio de mantenimiento
MOFs	Formación de ovocitos multiovocitarios
OMS	Organización mundial de la salud
P/H	Picrosirius-hematoxilina
P1	Primera gestación
P2	Segunda gestación
P4	Progesterona
PCP	Productos de cuidado personal
PMSG	Gonadotrofina coriónica equina
PNUMA	Programa de las naciones unidas para el medio ambiente
RCF	Restricción del crecimiento fetal
REs	Receptor de estrógenos
RFA	Recuento de folículos antrales
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa
T	Testosterona
t-TDI	Ingesta diaria tolerable temporal
T1	Tiempo 1 (comienzo del protocolo de superovulación)
T2	Tiempo 2 (48hs post-PMSG)
T3	Tiempo 3 (14hs post-hCG)
TDI	Ingesta diaria tolerable
Top2a	Topoisomerasa II
TRA	Técnicas de reproducción asistida
UE	Unión europea
UNEA	Asamblea de las naciones unidas para el medio ambiente
WHA	Asamblea mundial de la salud
Xeg	Xenoestrógenos

Resumen

La exposición a disruptores endocrinos (DEs), como el filtro UV Benzofenona-3 (BP3) y el Bisfenol A (BPA) es ubicua, ya que se encuentran presentes de consumo masivo como son los productos de uso cotidiano (PCP), representando una amenaza creciente para la salud reproductiva femenina. Esta tesis tuvo como objetivo determinar el impacto de la exposición a dosis relevantes de BP3, BPA y su mezcla en períodos críticos del desarrollo, sobre la capacidad reproductiva a largo plazo. Estudiamos especialmente su impacto sobre el desarrollo y funcionalidad de las células germinales, integrando modelos *in vivo* de exposición prenatal y perinatal, considerando la multiparidad como factor de susceptibilidad diferencial, análisis proteómico y modelos de ovulación *in vitro* por cultivo de folículos aislados.

En primer lugar, se evaluaron los efectos de la exposición dérmica perinatal a BP3 (50 mg/kg/día) en un modelo murino. Si bien no se observaron alteraciones en parámetros gestacionales maternos, el principal hallazgo fue que la aparición temprana de subfertilidad en las hijas de las madres expuestas, evidenciada por un menor número de gestaciones en un protocolo de cría continua (FACB). Esta disminución de la capacidad reproductiva se asoció con una reducción significativa de la reserva ovárica, caracterizada por un menor número de ovocitos totales y folículos primordiales.

En una segunda instancia, se investigó el efecto de una exposición prenatal en un modelo de multiparidad y multiexposición (BP3, BPA a dosis bajas y su mezcla) sobre la respuesta ovulatoria. Demostramos que BP3 y BPA inhiben la ovulación en respuesta a gonadotrofinas específicamente en la descendencia de la segunda gestación (F1.P2), sin afectar la capacidad del ovario en la primera camada (F1.P1). Mediante análisis proteómico, determinamos que los ovarios de las crías de F1.P2 sufren un colapso metabólico severo, caracterizado por fallas en la β -oxidación mitocondrial y la proteostasis, lo que explicaría su incapacidad energética para responder al estímulo ovulatorio.

Finalmente, mediante el desarrollo de sistemas de cultivo de folículos aislados 3D, mostramos que BP3 y BPA inhiben la ovulación de forma directa a concentraciones relevantes para la exposición humana (similares a las del fluido folicular). Este efecto se vinculó a un menor crecimiento folicular en respuesta a la acción de FSH, mediadas probablemente por la interferencia con el receptor de estrógenos beta ($RE\beta$).

En conclusión, en esta tesis demostramos que la exposición a BP3 y BPA compromete la fertilidad femenina a través de múltiples mecanismos: el agotamiento

de la reserva ovárica, la alteración directa del crecimiento folicular y la inducción de estrés metabólico ovárico exacerbado por la historia reproductiva materna.

Abstract

Exposure to endocrine disruptors (EDCs), such as the UV filter Benzophenone-3 (BP3) and Bisphenol A (BPA), is ubiquitous as they are present in mass consumption products such as personal care products (PCPs), representing a growing threat to female reproductive health. This thesis aimed to determine the impact of exposure to relevant doses of BP3, BPA, and their mixture during critical periods of development on long-term reproductive capacity. We specifically studied their impact on the development and functionality of germ cells, integrating in vivo prenatal and perinatal exposure models, considering multiparity as a differential susceptibility factor, proteomic analysis, and in vitro ovulation models using isolated follicle cultures.

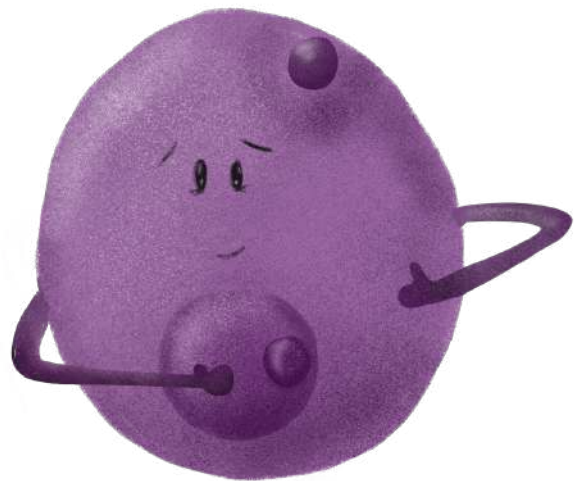
First, the effects of perinatal dermal exposure to BP3 (50 mg/kg/day) were evaluated in a murine model. Although no alterations were observed in maternal gestational parameters, the main finding was the early onset of subfertility in the offspring of exposed mothers, evidenced by a lower number of pregnancies in a continuous breeding protocol (FACB). This decrease in reproductive capacity was associated with a significant reduction in the ovarian reserve, characterized by a lower number of total oocytes and primordial follicles.

In a second stage, the effect of prenatal exposure in a model of multiparity and multi-exposure (low-dose BP3, BPA, and their mixture) on the ovulatory response was investigated. We demonstrated that BP3 and BPA inhibit ovulation in response to gonadotropins specifically in the offspring of the second gestation (F1.P2), without affecting the ovarian capacity in the first litter (F1.P1). Through proteomic analysis, we determined that the ovaries of F1.P2 offspring undergo severe metabolic collapse, characterized by failures in mitochondrial β -oxidation and proteostasis, which would explain their energetic inability to respond to the ovulatory stimulus.

Finally, through the development of 3D isolated follicle culture systems, we showed that BP3 and BPA inhibit ovulation directly at concentrations relevant to human exposure (similar to those in follicular fluid). This effect was linked to lower follicular growth in response to FSH action, likely mediated by interference with estrogen receptor beta (ER β).

In conclusion, in this thesis, we demonstrate that exposure to BP3 and BPA compromises female fertility through multiple mechanisms: the depletion of the ovarian reserve, the direct alteration of follicular growth, and the induction of ovarian metabolic stress exacerbated by the maternal reproductive history.

Introducción general



Valde

1. Introducción general

1.1. Salud reproductiva, infertilidad y exposición ambiental a sustancias químicas

La salud reproductiva constituye un pilar fundamental del bienestar humano y poblacional (Bhattacharjee et al., 2024; Diamanti-Kandarakis et al., 2009). En las últimas décadas, Argentina ha mostrado una disminución sostenida en la tasa general de fecundidad y la tasa de natalidad (Dirección Nacional de Población, 2021) (**Figura 1**).

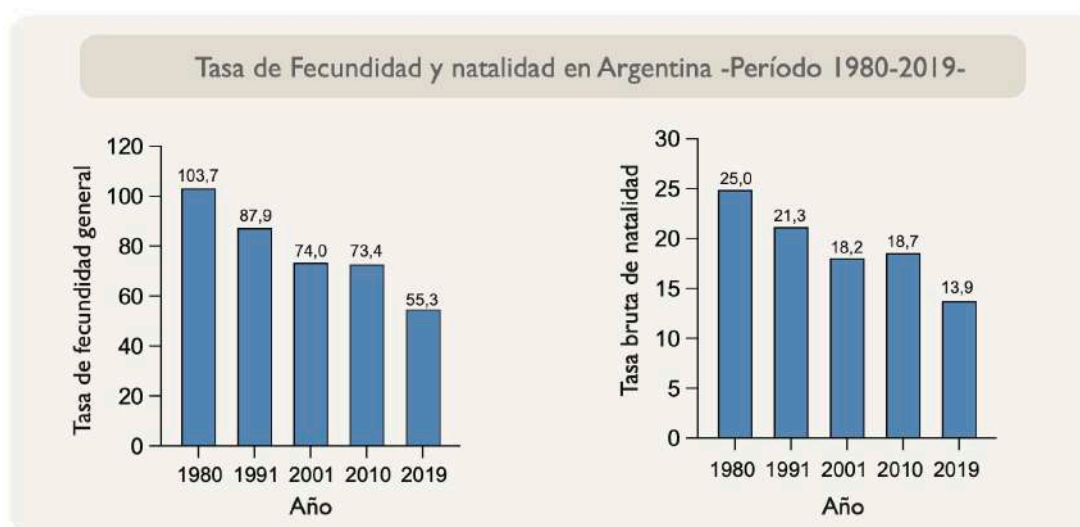


Figura 1: Tasa natalidad y fecundidad. Tasa bruta de natalidad en Argentina (1980–2019). Tasa global de fecundidad en Argentina (1980–2019). Modificado de Dirección Nacional de Población, 2021. (https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/09/natalidad_y_fecundidad_en_argentina.1980_a_2019.dnp_resumen_ejecutivo_nacional_final.pdf)

Si bien este fenómeno es multicausal y está estrechamente vinculado a cambios sociodemográficos y decisiones personales, estos patrones ocurren en un contexto de creciente preocupación por la salud reproductiva (Gore et al., 2015; Organización mundial de la Salud, 2023). En este sentido, es preciso distinguir entre la decisión de no tener hijos y la infertilidad, definida como la incapacidad de lograr un embarazo tras 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección. El reciente informe de la Organización Mundial de la Salud (Organización mundial de la Salud, 2023) revela que la infertilidad afecta aproximadamente a 1 de cada 6 personas (17.5% de la población adulta) a nivel mundial (**Figura 2**).

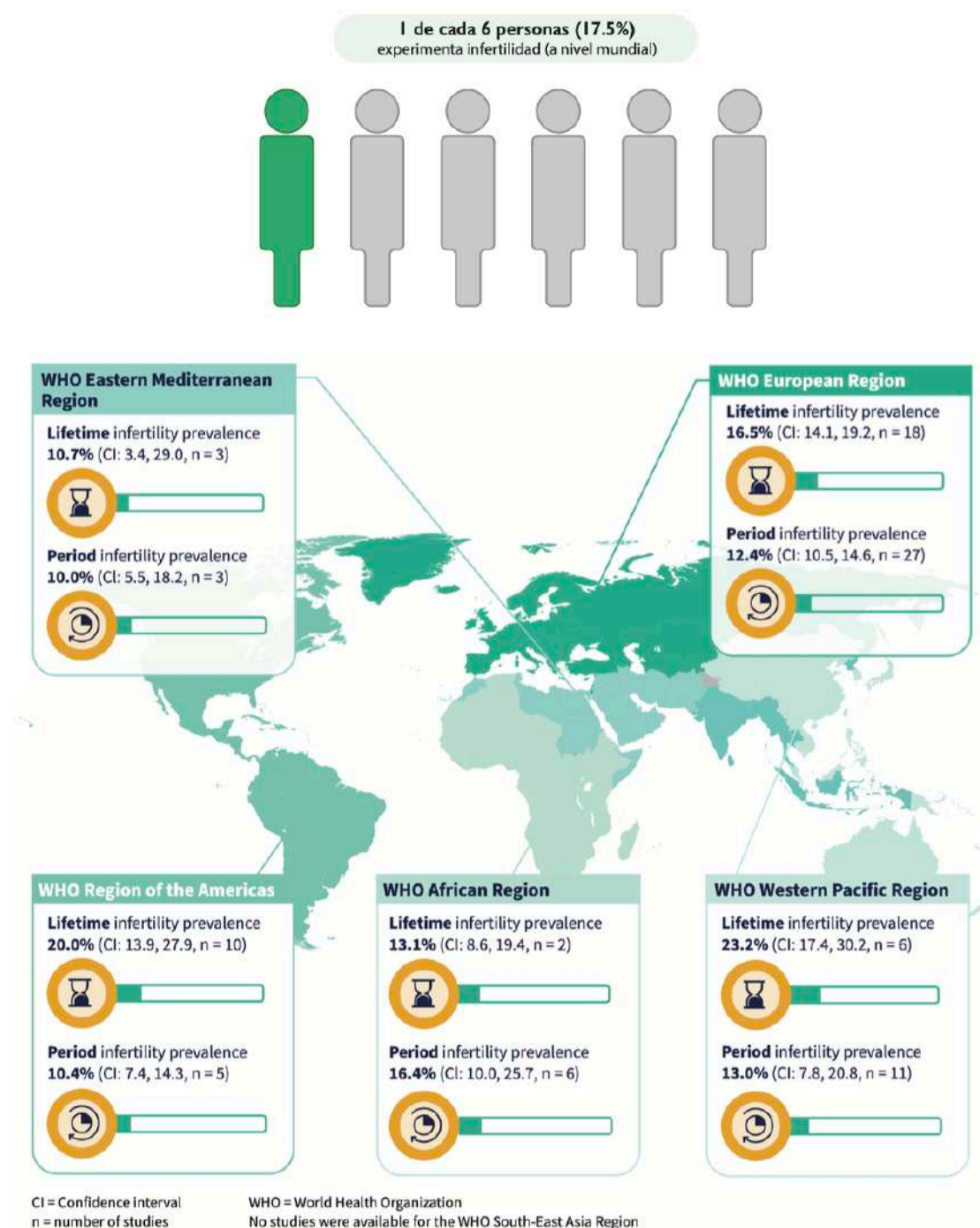


Figura 2: Prevalencia de infertilidad de por vida por regiones de la OMS. La infertilidad se define clínicamente como la incapacidad de lograr un embarazo tras 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección. El gráfico muestra que la infertilidad afecta aproximadamente al 17.5% de la población adulta a nivel mundial, lo que representa a 1 de cada 6 personas. Se observa una prevalencia del 17.5% en la región de las Américas y un máximo del 23.2% en el Pacífico Occidental, evidenciando que este es un desafío de salud pública global independiente del nivel de ingresos de los países. Modificado de *Infertility prevalence estimates, 1990–2021* (OMS, 2023).

Un cuerpo de evidencia científica creciente indica que la fecundabilidad biológica está siendo comprometida por factores ambientales (Inman & Flaws, 2024). En este sentido, el enfoque DOHaD (*Developmental Origins of Health and Disease*),

también conocido como modelo de programación del desarrollo, aporta un marco conceptual el cual postula que las exposiciones ambientales durante períodos críticos del desarrollo temprano (incluyendo la gestación y la vida perinatal) generan una programación pre y perinatal o “imprinting”. Este fenómeno es determinante para inducir cambios persistentes en la estructura y función de los sistemas fisiológicos, condicionando la aparición de patologías y enfermedades en la vida adulta postnatal. Este marco conceptual DOHaD surge de las observaciones de Barker en los años '80, quienes encontraron que el crecimiento fetal adverso se correlaciona con enfermedades metabólicas cardiovasculares en la adultez. Estos estudios demostraron que la desnutrición intrauterina predispone al individuo a alteraciones permanentes en su fisiología (por ejemplo, alterando la relación glucosa–insulina) y aumenta el riesgo de enfermedades crónicas laterales (Wadhwa et al., 2009). En otras palabras, el concepto DOHaD postula que el ambiente prenatal (nutrición, toxinas, estrés, etc.) “reprograma” de modo adaptativo los sistemas biológicos del feto, moldeando su metabolismo, su función hormonal y la estructura de órganos para toda la vida (Wadhwa et al., 2009).

Este enfoque ha evolucionado, ampliando su perspectiva: no sólo el período fetal sino también la infancia temprana (e incluso desde el ovocito) pueden tener “efectos de programación” duraderos. En entornos desfavorables, el feto puede adoptar respuestas adaptativas que pueden resultar desventajosas si el ambiente postnatal difiere, generando un desajuste entre la programación prenatal y las condiciones posteriores. Los mecanismos subyacentes incluyen modificaciones epigenéticas, alteraciones en ejes endocrinos y cambios estructurales en tejidos en desarrollo (Wadhwa et al., 2009).

En el contexto reproductivo, el enfoque DOHaD ha sido aplicado para entender cómo las exposiciones gestacionales afectan el sistema reproductor femenino. Muchos estudios más recientes muestran que condiciones adversas en útero (nutrición materna deficiente o excesiva, estrés, drogas o disruptores endocrinos) provocan cambios permanentes en el eje hipotálamo–hipófiso–ovárico y en la arquitectura ovárica (**Figura 3**) (Yao et al., 2021). Tales reprogramaciones se traducen en alteraciones de la pubertad, la reserva ovárica y la fecundidad de la descendencia, e incluso pueden afectar la salud de la siguiente generación a través del ovocito (Yao et al., 2021). Estos conceptos fundamentales, respaldan que la historia de exposiciones tempranas debe considerarse al analizar la función ovárica y las consecuencias reproductivas en la vida adulta (Wadhwa et al., 2009; Yao et al., 2021).

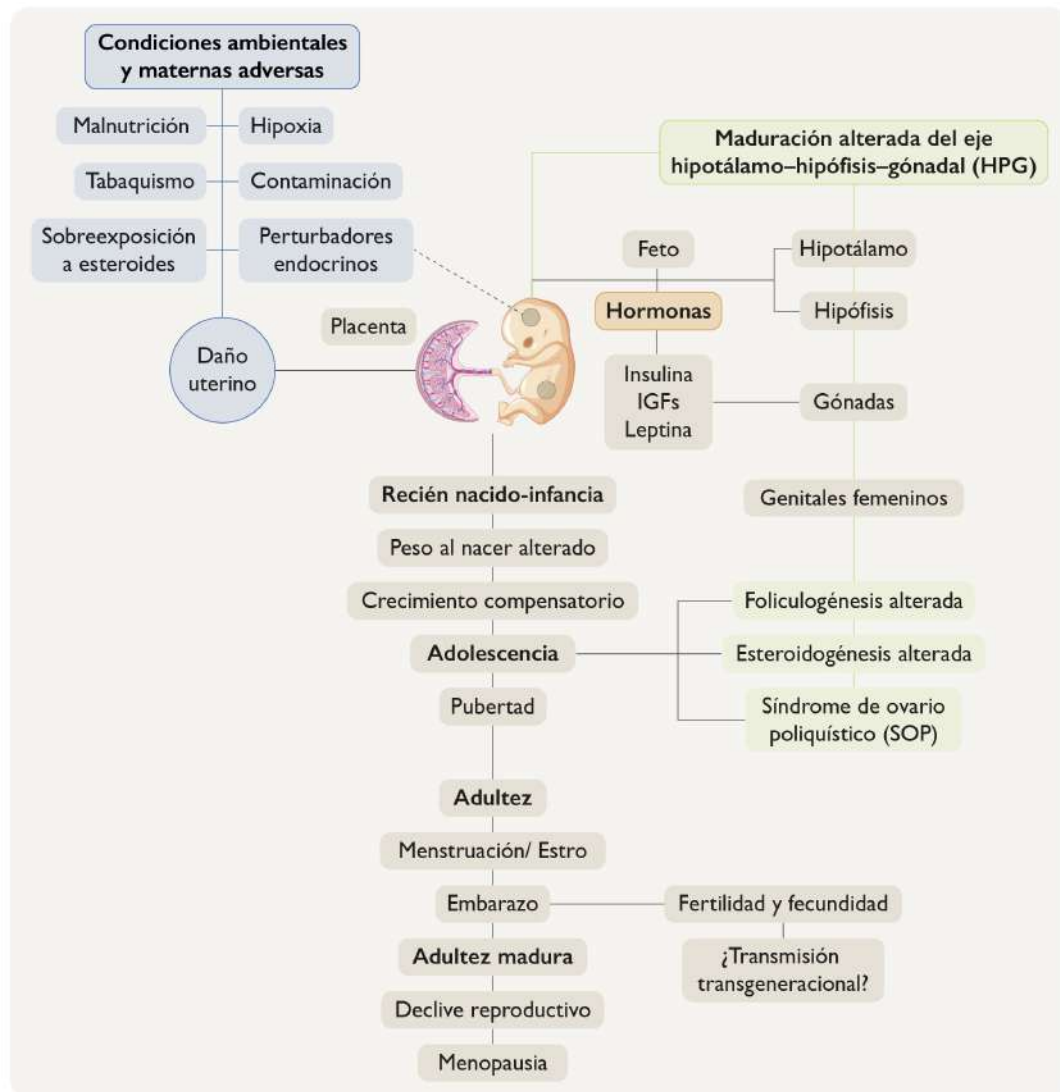


Figura 3: Las condiciones ambientales durante la gestación pueden afectar de manera adversa el fenotipo reproductivo de la descendencia femenina, con consecuencias para la fertilidad y la capacidad reproductiva futura. Estos cambios estarían mediados por alteraciones programadas en la estructura, maduración y función de los tejidos reproductivos y del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HPG). Las alteraciones reproductivas pueden depender o no de cambios en el peso al nacer y pueden ser secundarias a modificaciones en la placenta durante la gestación, así como a alteraciones programadas en la tasa de crecimiento posnatal de la descendencia y/o en la producción de hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), insulina, leptina y factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs). La programación reproductiva puede manifestarse como cambios en el momento de inicio de la pubertad y de la menopausia o del declive reproductivo, alteraciones del ciclo menstrual o estral, ovarios poliquísticos y un mayor riesgo de cánceres de tejidos reproductivos. Estas disfunciones reproductivas pueden afectar la fertilidad y la fecundidad de la descendencia femenina y generar impactos negativos en la segunda generación. Modificado de Yao et al., 2021.

Entre estos factores del ambiente, uno de los más importantes reside en la exposición a los disruptores endocrinos (DEs), es importante destacar que estas sustancias químicas no solo son capaces de interferir con el sistema hormonal a concentraciones generalmente bajas (Bergman et al., 2013), sino que en realidad no presentan una relación dosis-efecto lineal clásica, sino una relación de tipo curva no monótona, donde dosis bajas pueden generar efectos que no se observan a dosis

altas (Vandenberg et al., 2012). La ubicuidad de estos compuestos en productos de consumo masivo hace que la exposición sea casi inevitable (Völkel et al., 2002). Por ejemplo, se ha observado que la exposición a un filtro solar ampliamente utilizado en la formulación de protectores solares, Benzofenona-3 (BP3) u oxibenzona, se tradujo en la presencia de BP3 en la orina del 96.8% de la población estadounidense (Calafat et al., 2008), y que puede afectar negativamente el recuento de folículos antrales (FA) en mujeres jóvenes, lo que evidencia un impacto directo sobre la reserva ovárica que trasciende las decisiones personales sobre la maternidad (Silva, 2020).

Esta problemática se vuelve crítica cuando las parejas recurren a las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). La evidencia actual demuestra que los DEs no solo dificultan la concepción natural, sino que también actúan como una barrera en el éxito de la Fecundación In Vitro (FIV). Investigaciones en clínicas de fertilidad han informado que niveles elevados de contaminantes ambientales, incluyendo muchos categorizados como DEs, se asocian con una menor respuesta a la estimulación ovárica y una reducción en la probabilidad de nacidos vivos (Tzouma et al., 2025).

Este escenario, en el cual la capacidad reproductiva biológica se ve comprometida por agentes externos incluso frente a la intervención médica, resalta la necesidad de profundizar en el estudio de los DEs como factores determinantes en la salud pública actual. En el siguiente apartado, se abordarán los criterios científicos y regulatorios internacionales que permiten identificar y clasificar a un compuesto como un PE.

1.2. Disruptores endocrinos

En las últimas décadas, el interés por las sustancias capaces de interferir con el sistema endocrino ha crecido de manera acelerada, en paralelo al drástico aumento en la producción, uso y persistencia ambiental de miles de compuestos químicos de origen industrial, doméstico y agrícola. Estos compuestos, que pueden ser tanto de origen natural como sintético, representan actualmente uno de los desafíos más importantes para la salud ambiental y reproductiva debido a su ubicuidad y potencial de bioacumulación (Bergman et al., 2013; Organización mundial de la Salud, 2023).

La preocupación científica se fundamenta en un punto central: el sistema endocrino opera mediante señales hormonales de muy baja concentración, y pequeñas interferencias en su acción pueden generar efectos desproporcionados sobre el desarrollo, la maduración sexual, la fertilidad y la homeostasis metabólica. A diferencia de los tóxicos clásicos, los DEs pueden actuar a dosis bajas "secuestrando" la maquinaria celular destinada a las hormonas endógenas (Darbre, 2022). Asimismo,

la exposición de las poblaciones es elevada debido a que muchos de estos compuestos forman parte de productos de uso masivo, persisten en el medio ambiente y se bioacumulan a través de las redes alimentarias. En mamíferos, debido a sus características lipofílicas que les permiten atravesar las membranas plasmáticas libremente, muchos poseen la capacidad de ser transferidos al feto en desarrollo a través de la placenta o al recién nacido mediante la leche materna, lo que permite una exposición continua durante las etapas más vulnerables de la vida (Santamaria et al., 2020; Völkel et al., 2002).

Dentro de la amplia diversidad de DEs, un porcentaje significativo se clasifica como estrógenos ambientales o xenoestrógenos (XEg). Estos compuestos se caracterizan por su capacidad de unirse a los receptores de estrógenos (REs) y desencadenar respuestas agonistas o antagonistas que alteran la vía de acción estrogénica natural. Se ha determinado que la exposición a XEg se asocia con diversas patologías como cáncer de mama y testículo, subfertilidad, infertilidad y bajo recuento espermático (Gachowska et al., 2024; Skakkebaek et al., 2016). En este sentido, es importante destacar que la infertilidad por exposición a DEs, y en particular a los filtros solares como BP3, también puede deberse a alteraciones directas sobre el sistema reproductor masculino (Li et al., 2024). Asimismo, cabe mencionar que, más allá de los mecanismos periféricos a nivel gonadal, las fallas en la fertilidad pueden producirse por cambios a nivel neuroendocrino, afectando la regulación central del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Stoker et al., 2020; Yao et al., 2021). En la hembra, se ha demostrado que la exposición a compuestos como bisfenoles, ftalatos, pesticidas y filtros UV (incluido BP3) puede asociarse con alteraciones ováricas profundas, incluyendo la reducción de la reserva folicular, la desregulación de la esteroidogénesis y fallos en la ovulación (Bergman et al., 2013; Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Debido al incremento observado a nivel mundial en la incidencia de patologías reproductivas de etiología endocrina, la hipótesis general en este campo sostiene que dicha tendencia está causada, al menos en parte, por la creciente exposición a los DEs presentes en el entorno (Organización mundial de la Salud, 2012). Muchos de estos defectos reproductivos podrían ser el resultado de alteraciones producidas durante períodos organizacionales críticos de alta sensibilidad, tanto en la vida fetal como postnatal temprana, donde la presencia de estas sustancias altera la programación normal de los tejidos y órganos (Bergman et al., 2013; Yesildemir & Celik, 2024).

1.2.1. ¿Qué son las disruptores endocrinos? Definiciones y criterios

La comunidad científica y regulatoria ha establecido criterios específicos para definir a las sustancias DEs donde la definición más citada, adoptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), es la siguiente: Una Sustancia disruptora edocrina es "una sustancia o mezcla exógena que altera la(s) función(es) del sistema endocrino y, consecuentemente, causa efectos adversos para la salud en un organismo intacto, su descendencia o subpoblaciones" (Bergman et al., 2013). Es fundamental destacar que esta definición hace una distinción técnica crítica respecto a un "disruptor endocrino potencial", el cual se define como una sustancia exógena que posee propiedades que *podrían* llevar a la disrupción endocrina, pero cuyo efecto adverso consecuente aún no ha sido demostrado concluyentemente en un organismo intacto (Bergman et al., 2013).

Para que un compuesto sea clasificado formalmente como un PE, debe demostrarse la presencia de tres elementos interconectados (**Figura 4**) (Bergman et al., 2013; Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

1. Causa: Existencia de una sustancia química exógena.

2. Mecanismo: La sustancia debe tener la capacidad de interferir con la función hormonal. Esto no se limita únicamente a la interacción con receptores, sino que puede implicar la alteración de la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales del cuerpo.

3. Efecto: Debe existir evidencia de efectos adversos para la salud. En el contexto toxicológico, un efecto adverso se define como un cambio en la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo o vida útil de un organismo que resulta en un deterioro de la capacidad funcional para compensar estrés adicional o un aumento en la susceptibilidad a otras influencias ambientales.

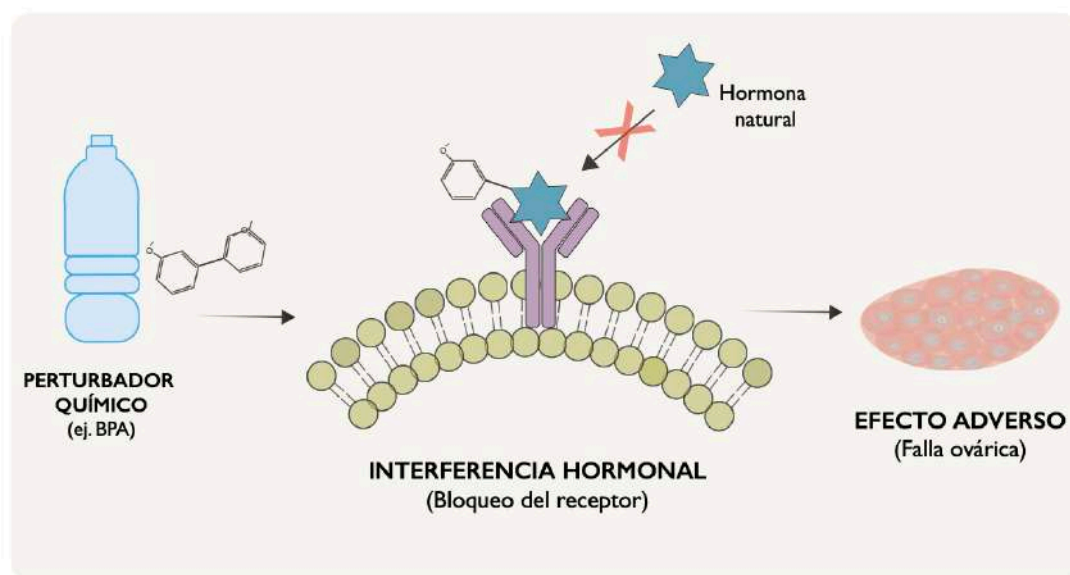


Figura 4: Representación esquemática del mecanismo de acción de un disruptor endocrino (PE). El diagrama ilustra la secuencia causal requerida para definir un compuesto como PE. A la izquierda, la exposición a una sustancia química exógena (ejemplificada por el Bisfenol A, un plastificante común). En el centro, se detalla el mecanismo de interferencia hormonal: debido a su similitud estructural con las hormonas endógenas, el disruptor se une al receptor celular y lo bloquea (actuando como antagonista), lo que impide la unión de la hormona natural y la consecuente señalización fisiológica. A la derecha, esta alteración molecular sostenida conduce a un efecto adverso a nivel tisular, representado aquí por una falla en la morfología y funcionalidad ovárica. Este flujo ejemplifica los criterios de la OMS/PNUMA (2012) para la identificación de DEs.

1.2.2. Actualización del informe sobre el estado de la ciencia en disruptores endocrinos

Si bien las definiciones dadas por OMS/PNUMA siguen siendo el consenso científico internacional, recientemente la Asamblea de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEA) solicitó al Director Ejecutivo del PNUMA, que en cooperación con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se procediera a actualizar el informe [2012 State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals \(Resolution 5/7\)](#). De manera similar, en su 76.ª sesión, la Asamblea Mundial de la Salud (WHA) adoptó la resolución WHA76.17, solicitando al Director General que trabajara conjuntamente con el PNUMA para actualizar dicho informe. En respuesta a estas solicitudes, PNUMA y OMS están colaborando en el desarrollo de la versión actualizada del informe sobre el estado del conocimiento científico en materia de disruptores endocrinos.

Entre otras acciones, se ha establecido un Grupo de Expertos del PNUMA y la OMS con el objetivo de orientar y respaldar el trabajo. Asimismo, se conformó un equipo de autores líderes para guiar el desarrollo de los distintos capítulos. Los avances en la actualización del informe fueron presentados ante la UNEA-7 ([document UNEP/EA.7/INF/7](#)). Se espera que el informe esté disponible antes de la primera sesión de la Conferencia Internacional del Marco Global sobre Sustancias

Químicas (Ginebra, noviembre de 2026), según lo solicitado por la UNEA en su séptima sesión ([Resolution 7/8](#)). La publicación del informe tiene, entre otros objetivos, respaldar los debates de política global, incluyendo la consideración de los disruptores endocrinos como una cuestión de interés global.

1.2.3. Mecanismos de acción de los disruptores endocrinos

Los muestran una diversidad de mecanismos moleculares a través de los cuales logran interferir con la homeostasis hormonal (Bergman et al., 2013). La disrupción endocrina no responde a un único modo de acción, sino que abarca una amplia gama de interferencias que pueden ocurrir en distintas etapas de la señalización hormonal: desde la síntesis y el transporte, hasta la unión al receptor y la posterior respuesta celular (Bergman et al., 2013; Gore et al., 2015). Recientemente, la comunidad científica ha alcanzado un consenso que identifica diez características clave que describen las formas en que los compuestos químicos pueden interactuar con el sistema endocrino y alterarlo (La Merrill et al., 2020).

Como se ilustra en la **Figura 5**, la interferencia de los trasciende la visión clásica centrada únicamente en el receptor, abarcando procesos sistémicos que incluyen:

- Interacción directa con receptores (**Figura 5**, representación 1 y 2): los pueden actuar como ligandos agonistas, mimetizando la acción de las hormonas endógenas y activando respuestas celulares inapropiadas, o como antagonistas, ocupando el sitio de unión del receptor sin activarlo, lo que impide físicamente que las hormonas naturales ejerzan su función biológica (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; La Merrill et al., 2020).
- Alteración de la expresión y transducción (**Figura 5**, representación 3 y 4): estas sustancias tienen la capacidad de modificar la síntesis y expresión de los receptores hormonales, además de interferir en las vías de señalización intracelular y la transducción de señales posteriores a la unión del ligando (La Merrill et al., 2020).
- Modificaciones epigenéticas (**Figura 5**, representación 5): un mecanismo crítico es la inducción de alteraciones en el patrón de metilación del ADN o modificaciones de histonas, generando un *imprinting* epigenético lo que puede "programar" cambios en la expresión génica a largo plazo que se manifiestan en la vida adulta o incluso persisten a través de generaciones (La Merrill et al., 2020; Yesildemir & Celik, 2024).

- Interferencia en el metabolismo hormonal (**Figura 5**, representación 6, 7, 8 y 9): los pueden alterar la síntesis de hormonas, afectando la actividad de enzimas clave como la aromatasa, e interferir en el transporte de hormonas a través de membranas celulares, su distribución sistémica y las tasas de aclaramiento o eliminación metabólica (Gore et al., 2015; La Merrill et al., 2020).
- Destino y viabilidad celular (**Figura 5**, representación 10): la exposición a estos contaminantes puede alterar procesos fundamentales del ciclo de vida celular, incluyendo impactos directos sobre la proliferación, la diferenciación y la inducción de procesos de apoptosis, todos ellos críticos para la funcionalidad y la reserva del órgano ovárico (Inman & Flaws, 2024; La Merrill et al., 2020).

Es importante destacar que la complejidad de los radica en que su acción no es necesariamente a través de un mecanismo; un mismo compuesto puede exhibir múltiples características clave de forma simultánea o actuar de manera tejido-específica dependiendo del contexto biológico y de los coreguladores presentes (La Merrill et al., 2020; Peña-Fernández et al., 2022).

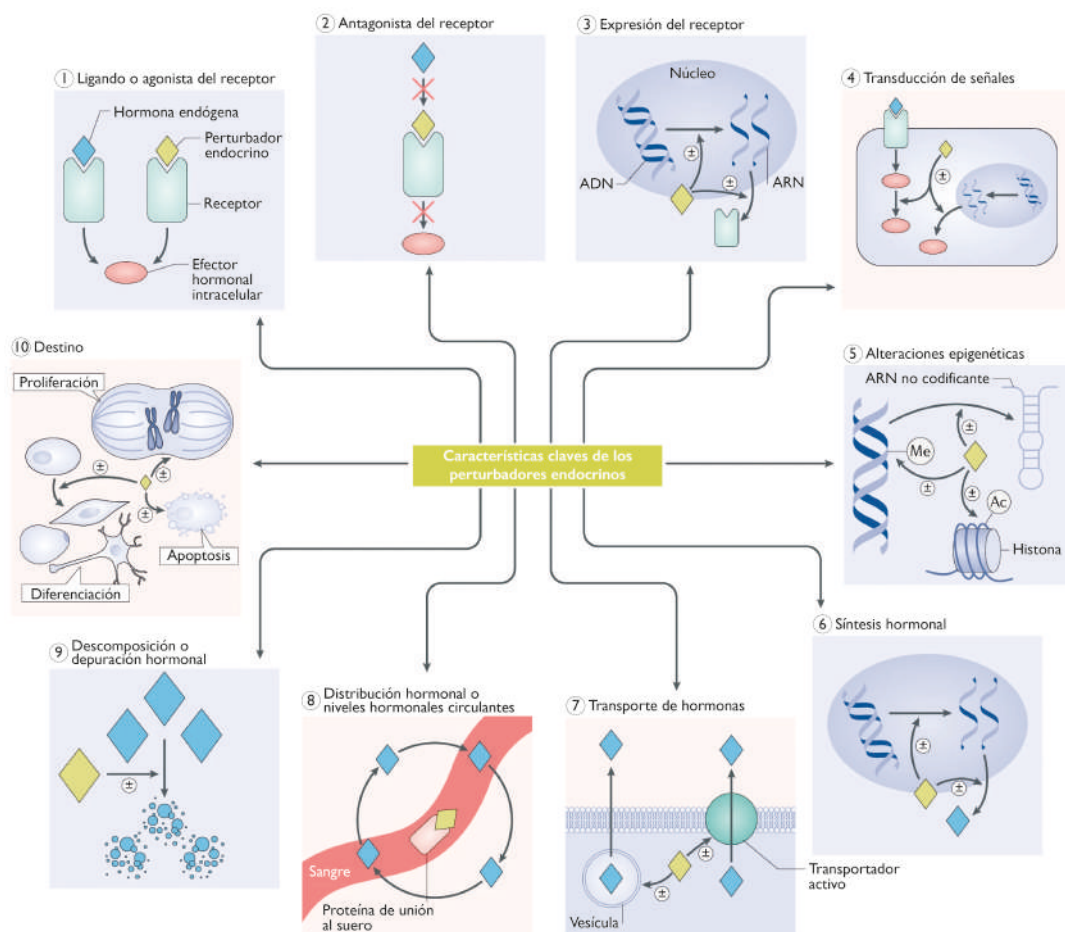


Figura 5: Las diez características clave de las sustancias disruptoras endocrinas (). El esquema resume los mecanismos biológicos mediante los cuales los DES pueden interferir con el sistema endocrino: 1) interacción con receptores (agonismo/antagonismo); 2) alteración de la expresión de receptores; 3) interferencia en la transducción de señales; 4) inducción de cambios epigenéticos; 5) alteración de la

síntesis hormonal; 6) interferencia en el transporte de hormonas; 7) cambios en la distribución y niveles circulantes; 8) alteración del metabolismo o aclaramiento hormonal; y 9) modificación del destino celular (proliferación, diferenciación y apoptosis). Estos mecanismos reflejan la naturaleza sistémica de la disrupción endocrina, permitiendo que un mismo compuesto afecte múltiples vías de señalización de manera simultánea. Modificado de La Merrill et al., (2020).

1.2.4. Conceptos clave en perturbación endocrina

Basándonos en la biología de los sistemas hormonales, es fundamental comprender diferentes conceptos que se desarrollarán a continuación.

1.2.4.1. Efectos a bajas dosis y curvas de dosis-respuesta no monotónicas

El estudio de los DEs desafía el dogma toxicológico clásico de que "la dosis hace al veneno" (Paracelsus). Los DEs suelen presentar curvas de dosis-respuesta no monotónicas (**Figura 6**) donde dosis bajas pueden generar efectos que no se observan a dosis altas (Vandenberg et al., 2012). Este fenómeno es biológicamente plausible debido a mecanismos como la saturación de receptores, la desensibilización (*down-regulation*) de los mismos ante concentraciones crecientes, o la superposición de múltiples mecanismos de acción que operan a distintas concentraciones (por ejemplo, proliferación celular a dosis baja versus citotoxicidad a dosis alta) (Darbre, 2022). Esto justifica la relevancia de estudiar dosis ambientalmente relevantes en lugar de extrapolar desde dosis tóxicas altas.

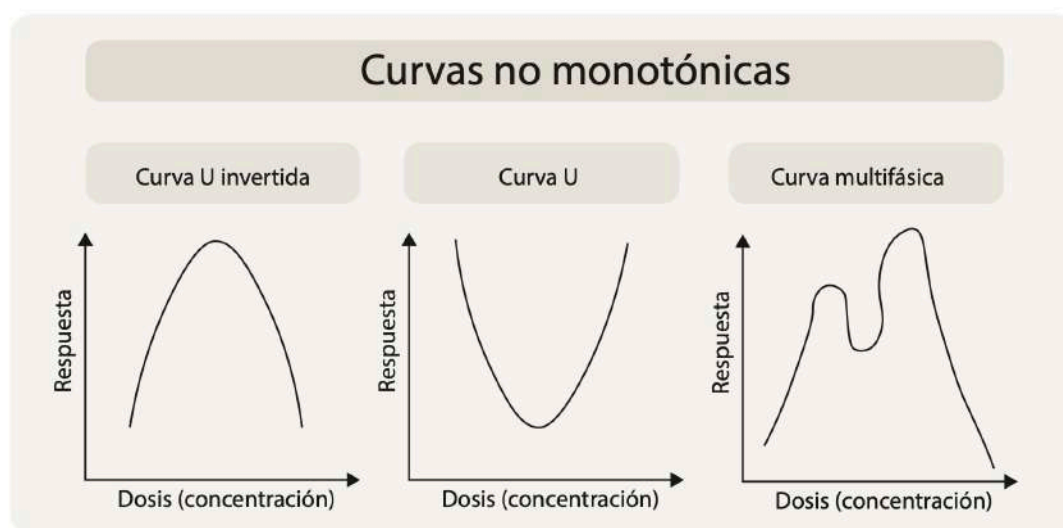


Figura 6: Tipos de curvas de dosis-respuesta no monotónicas. Representación esquemática de tres patrones característicos de respuesta no lineal: (A) Curva en forma de U-invertida, (B) Curva en forma de U y (C) Curva multifásica. Estos perfiles se definen como NMDRCs debido a que la pendiente de la curva cambia de signo una o más veces dentro del rango de dosis evaluadas. Esta dinámica biológica pone de manifiesto que el efecto observado en un punto determinado no permite realizar suposiciones o extrapolaciones sobre los efectos de otras dosis, subrayando la imprevisibilidad de los disruptores endocrinos bajo los modelos de evaluación toxicológica tradicionales. Fuente: basada en Vandenberg et al. (2012).

1.2.4.2. Ventanas críticas de susceptibilidad

La sensibilidad a los DEs no es uniforme, sino que depende críticamente del momento de la exposición. En general, la sensibilidad a la disrupción endocrina es máxima durante períodos de desarrollo tisular, donde las dosis necesarias para inducir efectos adversos son mucho menores que las requeridas en el adulto. Como vimos al describir los conceptos del marco teórico conocido como DOHaD, durante estas ventanas de elevada plasticidad, las interferencias químicas pueden alterar la programación del desarrollo, induciendo cambios permanentes en la estructura y función de los órganos que predisponen a enfermedades en la vida adulta (Bergman et al., 2013; Peña-Fernández et al., 2022) Estas ventanas abarcan distintos procesos comunes a varias especies (**Figura 7**).

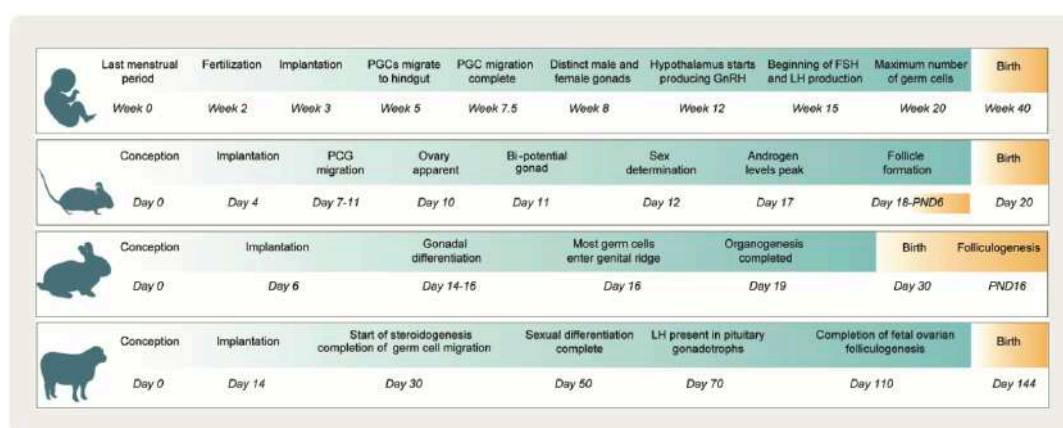


Figura 7: Comparación temporal de las etapas críticas del desarrollo intrauterino del sistema reproductor femenino en distintas especies. Humanos, expresado en semanas (W); ratón, conejo y oveja, expresado en días (D). Los distintos puntos temporales del desarrollo reproductivo, tales como la migración de las células germinales primordiales (PGC), el desarrollo gonadal y la foliculogénesis, evidencian la existencia de ventanas de vulnerabilidad frente a factores externos. Dichos factores pueden reprogramar distintos procesos en el sistema reproductivo en función del momento y la duración de la exposición. Modificado de Yao et al., 2020.

Dichos factores pueden reprogramar distintos procesos en el sistema reproductivo en función del momento y la duración de la exposición. Modificado de Yao et al., 2020.

En roedores, de particular interés son algunos períodos o ventanas de exposición importantes para evaluar el impacto de los DEs sobre la fertilidad y la reserva germinal (Peña-Fernández et al., 2022):

- a) **Período prenatal: implantación y organogénesis temprana:** Esta ventana abarca hitos críticos del desarrollo temprano que son altamente sensibles a la disrupción endocrina (**Figura 8**). Entre ellos se destacan la implantación embrionaria (dg 4,5–5), el inicio de la remodelación de las arterias espiraladas (dg 6–10), fundamental para establecer la comunicación materno-fetal y la salud de la

placenta, y la especificación y migración de las células germinales primordiales (CGPs) (dg 7,25–10) (Charalambous et al., 2012; Richardson & Lehmann, 2010; Rusidzé et al., 2023).

Dado que estos procesos sientan las bases de la arquitectura tisular y la dotación germinal, cualquier interferencia química en este período puede tener consecuencias a largo plazo en la función reproductiva. El impacto de esta exposición puede evaluarse, por ejemplo, en la etapa prepuberal de la descendencia mediante protocolos de superovulación para cuantificar la capacidad de respuesta del ovario, la dinámica folicular y los niveles hormonales (estradiol (E_2), progesterona (P_4) y testosterona (T)) (Santamaría et al., 2017).

- b) Período postnatal: ensamblaje folicular y lactancia (Figura 8):** A diferencia de la gametogénesis masculina, el desarrollo de los folículos ováricos y el establecimiento de la reserva germinal definitiva ocurren exclusivamente en la vida fetal y neonatal temprana; una vez formada, esta reserva es finita y no se regenera (Sadler, 2023).

En este período los hitos biológicos claves incluyen:

Ruptura de nidos y ensamblaje folicular: Entre el final de la gestación y los primeros días postnatales, los nidos ovígeros (cúmulos de ovocitos interconectados) deben romperse para que cada ovocito sea rodeado por células pre-granulosas, formando los folículos primordiales (Pepling, 2012). La literatura indica que la exposición a DEs interfiere con esta transición, inhibiendo la ruptura de los nidos y predisponiendo a la formación de folículos multioocitarios (MOFs) y a un agotamiento acelerado de la reserva o falla ovárica prematura (Santamaría, 2016).

Lactancia como vía de bio-transferencia: La inclusión de la lactancia, hasta el día postnatal 21 (destete), se justifica por la naturaleza lipofílica de muchos DEs y de los compuestos estudiados en esta tesis (BP3 y BPA). Estos químicos tienden a bioacumularse en el tejido adiposo materno y son movilizados preferencialmente hacia la leche materna durante la lactancia (Vandenberg et al., 2012). Por lo tanto, esta ventana permite capturar una exposición continua y sistémica del neonato, quien recibe una carga química significativa en un período donde sus sistemas de detoxificación aún son inmaduros.

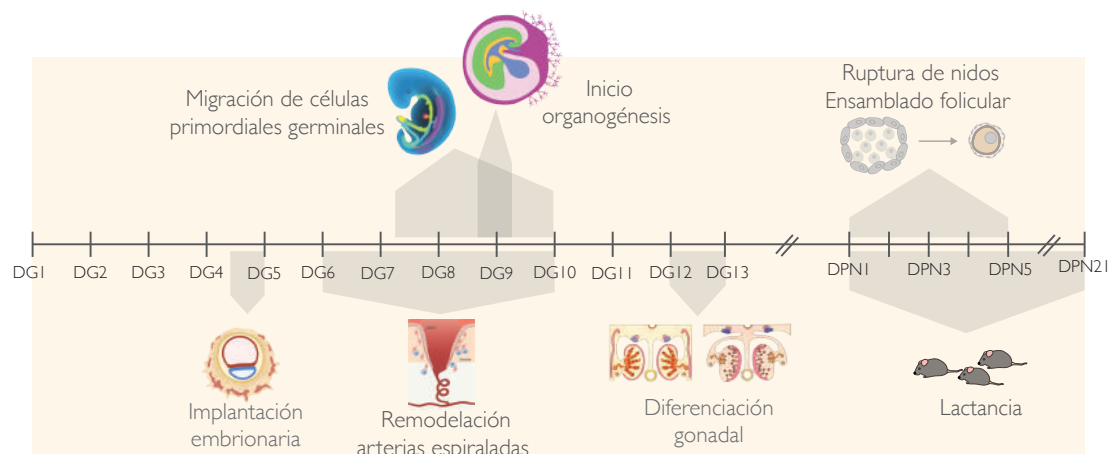


Figura 8: Cronograma del desarrollo reproductivo y ventanas de exposición en modelo de ratón. Se detallan los hitos biológicos clave durante los períodos prenatal y perinatal. GD: día de gestación; DPN: día postnatal. Fuente basada en Richardson y Lehmann (2010), Pepling (2012) y Hedrich, H. (2012).

c) Período perinatal (Figura 8): varios trabajos exploran las consecuencias de la exposición a un período denominado perinatal, que integra las etapas prenatal y postnatal. Estos trabajos muestran que este período de exposición también constituye una ventana sensible a la acción de los DEs, impactando negativamente en la capacidad reproductiva de la descendencia (Cabaton et al., 2011; Padmanabhan et al., 2016; Reynolds & Caton, 2012; Santamaría et al., 2017).

1.2.4.3. El "Efecto Cóctel": exposición a mezclas complejas

Un aspecto de creciente relevancia y complejidad en la toxicología moderna es el estudio de los efectos producidos por las mezclas de compuestos. Tradicionalmente, la gran mayoría de los estudios toxicológicos se han centrado en evaluar compuestos químicos individuales; sin embargo, en la realidad ambiental, es prácticamente imposible que los seres humanos o los animales estén expuestos a un solo químico de forma aislada (Bergman et al., 2013; Organización mundial de la Salud, 2023). En líneas generales, estamos expuestos a cientos de sustancias sintéticas a través del agua, el aire, la comida y productos de uso cotidiano (Bergman et al., 2013). Esta exposición comienza incluso antes del nacimiento, ya que se ha demostrado que el feto está expuesto a numerosos productos químicos en el útero, y tanto seres humanos como animales nacen con decenas de sustancias químicas sintéticas en su torrente sanguíneo (Bergman et al., 2013; Santamaria et al., 2020).

La exposición simultánea a múltiples compuestos puede generar efectos incrementales o impactar blancos de acción (*targets*) no predecibles mediante el estudio de los compuestos individuales (Zeliger, 2011). Bajo esta lógica, dosis consideradas "seguras" para un químico aislado pueden volverse disruptivas al actuar

en combinación, presentando curvas de dosis-respuesta no lineales o sinérgicas (Mínguez-Alarcón et al., 2023; Vandenberg et al., 2012). Estudios de biomonitorio refuerzan esta preocupación al detectar frecuentemente distintos DEs, como bisfenoles y filtros UV, en las mismas muestras de orina, suero y leche materna, evidenciando una co-exposición crónica en la población (Santamaria et al., 2020; Völkel et al., 2002).

A pesar de que la exposición a mezclas ha sido señalada como una fuente de efectos a dosis más bajas de lo esperado (Zeliger, 2011), existe una carencia relativa de evidencia científica sobre cómo la interacción específica entre DEs puede afectar la función ovárica y la reserva germinal. Basándonos en los conceptos de ventanas de susceptibilidad y la posible potenciación de efectos por co-exposición, incorporamos este aspecto buscando esclarecer si la acción conjunta de DEs compromete de manera diferencial el desarrollo folicular y el potencial reproductivo, superando las limitaciones de las evaluaciones toxicológicas tradicionales basadas en sustancias únicas (Santamaría et al., 2016; Santamaría et al., 2017)

1.2.4.4. Multiparidad

Un aspecto innovador y central de este plan de trabajo es la incorporación de la multiparidad como factor modulador de la respuesta a los DEs. La gran mayoría de los estudios toxicológicos tradicionales se han centrado en evaluar los efectos asociados a una única gestación en hembras jóvenes y nulíparas, desconociendo la influencia que la historia reproductiva y el número de gestaciones pueden tener sobre los parámetros endocrinos y la resiliencia del sistema reproductivo (Merrill et al., 2021; Moon et al., 2023).

De esta manera, sucesivas gestaciones pueden generar modificaciones en la respuesta fisiológica del organismo (Bridges, 2015), modificando así su susceptibilidad a los DEs. Por lo tanto, evaluar los efectos a lo largo de gestaciones sucesivas ofrece una perspectiva integradora sobre los riesgos acumulativos asociados a la paridad, un contexto fisiológicamente relevante que a menudo se pasa por alto en estudios sobre disrupción endocrina.

1.2.4.5. Disruptores endocrinos relevantes: benzofenona-3 y bisfenol-A

La elección de BPA y BP3 como objeto de estudio en este plan de tesis responde a su ubicuidad ambiental y a la frecuencia con la que ambos compuestos co-existen en el organismo humano. Además, ambos compuestos son aditivos

fundamentales en productos de consumo masivo, y su presencia conjunta en matrices biológicas como orina, suero y leche materna justifica la necesidad y relevancia de evaluar sus efectos no solo de forma individual, sino como una mezcla con potencial sinérgico. De particular interés resultan los productos de cuidado personal (PCP), tal como puede observarse en la **Figura 9**.

Aunque BPA no se utiliza como ingrediente intencional en PCP, diversos estudios han demostrado su presencia en cosméticos y protectores solares, atribuida principalmente a la migración desde materiales plásticos del envase y a procesos de fabricación, constituyendo una fuente adicional de exposición cutánea crónica (Jala et al., 2022).

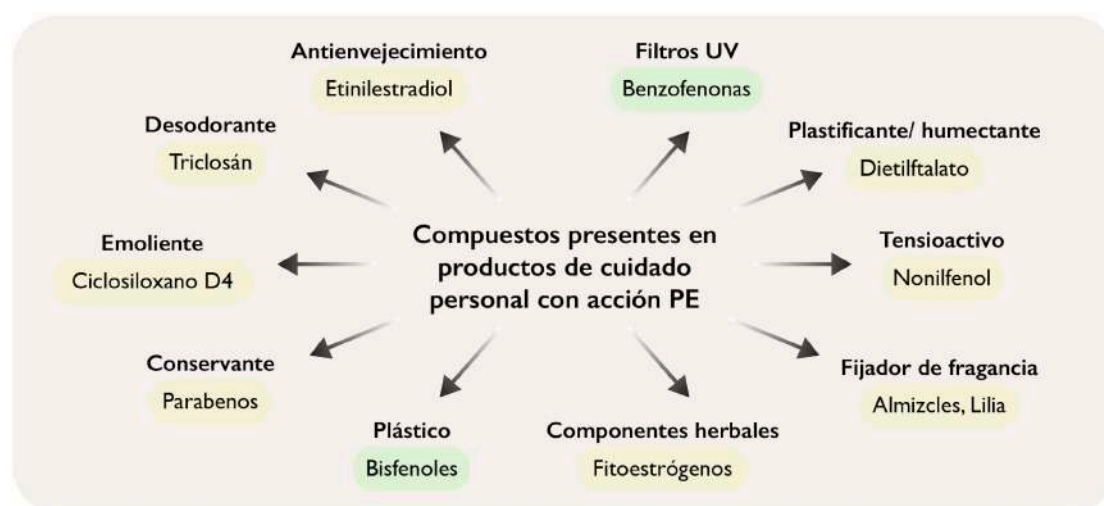


Figura 9: Compuestos con actividad PE presentes en PCP. El esquema detalla las diversas categorías funcionales de los ingredientes (filtros UV, conservantes, plastificantes, etc.) y ejemplos de compuestos específicos asociados a cada una. Modificado de Darbre, 2022.

1.2.5. Benzofenona-3

El BP3 u oxibenzona (**Figura 10**) es uno de los agentes bloqueantes de rayos ultravioleta (UV) más ampliamente utilizados en la composición de cremas protectoras solares para prevenir las quemaduras y los cambios degenerativos de la piel causados por la radiación. Junto con otros bloqueantes solares, puede catalogarse como un Xeg dado que ha demostrado actividad estrogénica por su capacidad para inducir proliferación en células de la línea MCF-7 (ensayo E-SCREEN) y en el ensayo uterotrópico (Schlumpf et al., 2001). Debido a que BP3 es un compuesto altamente lipofílico, posee una gran capacidad para bioacumularse y permanecer en el ambiente, afectando tanto a animales como a seres humanos. Las vías de exposición son diversas; la vía oral puede ser directa o asociada a la ingesta de comida contaminada, ya que el compuesto ha sido detectado en cantidades significativas en

la grasa de peces, en concentraciones similares a otros contaminantes ambientales con actividad estrogénica como el DDT y los bifenilos policlorados (Schlumpf et al., 2001). Asimismo, su presencia es recurrente en distintos ambientes acuáticos, incluyendo ríos, agua potable y efluentes (Balmer et al., 2005; Cuderman & Heath, 2007; Loraine & Pettigrove, 2006; Stackelberg et al., 2004).

Para los seres humanos, la vía de exposición preponderante es la aplicación dérmica de protectores solares (Aghazarian et al., 1999; Hayden et al., 1997). Al respecto, se ha establecido que una dosis de 50 mg/kg de peso corporal/día corresponde a la exposición de BP3 tras una aplicación tópica dérmica de un protector solar con una formulación al 10%, bajo protocolos controlados en seres humanos (Janjua et al., 2008). La magnitud de esta exposición es global; se han detectado cantidades significativas de BP3 en el 96.8% de la población estadounidense estudiada (Calafat et al., 2008) lo que correlaciona con reportes que indican que estos agentes retrasan la pubertad masculina, modifican el peso de órganos reproductivos, alteran la expresión de genes dependientes de estrógenos en útero y próstata, y perturban la regularidad del ciclo estral (Schlumpf et al., 2008).

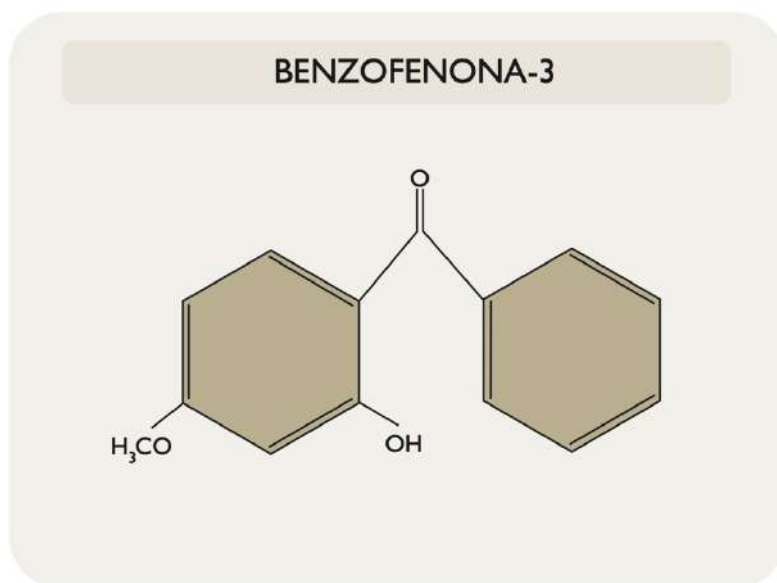


Figura 10: Estructura química del BP3. Esta molécula, comúnmente conocida como oxibenzona, es un filtro ultravioleta utilizado ampliamente en protectores solares y cosméticos. Se clasifica como un disruptor endocrino debido a su capacidad para interferir con las hormonas naturales, afectando procesos clave como el desarrollo de los folículos y la función del ovario. Su estudio es el eje central de este trabajo de optimización de extracción proteica.

Más recientemente, se demostró que la aplicación de BP3 en personas, usando distintos formatos de producto (loción, spray, crema, etc), en regímenes de administración de uso simple o maximizado, se tradujo en concentraciones promedio en sangre de 258.1 (loción) y 180.1 (aerosol) ng/mL, permaneciendo en circulación hasta 17 días posteriores a la última aplicación en piel (Matta et al., 2019, 2020).

1.2.6. Bisfenol-A

El BPA (**Figura 11**) es un estrógeno ambiental utilizado ampliamente en la manufactura de policarbonatos plásticos, resinas epoxi, pesticidas, productos antioxidantes, selladores dentales y barnices. Debido a la exposición al calor o cambios de pH, este compuesto se libera de los envases de bebidas y alimentos, facilitando su ingreso al organismo (Richter et al., 2007; Vandenberg et al., 2009). La preocupación sobre su impacto en la salud humana se sustenta en hallazgos que documentan su presencia en suero de fetos de 15 a 18 semanas de gestación y su capacidad de acumularse en el fluido amniótico, alcanzando concentraciones cinco veces superiores a las séricas (Ikezuki et al., 2002).

Para profundizar en el estudio del BPA, es necesario considerar la evolución de los lineamientos internacionales de seguridad. Tradicionalmente, agencias como la EPA (USA) y la ANMAT (Argentina) han adoptado una dosis de referencia de 50 µg/kg de peso corporal/día. No obstante, la *European Food Safety Authority* (EFSA) estableció en 2015 una ingesta diaria tolerable temporal (t-TDI) de 4 µg/kg pc/día. En un cambio de paradigma, la EFSA publicó en 2023 un documento recomendando reducir drásticamente este límite a 0.2 ng/kg.pc/día (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP) et al., 2023), lo cual fundamentó la promulgación del Reglamento (UE) 2024/3190, vigente desde enero de 2025. Si bien esta nueva reglamentación prácticamente prohíbe el uso de BPA en materiales en contacto con alimentos, establece períodos de transición de hasta 4 años, permitiendo la presencia de estos materiales en el mercado hasta los años 2028-2029 según el producto. Esta ventana legal implica que, incluso en Europa, la población continuará expuesta crónicamente al compuesto durante el proceso de sustitución industrial.

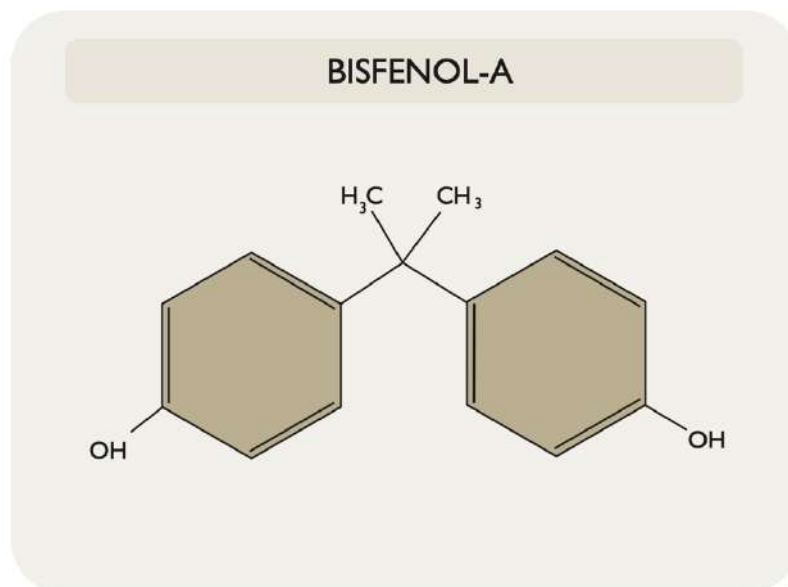


Figura 11: Estructura química del BPA. Esta molécula es un componente clave en la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi, presentes en numerosos productos de consumo diario. Es ampliamente reconocido como un disruptor endocrino con actividad estrogénica, capaz de mimetizar las hormonas naturales e interferir en la señalización del ovario, alterando procesos críticos como el establecimiento de la reserva folicular.

Este escenario es aún más crítico en nuestra región, donde la brecha regulatoria permite que el BPA se siga utilizando bajo estándares de dosis mucho más elevadas (50 µg/kg pc/día). En este contexto, hemos publicado que dicha exposición condiciona negativamente la respuesta del ovario a tratamientos con gonadotrofinas (Santamaría et al., 2017), tal como se sospecha que ocurre en mujeres que cursan protocolos de fertilización *in vitro* (Mok-Lin et al., 2010; Rochester, 2013). Muy pocos trabajos evalúan los efectos de BPA en dosis comparables a la TDI de 4 µg/kg pc/día. Usando una dosis aproximada de 3 µg/kg pc/día administrada durante la gestación y la lactancia, se ha reportado que el BPA altera el funcionamiento normal del eje reproductivo en ratas machos y hembras prepúberes (Gámez et al., 2014, 2015). La carencia relativa de trabajos que evalúen los efectos de la dosis de 4 µg/kg pc/día, o de dosis ambientalmente relevantes comparables a las concentraciones halladas en el fluido folicular (FF) humano, constituye un área de vacancia científica crítica que este plan de tesis pretende cubrir en parte.

1.3. Desarrollo ovárico y función reproductiva

1.3.1. Ontogenia y determinación sexual de la gónada

La formación del ovario se inicia con el establecimiento de una gónada bipotencial, la cual es colonizada por las células germinales primordiales que migran desde el epiblasto hacia las crestas genitales (Sadler, 2023). Durante este trayecto

migratorio, las células germinales llevan a cabo una reprogramación epigenética masiva que incluye la desmetilación global del genoma y el borrado de la impronta parental (fenómeno de *imprinting*) (Saitou & Yamaji, 2012). Este proceso de programación pre y perinatal es de vital importancia para la fertilidad futura, ya que asegura que las células recuperen su potencialidad y puedan transmitir una información genética íntegra a la descendencia, sentando las bases de la calidad de los gametos que se desarrollarán más adelante.

En cuanto a la determinación sexual, las evidencias actuales han superado la idea de que el ovario es una ruta "por defecto". Se entiende ahora como un proceso genéticamente activo donde la identidad femenina de la gónada se establece mediante una regulación coordinada que guía a las células hacia el linaje de la granulosa (Stévant et al., 2019). Esta diferenciación temprana es un paso crítico para la constitución de la reserva ovárica, ya que la correcta interacción entre las células germinales y las células de soporte es lo que permitirá, posteriormente, la formación de los folículos primordiales. Así, la estabilidad de la identidad ovárica desde las etapas embrionarias garantiza que la gónada mantenga su capacidad funcional para sustentar la vida reproductiva desde el nacimiento hasta la edad adulta (García-Ortiz et al., 2009).

1.3.2. Histogénesis ovárica, ruptura de nidos y establecimiento de la reserva folicular

Una vez establecida la identidad gonadal femenina, el ovario fetal experimenta una drástica reorganización arquitectónica y celular. Inicialmente, las ovogonias proliferan activamente mediante mitosis, alcanzando un número máximo estimado de entre 6 y 7 millones de células germinales hacia el quinto mes de desarrollo fetal en humanos (Sadler, 2023; Silverthorn, 2019). Sin embargo, estas células no se encuentran aisladas; se organizan en estructuras sinciciales conocidas como "nidos" o quistes de células germinales, manteniéndose interconectadas por puentes citoplasmáticos estables que resultan de una citocinesis incompleta durante las divisiones mitóticas (Tingen et al., 2009).

Hacia el final de la vida fetal, este proceso proliferativo cesa y las células germinales entran progresivamente en la profase de la meiosis I, deteniéndose específicamente en la etapa de diploteno. Es en este estadio de arresto meiótico donde ocurre un evento morfogénico crítico para la fertilidad futura: la ruptura de los nidos germinales (*nest breakdown*). Este fenómeno implica el desensamblaje de los cistos sinciciales y la invasión de células somáticas de la pre-granulosa (**Figura 12**),

las cuales se intercalan entre las células germinales para romper los puentes intercelulares y rodear individualmente a cada ovocito (Tingen et al., 2009).

Este proceso de individualización es altamente selectivo y conlleva una atresia masiva; se estima que millones de células germinales mueren durante esta ventana temporal, de modo que al momento del nacimiento solo persisten entre 1 y 2 millones de ovocitos rodeados de células somáticas en mujeres (Silverthorn, 2019). En ratones, tras la formación del pool primordial y la ruptura de los "nidos" de células germinales, se reporta que persisten aproximadamente 12.000–24.000 ovocitos en los ovarios neonatales (Tingen et al., 2009). Se postula que esta muerte celular programada no es aleatoria, sino que actúa como un riguroso mecanismo de control de calidad. Bajo la hipótesis de la "célula nodriza", los puentes intercelulares permitirían que ciertos ovocitos destinados a la apoptosis transfieran citoplasma, mitocondrias y otros organelas vitales a los ovocitos "elegidos" para sobrevivir, dotándolos de los recursos energéticos necesarios para soportar la larga dormancia meiótica que puede durar décadas (Tingen et al., 2009), el éxito del ensamblaje folicular depende estrictamente de la interacción entre el ovocito y las células somáticas. Cualquier fallo en este proceso de encapsulamiento o en la señalización molecular (como alteraciones en los genes *WNT4* o *FOXL2*) puede derivar en la formación de folículos multi-ovulares o en una pérdida acelerada de la reserva ovárica, comprometiendo la vida reproductiva del individuo (Garcia-Ortiz et al., 2009; Tingen et al., 2009).

Una vez constituida la reserva ovárica, la población de folículos no permanece estática. Tras su formación, los folículos primordiales tienen tres destinos fisiológicos posibles: la atresia folicular, la transición a la fase de crecimiento (activación) o el mantenimiento del estado primordial (latencia) (Tingen et al., 2009) (**Figura 12**), el equilibrio entre estos tres caminos es crítico para la vida reproductiva. Mientras que el mantenimiento de la latencia es esencial para preservar la reserva a largo plazo (regulado por señales represoras como PTEN y la hormona antimülleriana (AMH)), la activación permite el reclutamiento cíclico (Tingen et al., 2009).

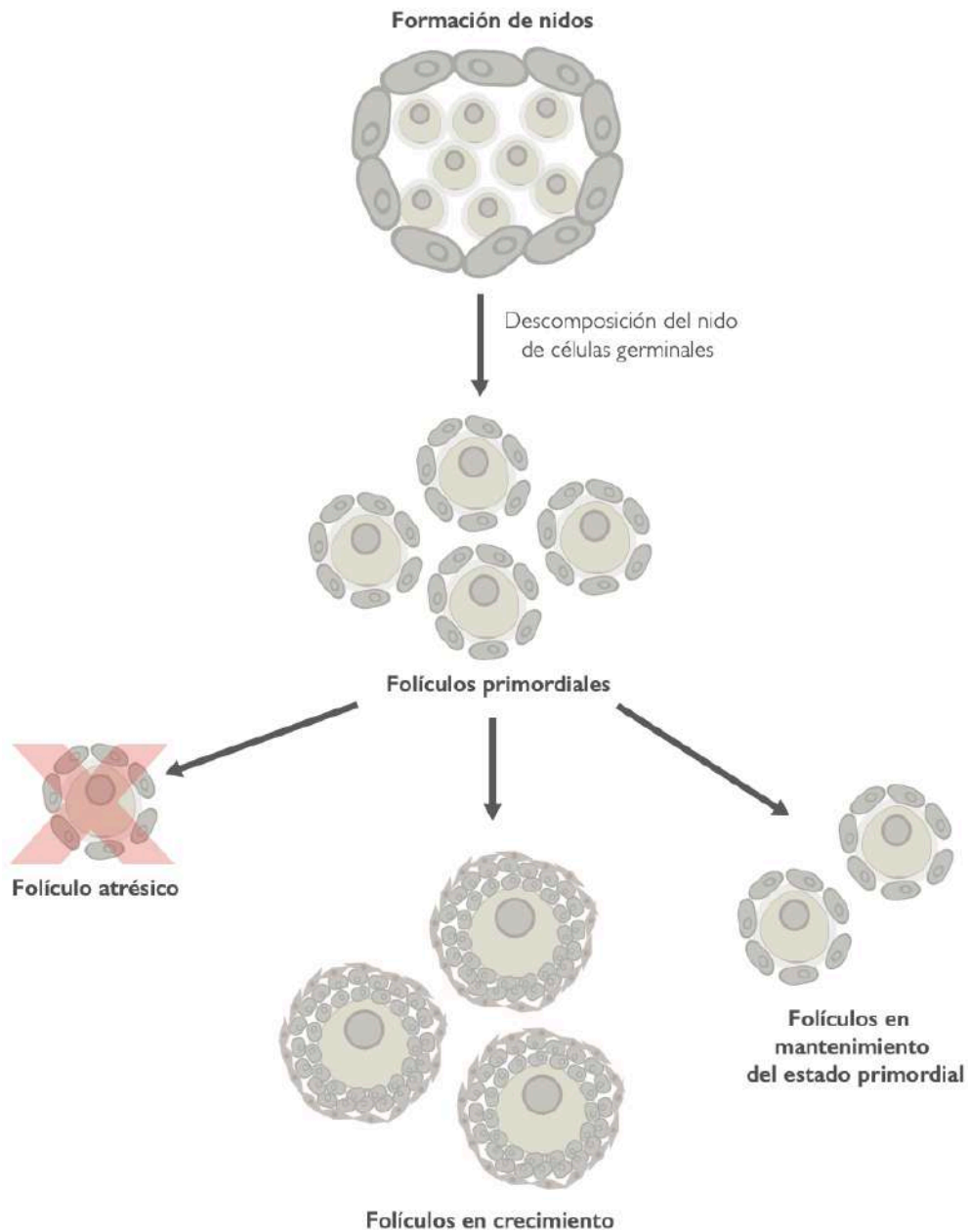


Figura 12: Representación esquemática del ensamblaje folicular y los destinos iniciales de la reserva ovárica. El proceso inicia con la organización de las células germinales en nidos o cistos. La posterior descomposición o ruptura del nido permite la individualización de los ovocitos por células de la pregranulosa, formando los folículos primordiales. A partir de este estadio, la cohorte inicial enfrenta tres destinos posibles: la eliminación por atresia, el reclutamiento hacia la fase de crecimiento, o el mantenimiento en estado de quiescencia constituyendo la reserva ovárica.

Sin embargo, el destino predominante para la inmensa mayoría de los folículos formados sigue siendo la atresia; se estima que la mayoría de los folículos primordiales nunca completan su desarrollo y mueren a través de un proceso apoptótico regulado hormonalmente a lo largo de los años (Silverthorn, 2019; Tingen et al., 2009).

1.3.3. Foliculogénesis y Ovulación

Una vez establecida la reserva de folículos primordiales descrita anteriormente, se inicia de manera continua el proceso de foliculogénesis, un proceso dinámico y altamente regulado que transforma un folículo primordial latente en una estructura preovulatoria compleja y funcional. Este desarrollo se inicia con la activación o reclutamiento inicial, etapa en la cual el ovocito aumenta significativamente su volumen y las células de la granulosa, originalmente planas, adquieren una morfología cúbica y proliferan para constituir múltiples capas, dando origen al folículo primario (**Figura 13, panel b**). Es fundamental destacar que este crecimiento inicial es independiente de las gonadotrofinas hipofisarias y se encuentra bajo el control estricto de factores locales paracrinós esenciales, tales como el factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF-9), la proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15) y el ligando de Kit (KL), los cuales actúan como señales de supervivencia que previenen la entrada prematura en atresia.

A medida que el folículo progresa, se desarrollan las capas de la teca, esenciales para la esteroidogénesis al proveer los precursores androgénicos necesarios. Al alcanzar el estadio de folículo secundario o antral, la unidad folicular experimenta un cambio de paradigma regulatorio, volviéndose estrictamente dependiente de las gonadotrofinas FSH y LH para su supervivencia, selección y maduración final. Esta dependencia marca la plena integración del ovario en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (**Figura 13, panel a**), un sistema de control jerárquico donde la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) por el hipotálamo estimula la secreción pituitaria de FSH y LH. La precisión de este sistema reside en la comunicación bidireccional; mientras el eje impulsa el crecimiento folicular, el folículo responde secretando hormonas que regulan el centro de control mediante lazos de retroalimentación.

La fase terminal de la foliculogénesis se rige por la interacción endocrina conocida como la teoría de las dos células. Bajo la influencia de la LH, las células de la teca sintetizan andrógenos (AR) que, al difundir hacia la granulosa y por acción de la FSH, son aromatizadas a estrógenos, principalmente E_2 . Esta producción creciente de E_2 ejerce una retroalimentación positiva sobre el hipotálamo y la hipófisis (**Figura 13, panel a**) que, al alcanzar un umbral crítico, dispara el pico preovulatorio de LH. Este evento desencadena la reanudación de la meiosis y la ruptura folicular mediada por enzimas proteolíticas, permitiendo la liberación del complejo cúmulo-ovocito. Tras la ovulación, el remanente folicular se transforma en el cuerpo lúteo, glándula responsable de la secreción de P_4 , la cual ejerce una retroalimentación negativa que

regula la liberación de LH hasta que se produce la regresión o luteólisis, marcando el fin del ciclo ovárico.

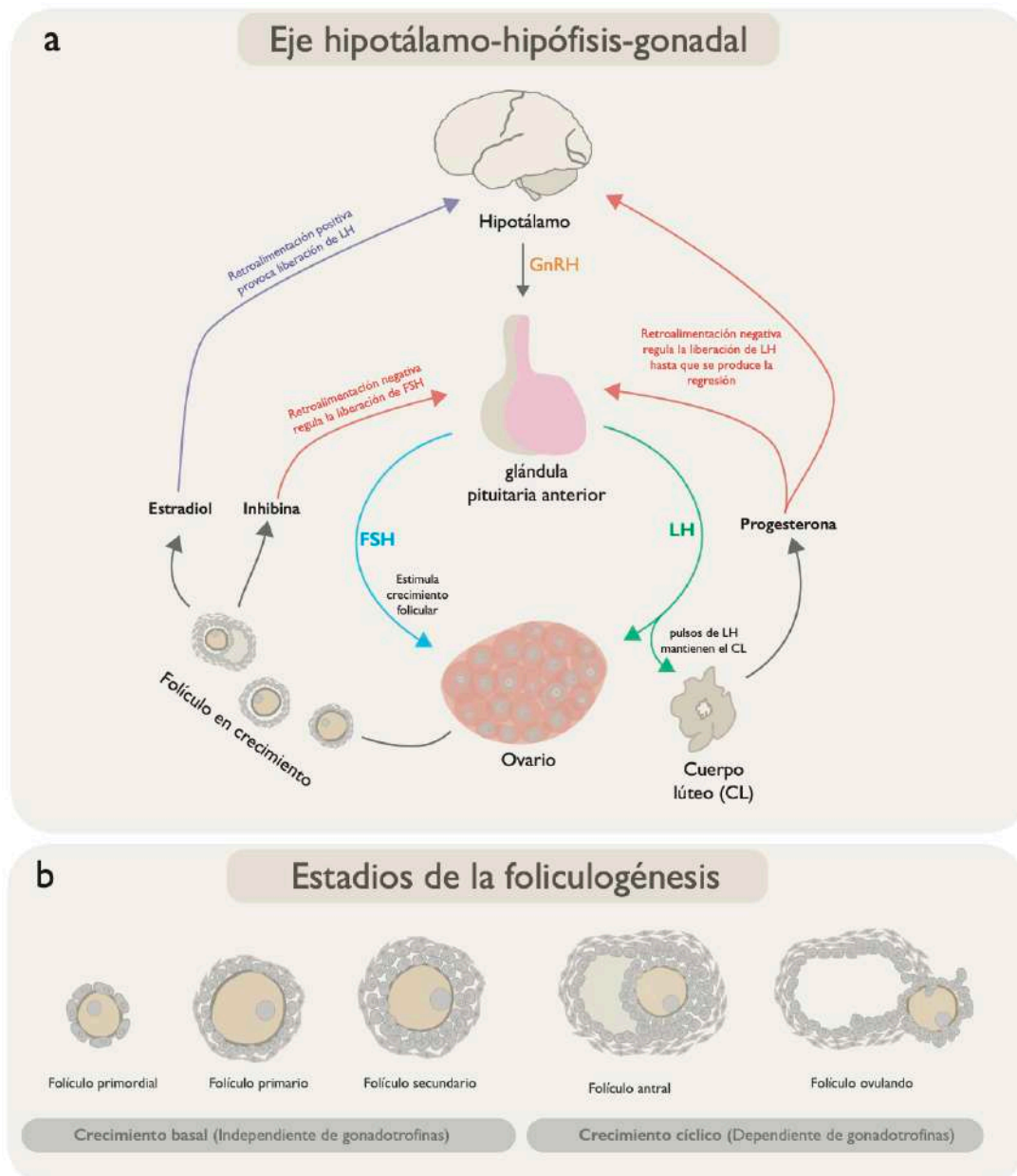


Figura 13: Integración de la regulación neuroendocrina y la dinámica folicular. a) Organización del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, destacando cómo la secreción de GnRH modula la liberación de las gonadotrofinas FSH y LH bajo un estricto control de retroalimentaciones mediadas por E₂, P₄ e inhibina. b) Representa la progresión morfológica de los folículos, permitiendo visualizar la transición del crecimiento basal, regulado por factores locales, hacia un crecimiento cíclico que depende estrictamente del estímulo hormonal del eje. Esta representación conjunta subraya la unidad funcional gónada-eje, cuya estabilidad es fundamental para la competencia ovulatoria y el mantenimiento de la reserva ovárica. Fuente basado en Silverthorn, 2019.

1.4. Esteroides ováricos: estradiol, progesterona y andrógenos

Los esteroides sexuales son hormonas fundamentales que coordinan tanto la fisiología reproductiva adulta como la diferenciación y el desarrollo temprano del ovario. Aunque ambos sexos producen la misma gama de esteroides, en las hembras

predominan los estrógenos y la progesterona (P_4), los cuales se sintetizan principalmente en las gónadas a partir del colesterol (Silverthorn, 2019). La producción de estas hormonas no es estática; sigue un patrón cíclico y depende de una cooperación precisa entre diferentes tipos celulares dentro del folículo ovárico (**Figura 14, panel a**), un proceso bajo la regulación estricta del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Silverthorn, 2019).

1.4.1. Estradiol

El estradiol (E_2) es el estrógeno principal y ejerce un rol dominante durante la fase folicular. Su síntesis se explica mediante la teoría de la "doble célula" (**Figura 14, panel b**), en la cual las células de la teca, bajo el estímulo de la LH, inician la cascada esteroidogénica a través de la proteína *StAR* y la enzima *Cyp11a1*.

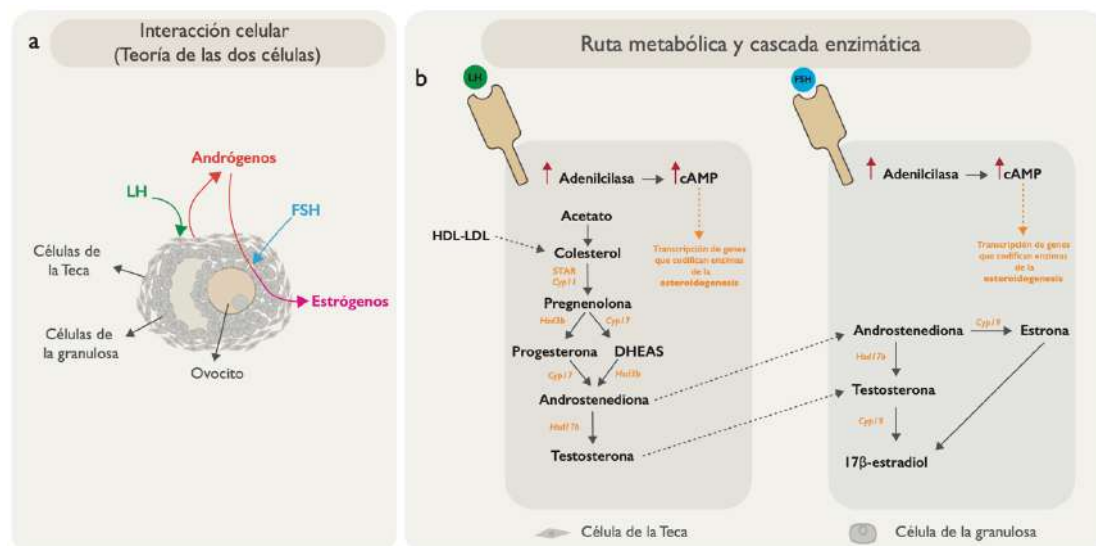


Figura 14: Representación esquemática de la teoría de la "doble célula" y la ruta de la esteroidogénesis ovárica. a) Organización multicelular del folículo, donde las gonadotropinas LH y FSH actúan de forma coordinada sobre las células de la teca y la granulosa, respectivamente, para regular la síntesis de ARy estrógenos en torno al ovocito. b) Cascada bioquímica intracelular iniciada por la activación de la adenilciclasa y el aumento de los niveles de AMP cíclico (cAMP). Se destaca el flujo metabólico desde la captación de colesterol (HDL/LDL) hasta la producción del 17β-estradiol, señalando en color naranja las enzimas y proteínas clave estudiadas, tales como la proteína de transferencia *StAR*, las enzimas del citocromo P450 (*Cyp11*, *Cyp17*, *Cyp19*) y las hidroxisteroides deshidrogenasas (*Hsd3b*, *Hsd17b*). Las flechas punteadas representan la difusión de intermediarios androgénicos a través de la membrana basal, proceso indispensable para la aromatización y la identidad funcional del linaje femenino. Fuente: basados en Craig et al., 2011.

Estas células producen AR (como androstenediona y testosterona) mediante la acción de *Cyp17a1* y *Hsd3b1*, los cuales difunden hacia las células de la granulosa vecinas. Allí, bajo la influencia de la FSH, la enzima aromatasa (*Cyp19a1*) convierte estos precursores en estrógenos (Silverthorn, 2019; Stévant et al., 2019).

La expresión de *Cyp19a1* está finamente regulada por factores como *Foxl2*, cuya integridad es esencial para mantener la identidad funcional del ovario (García-Ortiz et al., 2009). Más allá de su función cíclica, los niveles de estrógenos son críticos durante el período neonatal para la formación de la reserva ovárica. Se ha observado que concentraciones adecuadas son necesarias para la correcta ruptura de los nidos de células germinales; por lo tanto, la exposición a disruptores endocrinos que actúen como estrógenos exógenos puede alterar este ensamblaje folicular, dando lugar a folículos de baja calidad o multi-ovulares (Tingen et al., 2009).

1.4.2. Progesterona

La progesterona (P_4) es la hormona característica de la fase lútea, indispensable para preparar el endometrio para la implantación y mantener la estabilidad uterina (Silverthorn, 2019). Su síntesis ocurre principalmente en el cuerpo lúteo tras el proceso de luteinización mediado por el pico de LH, donde las células de la granulosa y la teca sufren una reprogramación enzimática para priorizar la producción de gestágenos sobre los estrógenos (Stouffer & Hennebold, 2015). Además de su rol en el útero, la P_4 actúa como un modulador crítico del eje hipotálamo-hipófisis, ejerciendo una retroalimentación negativa que frena la liberación pulsátil de GnRH y LH, impidiendo así nuevas ovulaciones durante la fase lútea o una posible gestación (**Figura 14, panel a**). El análisis de los niveles de P_4 y la expresión de sus receptores es un indicador fundamental de la funcionalidad del cuerpo lúteo y de la madurez del sistema reproductivo frente a las agresiones ambientales.

1.4.3. Andrógenos

Aunque los andrógenos (AR) suelen asociarse a la fisiología masculina, en el ovario cumplen roles biológicos duales de vital importancia. Por un lado, actúan como precursores obligados para la síntesis estrogénica mediante la vía de la aromatasa (**Figura 14, panel b**); por otro, ejercen efectos directos sobre el desarrollo folicular temprano a través de los receptores de AR. El equilibrio entre estas tres clases de esteroides es sumamente delicado, y cualquier alteración en su síntesis enzimática o en la sensibilidad de sus receptores puede comprometer tanto la constitución de la reserva ovárica inicial como la fertilidad a largo plazo (Silverthorn, 2019; Tingen et al., 2009). Cualquier falla en la actividad de enzimas como *Cyp17a1* puede desencadenar un desbalance hormonal que afecte la competencia de los folículos y la respuesta al entorno.

1.5.El ovario como blanco de acción de los disruptores endocrinos, bisfenol-A y benzofenona-3 en particular

La elección del ovario como unidad de análisis fundamental en esta investigación radica en su naturaleza como órgano dual, encargado tanto de la gametogénesis como de una compleja función endocrina que regula la fisiología sistémica de la hembra (Silverthorn, 2019). A diferencia de otros tejidos, el ovario posee una reserva finita y no renovable de folículos primordiales que se establece en una ventana crítica del desarrollo temprano, lo que lo vuelve extremadamente vulnerable a agresiones químicas persistentes (Tingen et al., 2009). Cualquier interferencia en el ensamblaje o en la activación de esta reserva, provocada por compuestos como BPA o BP3, tiene consecuencias irreversibles sobre la vida reproductiva y la salud general del individuo (Borgeest et al., 2002).

Además de su sensibilidad en etapas tempranas vinculadas a la reprogramación epigenética (Saitou & Yamaji, 2012), el ovario adulto funciona como un sensor biológico de alta resolución en remodelación constante. Procesos como la foliculogénesis, la esteroidogénesis y la ovulación dependen de una coordinación precisa de señales locales y sistémicas, donde cambios mínimos en la expresión de enzimas clave, como la aromatasa (Cyp19a1), actúan como indicadores tempranos de toxicidad ambiental (Garcia-Ortiz et al., 2009). Al estudiar el ovario, no solo se analiza la capacidad fértil, sino que se obtiene una ventana hacia los mecanismos moleculares que explican cómo las mezclas de contaminantes y factores biológicos como la multiparidad modifican la respuesta adaptativa de la hembra (Stouffer & Hennebold, 2015).

En este contexto, el ovario se presenta como el blanco por excelencia para desarrollar herramientas diagnósticas y predictivas que permitan trasladar los hallazgos del laboratorio hacia la clínica de fertilidad.

Recientemente, nuestro laboratorio ha demostrado que la BP3 altera el ensamblado folicular *in vitro* (Santamaría et al., 2019) y que su administración dérmica en períodos tempranos de la gestación produce retraso del crecimiento fetal y alteraciones en el *sex ratio* en ratones (Santamaria et al., 2020). En dichos estudios, observamos que BP3 atraviesa la barrera placentaria y permanece por más tiempo en el líquido amniótico que en la sangre circulante, manteniendo un contacto directo con los fetos en desarrollo. Si bien estos resultados confirman el riesgo prenatal, el impacto de la BP3 sobre la diferenciación de las células germinales y sus mecanismos de acción a largo plazo siguen siendo interrogantes abiertos. Un aspecto crítico para abordar estos vacíos de conocimiento es la utilización de concentraciones

ambientalmente relevantes de BP3, comparables por ejemplo a las detectadas en el FF humano. Además, la presencia confirmada de este Xeg en el microambiente ovárico justifica la necesidad de emplear modelos de sistema aislado (folículos 2D/3D u ovario entero) para determinar cómo la exposición directa impacta la competencia folicular y la capacidad reproductiva, especialmente cuando se analiza en combinación con otros contaminantes persistentes como el BPA. El empleo de modelos de sistemas aislados es útil para desentrañar los mecanismos moleculares directos sin las interferencias de la regulación sistémica. Además, la integración de sistemas de cultivo de folículos (2D y 3D) permite comparar y determinar qué plataforma mimetiza con mayor fidelidad los hallazgos *in vivo*. Al combinar el análisis de los períodos de exposición *in vivo* con la precisión de las técnicas *in vitro*, se busca generar una base de conocimiento que conecte las alteraciones funcionales y proteómicas con las fallas reproductivas observadas en la clínica.

Investigaciones previas desarrolladas en nuestro laboratorio han demostrado que la exposición de roedores al BPA produce trastornos significativos en el desarrollo folicular ovárico y en la gestación temprana a nivel uterino, alterando la foliculogénesis tanto en etapas neonatales como adultas (Kass et al., 2012; Rodríguez et al., 2010; Santamaría et al., 2016; Varayoud et al., 2011). Asimismo, hemos reportado alteraciones similares en la oveja (Rivera et al., 2011, 2015) y en el yacaré overo (Stoker et al., 2003, 2008). Sin embargo, estos trabajos y gran parte de los que están en la literatura no han abordado el estudio de los efectos a las nuevas dosis seguras o TDI de BPA.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, podemos ver que existen lagunas de conocimiento sobre los posibles efectos de BPA y BP3 sobre la fisiología ovárica y sus consecuencias a largo plazo. Además, es cada vez más relevante el estudio de la exposición a mezclas de DEs y no solo a los compuestos aislados. En este sentido, a pesar de los avances en la comprensión de la toxicología reproductiva, persiste un vacío de conocimiento significativo respecto a los efectos directos e inmediatos que la exposición crónica a mezclas de DEs ejerce sobre la gónada femenina. En el entorno ambiental, los individuos no se encuentran expuestos a sustancias aisladas, lo que hace imperativo estudiar el potencial sinérgico de compuestos como el BPA y la BP3. La relevancia de abordar este problema radica en que el impacto de estas mezclas puede variar drásticamente según la ventana de exposición; por ello, es fundamental evaluar mediante modelos *in vivo* cómo el contacto con estos químicos en períodos críticos del desarrollo o durante la vida adulta afecta la funcionalidad ovárica a largo plazo. Asimismo, la historia reproductiva de la madre, específicamente

la multiparidad o número de gestaciones, actúa como una variable biológica que puede modular la susceptibilidad del órgano frente a estas agresiones ambientales.

Sobre la base de estos fundamentos, se plantean los objetivos de la presente tesis, los que son explicados en detalle en la introducción de cada capítulo

2. Objetivos

2.1. Objetivos generales

Determinar los efectos causados por la exposición a BP3 y a la combinación de BP3+BPA sobre el desarrollo y funcionalidad de las poblaciones de células germinales, y sus consecuencias a largo plazo en la capacidad reproductiva. Utilizando un enfoque integrado de modelos *in vivo* e *in vitro* buscaremos identificar tanto los efectos directos e indirectos como posibles mecanismos de acción y asociación con alteraciones de la fertilidad en la vida prepuberal y adulta. Además, se evaluará si los modelos *in vitro* tienen potencial como ensayos predictivos de los efectos *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Evaluar si la exposición dérmica a BP3 en un período perinatal es capaz de influir sobre distintos parámetros reproductivos de las madres y sus crías, y la posible relación con alteraciones del desarrollo y funcionalidad de las poblaciones de células germinales.
- 2) En este experimento nos propusimos investigar los efectos de la exposición prenatal a BP3, BPA y a su mezcla (BP3+BPA) sobre los parámetros gestacionales maternos y la respuesta ovárica a la administración exógena de gonadotrofinas en la descendencia de dos gestaciones sucesivas.
- 3) Determinar el impacto de la exposición repetida a BP3 durante dos gestaciones sucesivas sobre el perfil proteómico de los ovarios previo al estímulo con gonadotrofinas en las progenies F1.P1 y F1.P2.
- 4) Identificar efectos y mecanismos de acción directa de BP3, BPA y BP3+BPA sobre desarrollo folicular y ovulación en modelos *in vitro* 2D y 3D de cultivo de folículos aislados.

Capítulo 1

Disminución de la fertilidad en ratones C57BL/6 expuestos perinatalmente a una dosis diaria de benzofenona-3



3. Capítulo 1: Disminución de la fertilidad en ratones C57BL/6 expuestos perinatalmente a una dosis diaria de benzofenona-3

3.1. Introducción

Tal como se planteó en la introducción general, los DEs poseen la capacidad de interferir en procesos regulados hormonalmente y alterar la homeostasis del sistema endocrino en los organismos (Bergman et al., 2013; Ramamoorthy & Blakely, 1999). Esta problemática cobra una relevancia fundamental dentro de la hipótesis de la “reprogramación del desarrollo” o DOHaD: un marco teórico que propone que las exposiciones a ciertos factores adversos durante las etapas embrionaria, fetal o postnatal pueden generar efectos duraderos en la descendencia (Dahlen et al., 2021; Doerge et al., 2010) condicionan la salud y el bienestar del individuo en la vida adulta (Reynolds & Caton, 2012) esta perspectiva, resulta crucial identificar las etapas del desarrollo más vulnerables a la acción de los DEs, es decir, aquellos períodos en los que la exposición puede provocar efectos perjudiciales persistentes (Reynolds & Caton, 2012).

En este sentido, en estudios previos hemos identificado el período prenatal temprano como especialmente sensible; en ratones preñados expuestos por vía dérmica a BP3 entre el día dg0 y el dg6, observamos que esta sustancia persiste en el líquido amniótico por más tiempo que en sangre, manteniendo un contacto directo con los fetos en desarrollo y generando restricción del crecimiento fetal (RCF) (Santamaria et al., 2020). Estos resultados evidenciaron que la primera semana de gestación, coincidente con el proceso de implantación, representa un período de vulnerabilidad crítica.

Por otro lado, muchos trabajos de nuestro instituto y de otros grupos señalan al período perinatal (prenatal + postnatal) como especialmente sensible a la acción de PE, particularmente con BPA (Altamirano et al., 2015, 2017; Gámez et al., 2015; Gomez et al., 2017; Santamaría et al., 2016; Santamaría et al., 2017; Stoker et al., 2020; Vigezzi et al., 2016). En un trabajo publicado en 2011, Cabaton y colaboradores demostraron que la administración de BPA a madres preñadas en ratones desde dg8 hasta el destete (perinatal), provocó una caída en la fertilidad de las crías hembra (Cabaton et al., 2011). Actualmente se desconoce si una exposición a BP3 en un período similar es capaz de provocar efectos a largo plazo en la capacidad reproductiva de la descendencia. No obstante, aún se desconoce si la exposición a BP3 durante el período perinatal, abarcando las etapas pre- y post-natal durante la

exposición, también constituye una ventana sensible donde pueda impactar negativamente en la capacidad reproductiva de la descendencia (Padmanabhan et al., 2016; Reynolds & Caton, 2012). Por ello, el objetivo de este capítulo fue analizar si la administración de BP3 desde el dg9 hasta el dpn21 influye en los parámetros reproductivos tanto de las madres (F0) como de sus crías (F1).

La ventana experimental seleccionada para este estudio (dg9 hasta dpn21) abarca procesos determinantes en ratones como la migración de células germinales, la formación de la reserva folicular y la consolidación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Asimismo, la inclusión del período de lactancia es fundamental ya que, debido a su naturaleza lipofílica, BP3 se transfiere y se acumula en la leche materna, generando una vía de exposición continua durante el desarrollo funcional de la cría (Peña-Fernández et al., 2022).

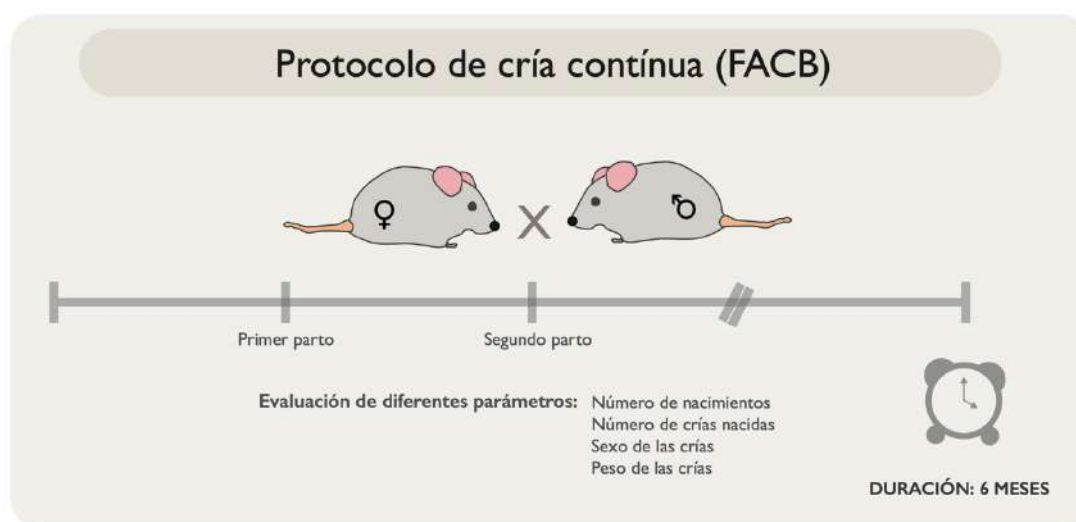


Figura 15: *Diseño experimental del protocolo de cría continua (FACB).* El esquema ilustra la metodología empleada para evaluar la competencia reproductiva a largo plazo en la generación F1, con una duración total de seis meses de convivencia en parejas. Este protocolo permite el monitoreo dinámico de la capacidad fértil mediante el registro sistemático de parámetros críticos, incluyendo el número total de nacimientos por pareja, el tamaño de las camadas, la distribución del sexo y el peso de las crías al nacer. A diferencia de los ensayos de fertilidad de punto final, el modelo de cría continua actúa como una prueba de esfuerzo para el sistema reproductivo, permitiendo detectar de manera sensible el agotamiento prematuro de la reserva folicular o alteraciones en la tasa de senescencia reproductiva resultantes de la exposición perinatal a disruptores endocrinos.

Para evaluar de manera exhaustiva las posibles alteraciones funcionales resultantes de esta exposición, utilizamos un protocolo de evaluación de la fertilidad por cría continua (FACB, *fertility assessment by cross breeding* por sus siglas en inglés) (Figura 15). La implementación de este protocolo resulta muy útil para desenmascarar formas de subfertilidad latente que pasarían desapercibidas en los ensayos regulatorios estándar. Tal como establecieron Lamb et al. (1985), los protocolos convencionales suelen limitar la evaluación a una o dos oportunidades de apareamiento, clasificando a los animales de forma binaria (fértil/infértil). En cambio,

el régimen de cría continua permite analizar el "número promedio de camadas por pareja fértil", un parámetro de sensibilidad superior capaz de detectar una capacidad reproductiva disminuida en animales que, aunque no han perdido totalmente la fertilidad, presentan una eficiencia disminuida. Este enfoque actúa como una "prueba de esfuerzo" fisiológica que permite acelerar la detección de fallas reproductivas. La ventaja de esta evaluación prolongada es respaldada por los hallazgos de Cabaton y colaboradores (2011), quienes advirtieron que los estudios toxicológicos tradicionales fallan al ofrecer una evaluación incompleta basada solo en el primer parto, parámetro que frecuentemente no se ve afectado por la exposición a DEs. En sus investigaciones, el daño reproductivo se manifestó tardíamente como una declinación acelerada de la fecundidad (disminución acumulativa de crías) a partir de la semana 16, revelando un "envejecimiento prematuro" del sistema que hubiese permanecido oculto en evaluaciones de corto plazo.

3.2. Objetivos

Evaluar si la exposición dérmica a BP3 en un período perinatal es capaz de influir sobre distintos parámetros reproductivos de las madres y sus crías, y la posible relación con alteraciones del desarrollo y funcionalidad de las poblaciones de células germinales.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Animales

Para este estudio se utilizaron 19 ratones hembra y 7 machos (ambos de la cepa C57BL/6), con un peso de entre 14 y 17 g y una edad de 6 semanas, adquiridos en el Centro de Medicina Comparada - ICIVET Litoral (UNL, CONICET, Santa Fe, Argentina). Posteriormente, los animales fueron alojados y mantenidos en nuestras instalaciones de investigación. Las evaluaciones sanitarias proporcionadas por el proveedor confirmaron la ausencia de patógenos virales, bacterianos y parasitarios conocidos en la colonia.

Los ratones tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento, y fueron alojados en jaulas de acero inoxidable en un ambiente controlado con temperatura constante de 22 ± 2 °C y un ciclo lumínico de 14 horas (de 06:00 a 20:00 horas). Se garantizó el bienestar animal mediante evaluaciones diarias del estado general, comportamiento y condiciones del hábitat, lo que permitió detectar y atender oportunamente cualquier signo de estrés o alteración en la salud.

Tras un período de aclimatación de dos semanas, durante el cual los animales se adaptaron a las condiciones del nuevo entorno, se iniciaron los experimentos. Todos los procedimientos realizados se describen conforme a las directrices ARRIVE (Percie du Sert et al., 2020). Además, los protocolos experimentales cumplieron con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la academia nacional de ciencias de EE.UU. y contaron con la aprobación del Comité Asesor de Ética y Seguridad en Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-UNL, Santa Fe, Argentina (permiso CE: CE2018-61-C).

3.3.2. Diseño experimental

Se realizaron cruza de machos C57BL/6 con hembras de la misma cepa y se alojó cada pareja en jaulas individuales. El día en que se observó la presencia de un tapón vaginal se consideró como dg0 (**Figura 16, panel a**). Las hembras gestantes se distribuyeron en dos grupos, y fueron tratadas siguiendo protocolos previos.

Las ratonas gestantes C57BL/6 fueron afeitadas en la región dorsal y se les administraron aplicaciones tópicas diarias de 50 mg de BP3 por kg de peso corporal (kg.pc), o aceite de oliva virgen extra (vehículo) (Aceite de oliva virgen extra Tres Marías, San Juan, Argentina). El grupo tratado con BP3 contó con 10 hembras, mientras que el grupo control (vehículo) incluyó 9 hembras.

A partir del dg9, se aplicó diariamente BP3 o el aceite de oliva sobre la piel rasurada del dorso de las ratonas hasta el destete, dpn21. Durante todo el período, se registró diariamente el peso de las madres gestantes (F0). En el día del parto se anotaron el número, sexo y peso de las crías (generación F1). Además, durante el período de lactancia se registró el peso de las crías.

3.3.3. Evaluación de la fertilidad por cría continua (FACB) de las crías F1

Tras el destete, machos y hembras de la generación F1 se mantuvieron separados. Las hembras fueron monitoreadas diariamente hasta la aparición de la apertura vaginal. Entre los 7 y 10 días posteriores a la apertura vaginal (lo que correspondió cronológicamente a una edad aproximada de entre 39 y 42 días postnatales, o 6 semanas de vida), se realizaron frotis vaginales diarios durante 30 días para evaluar la regularidad de los ciclos estrales (**Figura 16, panel b**).

A las 11 semanas de edad (dpn77), se seleccionó al azar una hembra y un macho F1 que estuvieron expuestos a BP3, y se alojaron juntos durante un período de 6 meses. Estas parejas reproductoras, formadas con machos y hembras del grupo BP3, fueron sometidas a un protocolo de FACB (**Figura 16, panel b**), adaptado de estudios previos (Cabaton et al., 2011; Lamb et al., 1985).

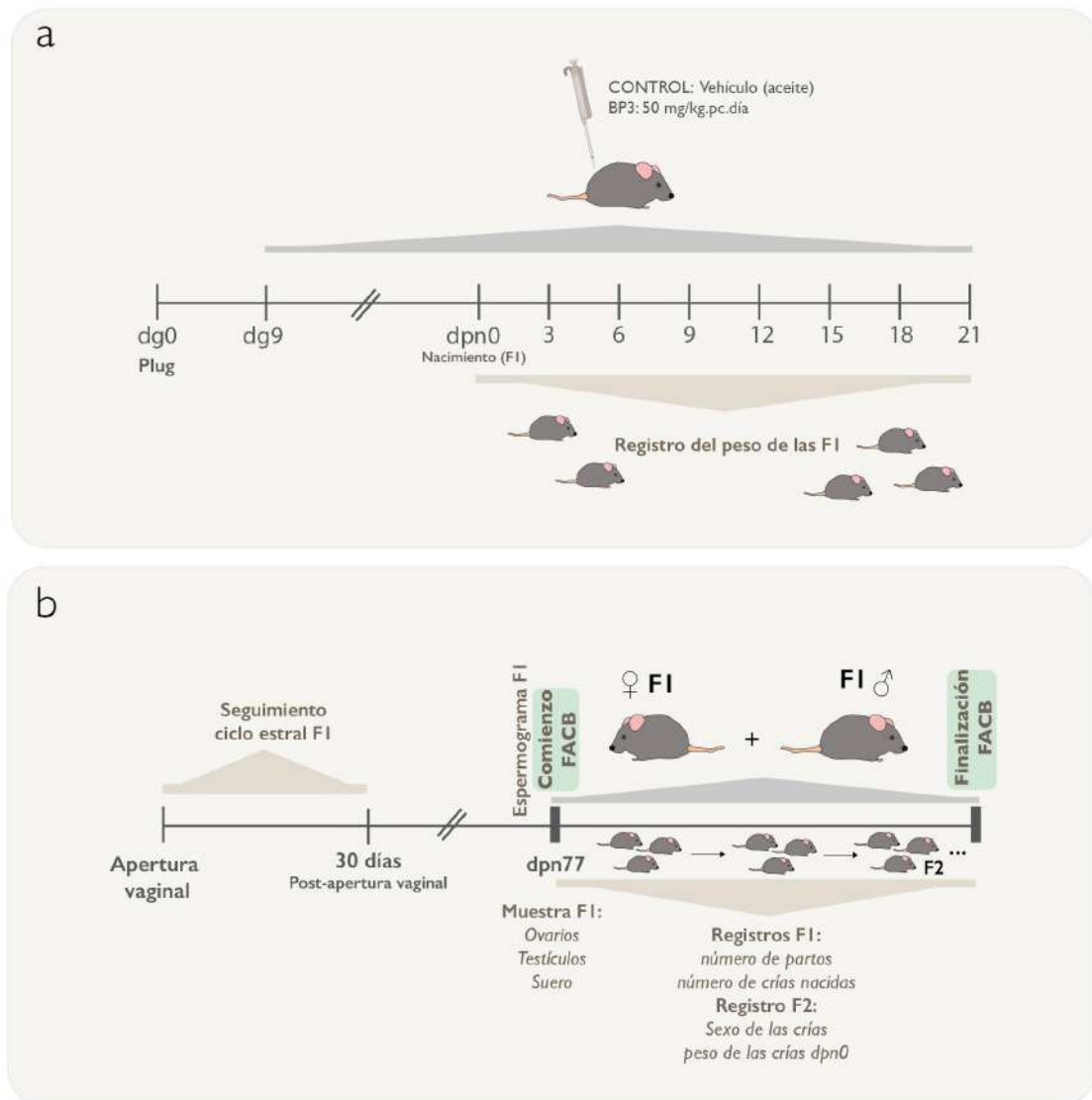


Figura 16: *Diseño experimental.* a) Tratamiento de las hembras preñadas (F0): Las hembras gestantes fueron tratadas mediante aplicaciones tópicas de 50 mg de BP3/kg de peso corporal/día o aceite de oliva (vehículo) desde el dg9 hasta el dpn21. Se registró el peso de las crías F1 en intervalos de 3 días, desde el dpn0 hasta el dpn21. b) Evaluación de la fertilidad mediante el FACB en la generación F1: Se controló la apertura vaginal a partir del dpn21, seguido de la observación diaria de extendidos vaginales durante 30 días. En el dpn77, se realizaron recuentos espermáticos en los machos de la descendencia. Se seleccionaron un macho y una hembra F1 de cada camada para ser sometidos a un período de 6 meses de FACB. En los animales F1 que no fueron seleccionados para FACB, se recolectaron muestras de ovarios, testículos y suero para análisis posteriores. Se registró el número de partos y el número de crías por hembra progenitora, mientras que para la generación F2 se registraron el peso al nacer y la proporción de sexos.

Las jaulas de las parejas F1 fueron observadas diariamente. En el día de cada parto, las crías de la generación F2 fueron separadas de la madre, y se registraron el número, sexo y peso de los neonatos, mientras que la hembra F1 quedó en su jaula con el macho F1 continuando con el protocolo.

Se registraron los siguientes parámetros: tiempo transcurrido hasta la primera camada, número de partos (fertilidad) por madre/pareja, número de neonatos por camada (fecundidad), así como el número de ratones que lograron tener por cada camada. Además, se documentó el número, sexo y peso de las crías vivas F2 al momento del parto.

Las crías F1 no seleccionadas para el protocolo FACB fueron sacrificadas mediante exposición a una atmósfera saturada de CO₂ seguida de decapitación, y se recolectaron muestras de ovarios, testículos y suero para análisis posteriores (véase más adelante). En los machos sacrificados en dpn77 también se realizó el recuento de espermatozoides (**Figura 16, panel b**).

3.3.4. Selección de la dosis

Se seleccionó una dosis que refleja los niveles de exposición humana tras la aplicación dérmica de BP3 en todo el cuerpo. La dosis de 50 mg/kg.pc/día se basa en el estudio de Janjua et al. (2008) y fue validada en una publicación reciente de nuestro grupo (Santamaria et al., 2020). En el estudio de Janjua et al (2008), se aplicaron 2 mg de una formulación de crema con 10% (p/p) de BP3 por centímetro cuadrado de superficie corporal. Para una mujer promedio con una superficie corporal de 1,73 m², la cantidad total de crema aplicada fue aproximadamente 34.600 mg. Considerando un peso corporal medio de 68kg, la dosis de BP3 en dicho estudio correspondió a aproximadamente 50,88 mg/kg de peso corporal.

Dado que no se recomienda el escalado alométrico para fármacos administrados por vía tópica, nasal, subcutánea o intramuscular (Nair & Jacob, 2016), esta dosis fue adaptada directamente a 50 mg/kg.pc/día para ratones. Las concentraciones séricas observadas en nuestro modelo murino (dosis interna, según lo reportado en Santamaría et al., 2020) son coherentes con las concentraciones plasmáticas observadas 1 a 2 horas tras una única aplicación y documentadas en un ensayo clínico aleatorizado reciente en humanos, (Matta et al., 2020, suplemento 3).

3.3.5. Procedimiento de administración del compuesto

Se preparó una solución de trabajo de BP3 a una concentración de 10 mg/ml, utilizando aceite de oliva como vehículo. La dosis prevista para la aplicación fue de 50 mg/kg.pc/día. Para mejorar la absorción dérmica, se rasuró cuidadosamente el pelaje dorsal de los ratones antes de la aplicación.

La solución se aplicó directamente sobre la piel de los animales utilizando una micropipeta previamente calibrada, ajustando el volumen según el peso corporal de

cada ratón para asegurar una dosificación precisa. Por ejemplo, un ratón de 20 g recibió 100 µl de la solución, equivalente a 1 mg de BP3.

Tras la aplicación, los ratones se colocaron en una jaula limpia, sin ropa de cama ni materiales absorbentes, para garantizar que el compuesto tuviera tiempo suficiente para su completa absorción cutánea. Los animales fueron observados continuamente hasta confirmar que no quedaban residuos de la solución en la piel, momento en que fueron devueltos a sus jaulas originales.

Este procedimiento se realizó sin oclusión, ya que la absorción de la solución fue rápida, ocurriendo generalmente entre 10 y 30 segundos. El objetivo fue reproducir una exposición dérmica realista, similar a posibles escenarios de exposición humana, buscando maximizar la absorción a través de la piel sin alterar artificialmente la biodisponibilidad del compuesto.

3.3.6. Recuento de espermatozoides

Algunos machos F1 fueron seleccionados en dpn77 para realizar un análisis de recuento espermático, siguiendo protocolos previamente establecidos (Pagotto et al., 2020).

Para ello, se realizaron pequeñas incisiones en la cola del epidídimo, la cual se colocó en 1 ml de medio HTF (Irvine Scientific) a 37 °C durante 10 minutos, permitiendo la liberación de los espermatozoides. Posteriormente, se realizó una dilución 1:20 de la suspensión obtenida, y se procedió al recuento utilizando una cámara de Neubauer (**Figura 17**).

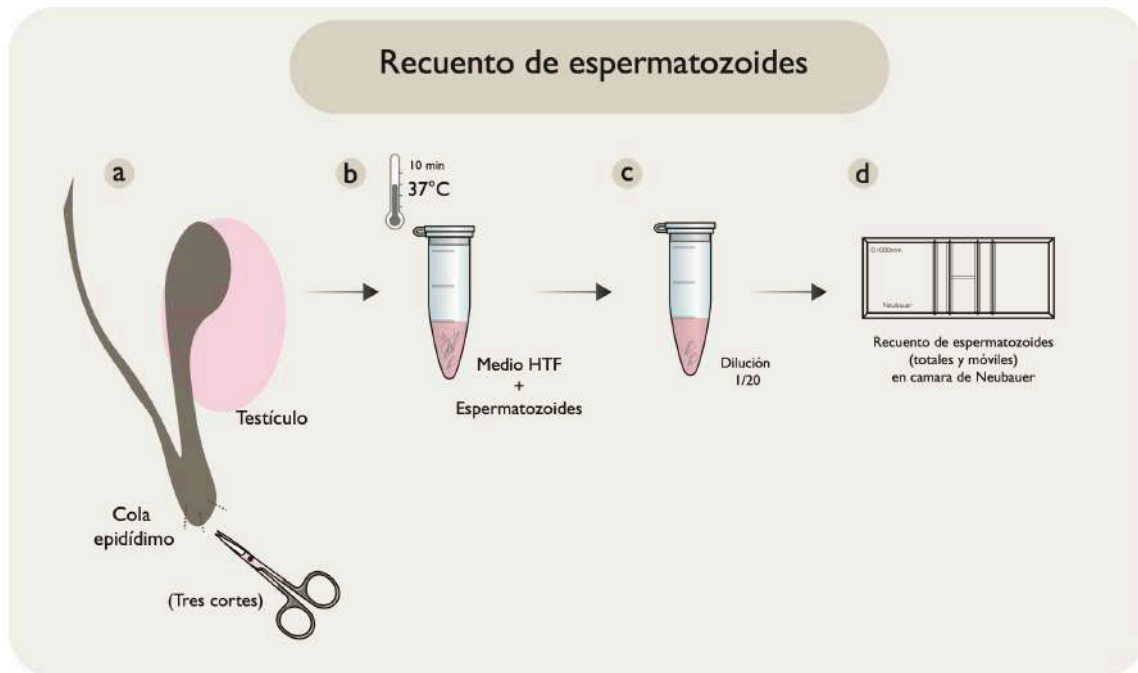


Figura 17: Protocolo de recuento de espermatozoides en machos F1. Representación esquemática del procedimiento realizado en el dpn77. a) Obtención de espermatozoides mediante tres incisiones en la cola del epidídimo. b) Incubación de la muestra en 1 ml de medio HTF a 37 °C durante 10 minutos para permitir la liberación de los gametos por natación activa (*swim-out*). c) Preparación de una dilución 1:20 de la suspensión espermática. d) Recuento de espermatozoides totales y móviles utilizando una cámara de Neubauer bajo microscopía óptica. La concentración final (espermatozoides/ml) se determinó considerando el factor de dilución y el volumen de la cámara. Fuente: Elaboración propia, adaptado de Pagotto et al. (2020).

El número total y móvil de espermatozoides se calculó multiplicando el conteo observado por el recíproco del factor de dilución y luego por 10.000, con el fin de obtener la concentración expresada como espermatozoides por mililitro.

3.3.7. Análisis de la dinámica folicular de hembras F1

La dinámica folicular fue evaluada antes del inicio del protocolo FACB, siguiendo metodologías previamente descritas por nuestro grupo (Rodríguez et al., 2010; Santamaría et al., 2016). En resumen, los ovarios fueron fijados en formol-buffer al 10 % durante toda la noche a temperatura ambiente, y posteriormente incluidos en parafina. Los ovarios fueron seccionados íntegramente mediante cortes en serie de 5 µm de espesor; luego se tiñó una de cada diez secciones con la técnica de picrosirius-hematoxilina (P/H) (Santamaría et al., 2019). El recuento de ovocitos totales como el de folículos primordiales (**Figura 18, panel a**) se realizó mediante un microscopio Olympus BH2 con un aumento de 400X.

Los parámetros analizados fueron los siguientes:

- a) Número total de ovocitos por micrómetro cuadrado.
- b) Número total de ovocitos por sección.
- c) Número total de folículos primordiales por micrómetro cuadrado.

- d) Número total de folículos primordiales por sección.
- e) Porcentaje de folículos primordiales respecto del total.

Para relacionar el recuento de ovocitos totales como el de folículos primordiales por el área del ovario (**Figura 18, panel a**) se determinó la superficie de cada sección histológica en micrómetros cuadrados utilizando el software Image-Pro Plus 5.0.

3.3.8. Diámetro de los folículos primordiales

El análisis del diámetro de los folículos primordiales se realizó utilizando las mismas secciones histológicas empleadas para el recuento total de los folículos primordiales (**Figura 18, panel a**) Con el software Image-Pro Plus 5.0 se midió el diámetro mayor (en micrómetros (μm)) de aquellos ovocitos cuyos núcleos estaban claramente visibles en el plano de corte (**Figura 18**).

El análisis de los datos se llevó a cabo siguiendo protocolos previamente establecidos (Saatcioglu et al., 2016).

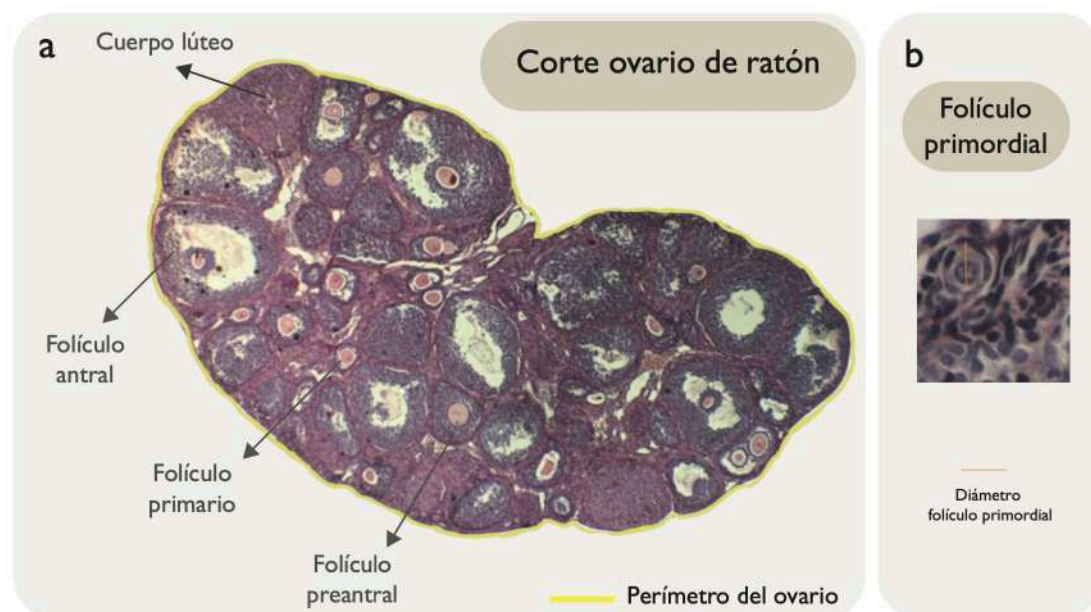


Figura 18: Análisis de la dinámica folicular y morfometría en ovarios de hembras F1. a) Micrografía representativa analizada a 40X de una sección transversal de ovario de ratón (5 μm) teñida con la técnica de Picrosirius-Hematoxilina (P/H). Se observa la distribución de los estadios foliculares: folículos primordiales, primarios, preantrales, antrales y cuerpo lúteo. Se señala el perímetro del ovario (línea amarilla), cuya superficie fue determinada mediante el software Image-Pro Plus 5.0 para el cálculo de la densidad folicular (número de ovocitos/ μm^2). b) Detalle de un folículo primordial analizado a 400X. La línea naranja representa la medición del diámetro mayor del ovocito, realizada únicamente en aquellos folículos con núcleo visible en el plano de corte.

3.3.9. Medición de estradiol, progesterona y testosterona

Previo a la medición hormonal, y dado el bajo volumen sanguíneo de las crías que imposibilita alcanzar el volumen mínimo requerido por el ensayo de manera individual, se conformaron pools de suero (200 µl por pool). Estos pools se generaron a partir de muestras séricas obtenidas de crías hembras F1 sacrificadas antes del inicio del protocolo FACB. En total, se conformaron 7 pools del grupo control (n=16 hembras F1) y 10 pools del grupo BP3 (n=24 hembras F1). Posteriormente, con el objetivo de aislar selectivamente las hormonas esteroideas y eliminar posibles interferencias de la matriz del suero murino que afectarían la lectura, la extracción hormonal se llevó a cabo mediante éter sulfúrico, y los extractos resultantes fueron reconstituidos en 0,5 ml de una solución de gelatina al 0,1 % en PBS-EDTA (Portelinha et al., 2015).

Las concentraciones de hormonas sexuales se determinaron mediante el método ECLIA (Electrochemiluminescence Immunoassay, Roche) con los siguientes parámetros:

E₂: expresado en pg/ml, con un límite de detección de 5 pg/ml.

P₄: expresada en ng/ml, con un límite de detección de 0,05 ng/ml.

T: expresada en ng/ml, con un límite de detección de 0,03 ng/ml.

Todas las determinaciones hormonales se realizaron en el laboratorio Alkemy (Santa Fe, Argentina) (<https://alkemy.com.ar/>), siguiendo protocolos estandarizados y procedimientos de control de calidad.

3.3.10. Estadística

Los datos se expresaron como promedio $\pm$ S.E.M. o como mediana, según correspondiera. La normalidad de la distribución de los datos, específicamente para los análisis de número de partos por madre y número de crías por madre en el protocolo FACB, se evaluó mediante la prueba de Anderson-Darling. En los casos con distribución normal, se aplicó una prueba t de Student de muestras independientes para la comparación entre grupos.

Para el análisis de pesos corporales, se calculó el promedio de cada camada a partir de los pesos individuales. Estos promedios se utilizaron como unidad experimental para la comparación entre grupos. Los pesos se analizaron con una prueba t no apareada en cada punto temporal evaluado.

En aquellos análisis donde no se observó una distribución normal, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

3.4. Resultados

Las hembras F0 tratadas con BP3 desde el dg9 hasta el dpn21 no presentaron alteraciones significativas en la ganancia de peso durante la gestación (**Figura 19, panel a**) ni durante la lactancia (**Figura 19, panel b**). Asimismo, la duración de la gestación en las madres expuestas a BP3 fue comparable a la observada en el grupo control (**Figura 20**), lo que indica que el tratamiento no afectó el tiempo transcurrido hasta el nacimiento de la primera camada (F1).

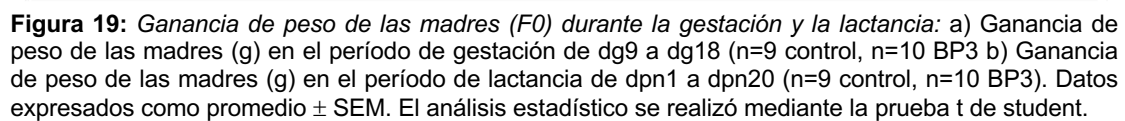


Figura 20: *Duración de la gestación de las madres (F0):* Duración de la gestación (días) de las madres expuestas a BP3 de gd9 a pnd21 (n=9 control, n=10 BP3). Datos expresados como mediana. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann Whitney.

3.4.2. La exposición a benzofenona-3 no tuvo efecto sobre el número de crías ni sobre la proporción de sexos en la progenie

El número de crías por camada y por madre en las hembras F0 expuestas a BP3 fue comparable al grupo control (**Tabla 1**). Del mismo modo, en la proporción de sexos en la descendencia F1 (% de hembras sobre el total) no se observaron alteraciones (**Tabla 1**). Estos resultados indican que la exposición perinatal a BP3 no afectó ni la fecundidad de las madres F0 ni la proporción de sexos en la progenie F1.

Tabla 1: *Parámetros reproductivos de hembras F0 y proporción de sexos en la progenie F1.* Para este análisis, el número de muestras (camadas evaluadas) fue de n=12 para el grupo control y n=10 para el grupo expuesto a BP3. Los valores correspondientes al número de crías por madre se expresan como el promedio $\pm$ SEM y fueron comparados mediante la prueba t de Student. La proporción de sexos en la descendencia se presenta como el porcentaje (%) de hembras sobre el total de la camada y su análisis estadístico se realizó mediante el test exacto de Fisher.

Número de crías nacidas (promedio ±SEM)			
CONTROL		BP3	
7,5 ± 1,26		7,6 ± 1,26	
Sexo de las crías nacidas (%)			
% Hembras		% Machos	
CONTROL	BP3	CONTROL	BP3
40	50	60	50

3.4.3. La ganancia de peso de la progenie F1 durante la lactancia fue alterada transitoriamente por la exposición a benzofenona-3

Se observó una disminución transitoria del peso durante el período de lactancia de las crías F1 nacidas de madres expuestas a BP3. Esta disminución duró más tiempo en los machos que en las hembras. La disminución del peso de las hembras F1 se observó sólo en dpn15 y dpn18 (**Figura 21, panel a**). Los machos mostraron una disminución significativa de su peso desde dpn3 hasta dpn18 (**Figura 21, panel b**). En el dpn21, tanto las hembras como los machos F1 del grupo BP3 mostraron pesos similares a los de las crías F1 de control.

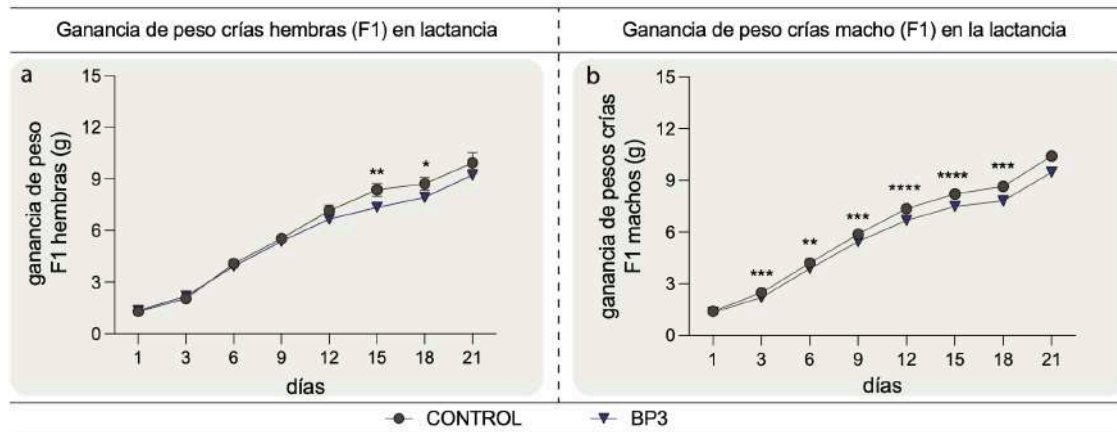


Figura 21: Pesos de las crías F1 nacidas de madres F0 expuestas a BP3 y a vehículo durante la lactancia: a) Peso (g) de las crías hembras (n=8 control; n=10 BP3) b) Peso (g) de las crías machos (n=12 control; n=19 BP3). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t no apareada; los datos se expresan como media $\pm$ SEM. *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001; ****:p<0,0001 vs. control.

3.4.4. La exposición a benzofenona-3 no alteró el inicio de la pubertad ni el ciclo estral en las hembras F1

Los pesos ováricos y testiculares de las crías F1 (**Tabla 2**) no mostraron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 2: Pesos de ovarios y testículos en la progenie F1. Para este análisis, el número de muestras para los pesos ováricos fue de n=15 para el grupo control y n=20 para el grupo expuesto a BP3; para los pesos testiculares, el número de muestras evaluadas fue de n=33 para el grupo control y n=25 para el grupo expuesto a BP3. Los valores se expresan en miligramos (mg) como el promedio $\pm$ SEM. La comparación estadística se realizó mediante la prueba t de Student.

Pesos de ovarios(mg) (promedio $\pm$ SEM)	
CONTROL	BP3
6,8 $\pm$ 0,8	5,6 $\pm$ 0,4
Pesos de testículos (mg) (promedio $\pm$ SEM)	
CONTROL	BP3
104,0 $\pm$ 2,4	110,5 $\pm$ 1,8

Asimismo, ni el día de apertura vaginal ni las características del ciclo estral se vieron alterados en las hembras F1 expuestas a BP3 (**Tabla 2**). No se observaron variaciones significativas en el número de ciclos ni en la duración del estro en comparación con el grupo control, demostrando que la exposición perinatal a BP3, desde el dg9 hasta el día postnatal dpn21, no tiene un impacto evidente sobre el inicio de la pubertad ni sobre la regularidad del ciclo estral en las hembras F1.

Tabla 3: Análisis del ciclo estral y del inicio de la pubertad (apertura vaginal): registramos varios parámetros: el día de la apertura vaginal, los días en estro por ciclo, los días en estro por mes, el número de ciclos por mes y la longitud de los ciclos en días, registrados en un período de 30 días (n=23 control, n=24 BP3). El análisis estadístico se realizó mediante prueba t no apareada. Los datos se muestran como promedio $\pm$ SEM.

Análisis del ciclo estral e inicio de la pubertad		
	CONTROL	BP3
Día de apertura vaginal	32.0 ± 5.0	32.0 ± 6.0
Días en estro/ciclo	2.4 ± 0.5	2.2 ± 0.4
Días en estro en un mes	16.7 ± 4.0	16.7 ± 2.0
Números de ciclos en un mes	7.3 ± 1.0	7.7 ± 1.0
Longitud del ciclo (días)	4.0 ± 0.8	3.7 ± 0.4

3.4.5. Benzofenona-3 provocó una disminución del porcentaje de folículos primordiales en los ovarios de hembras F1, sin afectar el número de espermatozoides

El análisis de las poblaciones de células germinales en los ovarios (**Figura 22**) reveló diferencias significativas entre el grupo BP3 y el grupo control. En el dpn77, antes del inicio del protocolo FACB, tanto el número total de ovocitos (**Figura 22, panel a**) como el número (**Figura 22, panel b**) y el porcentaje (**Figura 22, panel d**) de folículos primordiales se encontraron significativamente reducidos en los ovarios de las hembras F1 nacidas de madres expuestas a BP3. Además, el diámetro de los ovocitos en los folículos primordiales (**Figura 22, panel f**) también presentó una disminución significativa en el grupo BP3 respecto del control.

En contraste, no se observaron diferencias significativas en el número (**Figura 22, panel c**) ni en el porcentaje (**Figura 22, panel e**) de folículos antrales entre los grupos.

Por otro lado, los recuentos de espermatozoides móviles y totales evaluados a los 77 días de edad (dpn77) fueron similares entre los grupos (**Tabla 4**) lo que indica que la exposición a BP3 no afectó la espermatogénesis en los machos F1 en el momento previo al inicio del protocolo FACB.

En conjunto, estos resultados indican que al inicio del protocolo de FACB, las hembras F1 expuestas perinatalmente a BP3 presentaban una reserva ovárica disminuida, mientras que los machos mantenían una producción espermática normal.

Tabla 4: Recuento de espermatozoides móviles y totales. El número de muestras evaluadas fue de 15 para el grupo control y 17 para el grupo expuesto a BP3. Los resultados se presentan como promedio ± SEM. Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando la prueba t de Student de muestras independientes para la comparación entre grupos.

Recuento de espermatozoides móviles (promedio ±SEM)	
CONTROL	BP3
3,5 × 10 ⁶ ± 0,6 × 10 ⁶	3,8 × 10 ⁶ ± 0,3 × 10 ⁶

Recuento de espermatozoides totales (promedio $\pm$ SEM)	
CONTROL	BP3
$6,8 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$

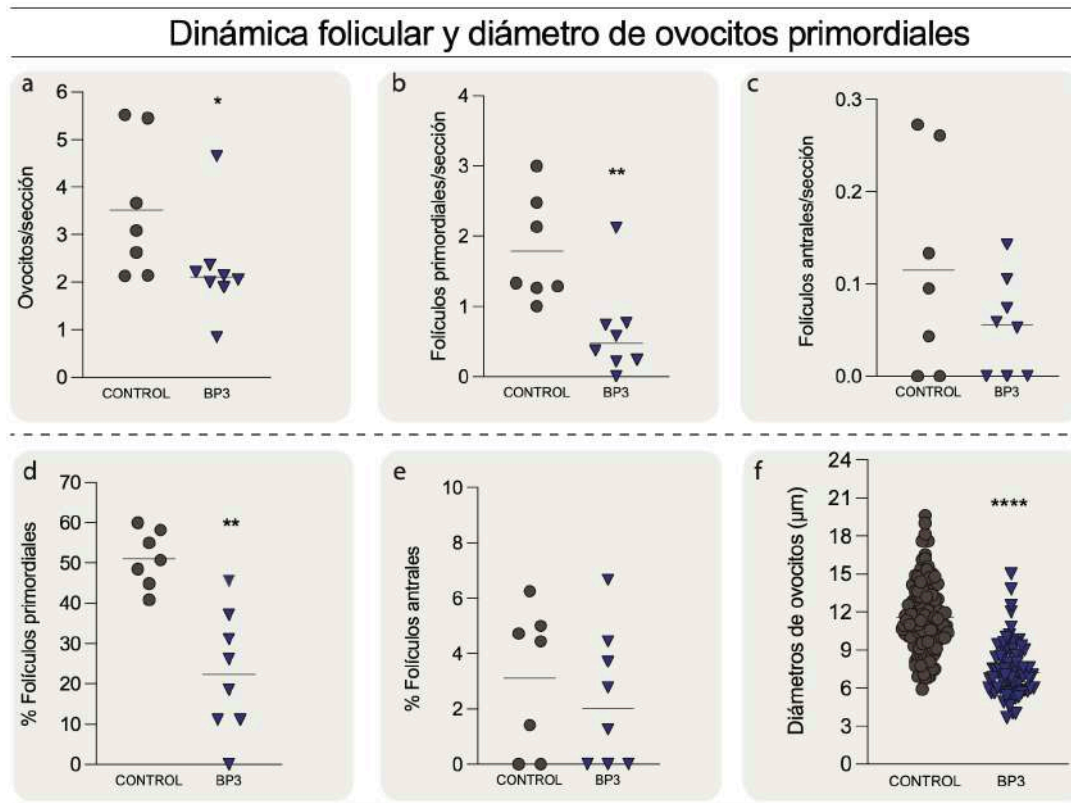


Figura 22: Análisis de los folículos ováricos en ratones expuestos a BP3 antes del inicio del protocolo FACB: a) Número de ovocitos por sección, b) Número de folículos primordiales por sección, c) Número de folículos antrales por sección, d) Porcentaje de folículos primordiales, e) Porcentaje de folículos antrales, f) Medición del diámetro de los folículos primordiales. En los gráficos a, b y c, el número de animales evaluados fue n=7 control y n=8 BP3, mientras que en el gráfico f se muestra el número de ovocitos analizados (n=113 control; n=75 BP3). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney. Los datos se expresan como mediana. *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001 vs. Control.

3.4.6. Los niveles hormonales fueron similares entre las hembras F1 de ambos grupos

Se midieron los niveles séricos de hormonas sexuales en las hembras F1 durante la fase de estro del ciclo estral. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en los niveles de E₂ (Figura 23, panel a), P₄ (Figura 23, panel b) ni T (Figura 23, panel c). Estos resultados indican que la exposición perinatal a BP3 no tuvo un efecto detectable sobre el perfil hormonal basal de las hembras F1 durante el estro, lo que sugiere que, al menos en esta fase del ciclo, la función endocrina ovárica no se vio comprometida por el tratamiento.

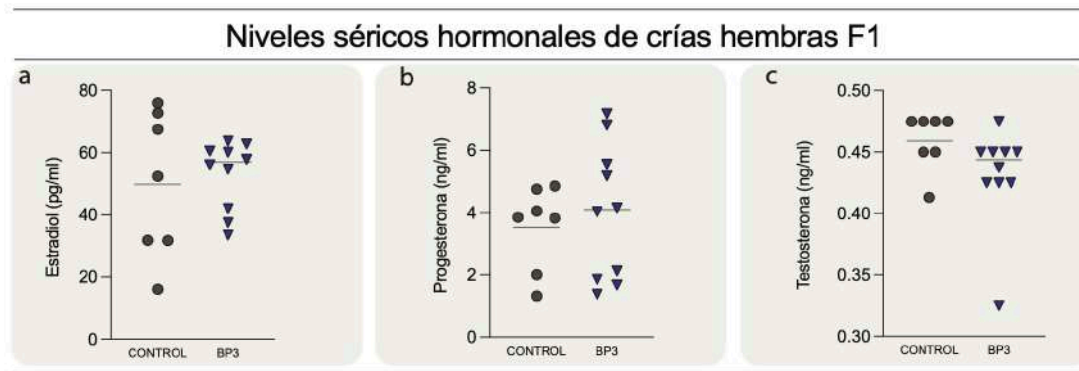


Figura 23: Medición de los niveles hormonales en suero de crías expuestas perinatalmente a BP3 antes del inicio del protocolo FACB. Se evaluaron los niveles de las siguientes hormonas: a) E_2 (pg/ml), b) P_4 (ng/ml), c) T (ng/ml). Número de pools de suero analizados: n=7 control, n=10 BP3. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney; los datos se expresan como mediana.

3.4.7. La exposición a benzofenona-3 resultó en una disminución de la fertilidad de la F1.

La implementación del protocolo FACB nos permitió evaluar los parámetros y resultados reproductivos de los ratones expuestos al compuesto de interés durante un período prolongado. Esta evaluación integral proporciona información valiosa sobre los efectos potenciales del compuesto en la fertilidad, las tasas de natalidad, las características de las crías y la salud reproductiva general.

El estudio FACB abarcó una duración de 6 meses, la cual se dividió en 4 períodos (P) para el análisis. El P1 comprendió los días 0 a 46, el P2 cubrió los días 47 a 74, el P3 abarcó los días 77 a 105, y el P4 se extendió desde el día 106 al 180. Durante cada período, analizamos el número de partos por madre (**Figura 24, panel a**) y el número de crías por madre (**Figura 24, panel b**). También analizamos los pesos de las crías F2 nacidas y la proporción de sexos (% hembras/total) (**Tabla 5**).

No observamos alteraciones en los pesos (**Tabla 5**) ni en proporción de sexos (**Tabla 5**) en F2. Se observó una tendencia a la disminución en el número de partos por madre en el período P3 en el grupo BP3. Esta tendencia se volvió significativa en P4, cuando la F1 nacida de madres expuestas a BP3 mostró una disminución significativa en el número de partos, indicando un declive en la fertilidad.

En cuanto al número de crías por madre, se registró una disminución en P4, aunque no alcanzó significancia estadística.

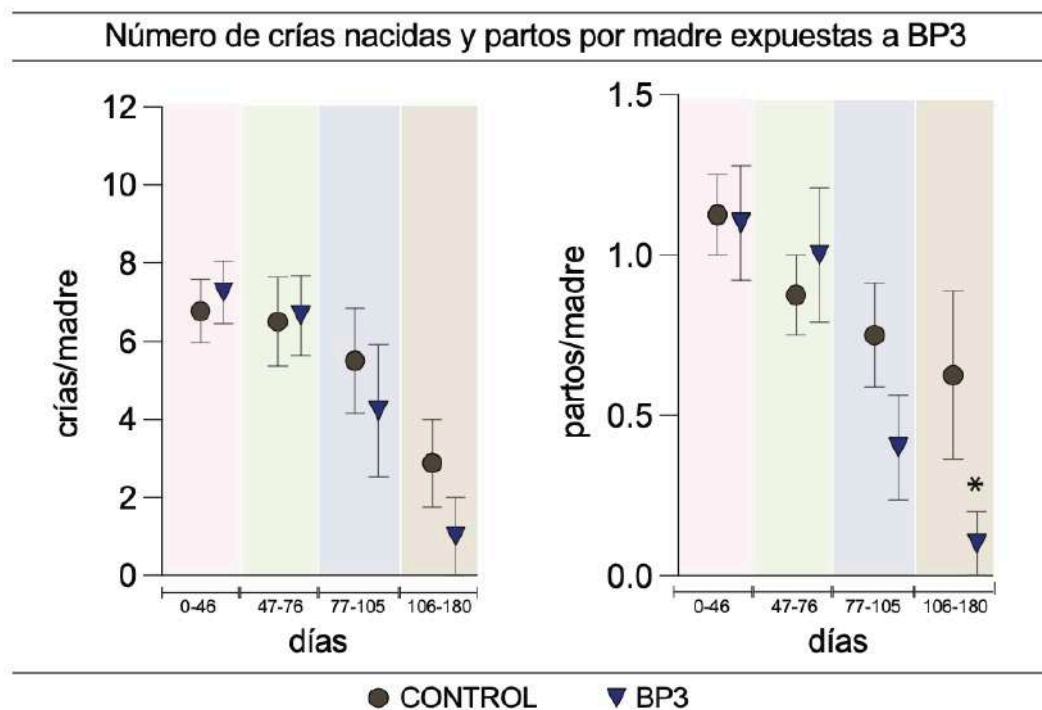


Figura 24: Número de partos y número de crías nacidas durante el FACB a partir de ratones F1 expuestos perinatalmente a BP3: a) Número de crías por madre (n=8 CONTROL, n=10 BP3) en FACB con una duración de 6 meses analizados en diferentes periodos (P): P1 día 0-46, P2 día 47-76, P3 día 77-105 y P4 día 106-180. b) Número de crías por madre (n=8 CONTROL; n=10 BP3) por parto en FACB con una duración total de 6 meses analizados en diferentes periodos: P1 día 0-46, P2 día 47-76, P3 día 77-105 y P4 día 106-180. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t no pareada, los datos se expresan como promedio $\pm$ SEM. *p=0.005 vs. control. La distribución normal de los datos se evaluó con la prueba de Anderson-Darling.

Tabla 5: Parámetros físicos y proporción de sexos en la descendencia F2. Los pesos se expresan como promedio $\pm$ SEM (n=47 CONTROL; n=39 BP3). La proporción de sexos se expresa en porcentajes y se calculó sobre el total de individuos nacidos (n=174 CONTROL; n=224 BP3). No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo expuesto a BP3 en ninguno de los parámetros evaluados. Notablemente, en P4, solo 1 de las 10 hembras de BP3 dio a luz (10 crías), mientras que en el grupo de control 4 de 8 madres dieron a luz.

Pesos crías F2 (mg) (promedio ±SEM)			
CONTROL		BP3	
1,38 ± 0,02		1,39 ± 0,01	
Proporción de sexos en crías F2			
CONTROL		BP3	
% Hembras	% Machos	% Hembras	% Machos
48,8	51,8	53	47

3.5. Discusión

Es un hecho que estamos continuamente expuestos a sustancias químicas incluidas en PCP que pueden afectar nuestra salud. El BP3 se utiliza habitualmente en protectores solares y otros PCP debido a su eficacia bloqueadora de la radiación

UV; sin embargo, varios estudios han evidenciado que el BP3 puede actuar como PE (Krause et al., 2012; Mustieles et al., 2023; Santamaria et al., 2020).

Previamente, observamos que la exposición dérmica a BP3 durante las primeras fases de la gestación (dg0-dg6) provoca restricción del crecimiento fetal (RCF) en ratones, demostrando que la primera semana de gestación es un período sensible. Por otro lado, cada vez hay más evidencia de que el período perinatal también representa una ventana de desarrollo sensible a la acción de los DEs (Altamirano et al., 2015, 2017; Gámez et al., 2015; Gomez et al., 2017; Padmanabhan et al., 2016; Reynolds & Caton, 2012; Santamaría et al., 2016; Santamaría et al., 2017; Stoker et al., 2020; Vigezzi et al., 2016). Por lo tanto, en este primer experimento, nuestro objetivo fue identificar los efectos sobre los parámetros reproductivos causados por la exposición dérmica a 50 mg/kg pc/día de BP3 o aceite de oliva (vehículo), desde dg9 hasta dpn21.

En una primera instancia, no se observaron diferencias en el peso de las madres, la duración de la gestación, el número de crías por madre, el inicio de la pubertad o la proporción de sexos. Cabe destacar que los pesos de las crías F1 fueron transitoriamente inferiores a los del control durante la lactancia, mientras que el ciclo estral no se vio afectado por el BP3.

No obstante, esta normalidad superficial en el desarrollo temprano ocultaba efectos que solo se manifestaron cuando, las hembras F1 nacidas de madres expuestas a BP3 y sometidas a un protocolo FACB, mostraron una disminución significativa del número de gestaciones. Consideramos este hallazgo como sumamente relevante, ya que demuestra que la aplicación de BP3 en la piel de la madre durante un período de exposición perinatal, incluyendo la lactancia, provocó una disminución de la fertilidad de su descendencia F1: solo una de cada diez hembras de la descendencia F1 nacida de madres expuestas a BP3 quedó preñada en el último período del FACB, en contraste con 4 de 8 en el grupo control. A esto se suma una tendencia a la disminución progresiva del número de crías por madre, lo que indica un declive reproductivo acelerado.

Nuestros resultados actuales contrastan con los reportados previamente por Chapin, 1997 un estudio llevado a cabo para evaluar la toxicidad de BP3 en ratones CD-1. En dicho estudio, los ratones que recibieron hasta 9 g/kg.pc de BP3 mostraron un índice de fertilidad inalterado en parejas compuestas por hembras F1 expuestas y machos jóvenes no expuestos de fertilidad comprobada. Esta discrepancia con nuestros resultados puede explicarse por diferencias en el diseño experimental. En primer lugar, aplicamos un protocolo de FABC a parejas donde ambos miembros (F1)

estuvieron expuestos a los compuestos, para imitar más genuinamente el escenario del mundo real (ver M&M) donde prácticamente el 97% de la población tiene niveles medibles de BP3 en sus cuerpos (Calafat et al., 2008; Silva et al., 2024). El hecho de formar parejas con machos y hembras del grupo BP3, nos permitió buscar alteraciones en las gónadas tanto de machos como de hembras como posibles causas de la fertilidad alterada (Lamb et al., 1985). En segundo lugar, utilizamos una dosis mucho más baja de la reportada como menor dosis en el estudio de Chapin (1997) (50 mg/kg.pc frente a 1800 mg/kg.pc). Como es habitual en el campo de la disrupción endocrina, la presentación de efectos perjudiciales a dosis bajas y la ausencia de efecto a dosis más altas es un hallazgo frecuente.

Es importante señalar que este cuadro de subfertilidad temprana se ha reportado para otros DEs estrogénicos, como el BPA y el dietilstilbestrol (DES). En este sentido, la administración de BPA por vía oral desde dg8 hasta el destete provocó una reducción dosis-dependiente de la capacidad reproductiva en hembras de ratón, evidenciado por un menor número acumulado de crías similar a lo descrito previamente en ratones expuestos durante el desarrollo a DES, compuesto ampliamente reconocido por su impacto negativo sobre la reproducción humana (Cabaton et al., 2011; McLachlan et al., 1982).

En conjunto, estos resultados demuestran que la exposición perinatal a BP3 provoca una caída de fertilidad en la descendencia F1. Por tanto, nos preguntamos si este efecto podría estar mediado por alteraciones en las poblaciones de células germinales antes del inicio del FACB. Al respecto, en los machos F1 nacidos de madres expuestas a BP3, observamos valores de parámetros espermáticos normales (resultados consistentes con lo reportado por Nakamura et al., (2015), mientras que vimos que los niveles de E2, P4 y T eran similares al control en hembras F1. Sin embargo el panorama en los ovarios fue distinto. Encontramos una reducción en reserva de células germinales en las hembras, evidenciada por un menor número en el total de ovocitos y una caída en el porcentaje de folículos primordiales. Además, se observó que los ovocitos de folículos primordiales tenían un tamaño significativamente menor. Basándonos en estos hallazgos, la aparición temprana de subfertilidad en hembras F1 nacidas de madres expuestas a BP3 se asocia con un declive acelerado de la reserva ovárica, evidenciado por una caída del stock de ovocitos y de la población de folículos primordiales.

Estos resultados se agregan a la evidencia del impacto de BP3 sobre el ovario reportada tanto por nuestro grupo como por otros. Por un lado, Nakamura et al., 2015 informó retrasos en el desarrollo folicular (por la exposición perinatal a la dosis más

alta de BP3 (50000 ppm), y por nuestra parte, demostramos previamente que la exposición *in vitro* a BP3 alteró la formación del reservorio de células germinales (Santamaría et al., 2019). Utilizando cultivos de ovario completo, encontramos que la concentración más baja (la concentración predicha sin efecto, o PNEC, igual a 1,32 µg/L o 5,8 nM) reducía la población total de ovocitos, así como el número de nidos por ovario, los folículos primarios tempranos, y mostraba una tendencia a la disminución de la cantidad de folículos primordiales y primarios (Santamaría et al., 2019). De esta manera, nuestro estudio actual apoya la idea de que el ovario es un blanco de la acción del BP3 al igual que con otros DEs estrogénicos (Gámez et al., 2015; Jefferson et al., 2006; Rodríguez et al., 2010; Santamaría et al., 2016; Santamaría et al., 2017; Santamaria et al., 2020).

Analizando estos efectos en el marco de la hipótesis DOHaD, el estudio de las ventanas de exposición resulta fundamental. Algunos estudios de toxicidad por exposición repetida durante el desarrollo informaron cambios en la ciclicidad del estro en la descendencia F1 solo cuando BP3 se administraba en la alimentación a dosis superiores a 700 mg/kg de peso corporal/día (Chapin, 1997). En concordancia con esos resultados, no observamos alteraciones en la ciclicidad del estro con nuestra dosis baja. En cuanto a la disminución transitoria del peso en lactancia, la cual también fue reportada previamente por nuestro grupo de trabajo (Santamaria et al., 2020), puede explicarse si consideramos que BP3 fue capaz de alterar la síntesis de proteínas de la leche y su expresión en un modelo de diferenciación *in vitro* de glándulas mamarias, lo que sugiere que una nutrición deficiente durante la lactancia podría contribuir a las disminuciones transitorias del peso de las crías (Altamirano et al., 2015).

Debido al amplio uso de BP3 como filtro UV en protectores solares y cosméticos, la población humana está altamente expuesta a este compuesto (Calafat et al., 2008; Darbre, 2022; Silva et al., 2024). En este contexto, el declive de la fertilidad en la descendencia F1 que observamos en el presente estudio adquiere relevancia, ya que aplicamos BP3 sobre la piel en niveles similares a los que se emplean en el uso regular de protectores solares. Además, hemos demostrado anteriormente que esta dosis dérmica, tras su absorción, genera niveles séricos comparables o incluso inferiores a los reportados en humanos luego de la aplicación tópica de todo el cuerpo (Janjua et al., 2008; Matta et al., 2019; Santamaria et al., 2020). Esto adquiere mayor relevancia al considerar un estudio reciente que evaluó si los niveles urinarios de parabenos, BP3, TCS y BPA estaban asociados con infertilidad autoinformada en la población estadounidense. Aunque no se encontraron

asociaciones significativas cuando BP3, TCS y BPA se analizaron individualmente, sí se observó una asociación positiva con la infertilidad al considerar la exposición combinada a estos compuestos (Arya et al., 2020).

3.6. Conclusiones

Nuestros hallazgos demuestran que la exposición a BP3 durante la gestación y la lactancia provoca la aparición de subfertilidad temprana en las hijas en un modelo murino. La relación entre esta subfertilidad y la disminución del stock de ovocitos y folículos primordiales (junto con recuentos espermáticos normales) sugiere que esta subfertilidad podría estar causada por un agotamiento acelerado de la reserva de células germinales en las hembras F1.

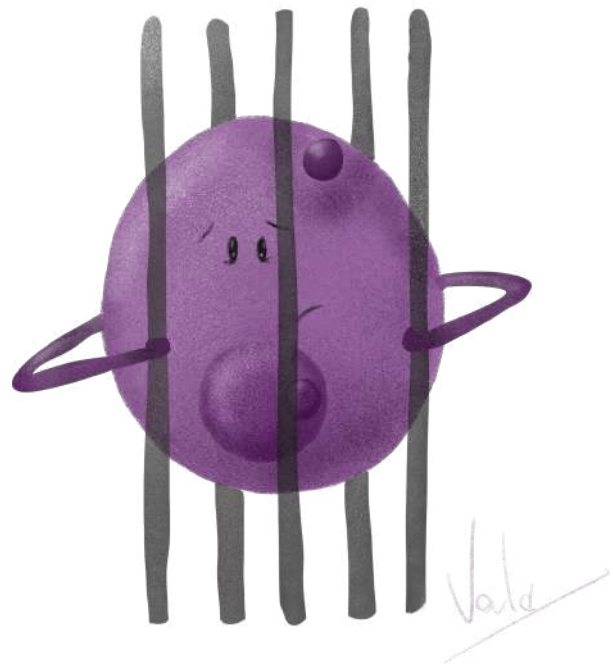
Coincidimos con otros autores en que se necesitan estudios adicionales para comprender mejor los períodos críticos del desarrollo en los que la exposición a filtros UV resulta más perjudicial (Arya et al., 2020; Bergman et al., 2013; Sutton et al., 2016; Wnuk et al., 2022). En este sentido, el conocimiento sobre el impacto del BP3 en el desarrollo fetal y neonatal humano sigue siendo escaso y controvertido (Teiri et al., 2023; Wnuk et al., 2022) lo que refuerza la necesidad de realizar más estudios que aborden la influencia potencial de BP3 (ya sea solo o en combinación con otros compuestos) sobre la fertilidad y el crecimiento neonatal. Por este motivo, se recomienda que las mujeres embarazadas y los niños opten por estrategias alternativas de fotoprotección, priorizando la seguridad durante estas ventanas críticas del desarrollo.

Los hallazgos presentados en este capítulo han sido publicados en la siguiente revista indexada de alto impacto (**Anexo III**: Galliani et al., 2024):

Galliani, V., Abud, J. E., Zenclussen, M. L., & Rodríguez, H. A. (2024). Female offspring of mice perinatally exposed to benzophenone-3 showed early subfertility linked to a poor oocyte stockpile. *Archives of Toxicology*, 98(6). <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03730-5>

Capítulo 2

Benzofenona-3, bisfenol-A y su combinación afectan la respuesta ovárica frente a la estimulación con gonadotrofinas en un modelo de multi-exposición



4. Capítulo 2: Benzofenona-3, bisfenol A y su combinación afectan la respuesta ovárica frente a la estimulación con gonadotropinas en un modelo de multi-exposición

4.1. Introducción

En nuestro grupo de trabajo hemos demostrado previamente que las gónadas son blancos sensibles a la acción del BP3 y el BPA. La exposición perinatal al BPA (50 µg/kg/día) ha mostrado alterar la fisiología ovárica en la descendencia, afectando su respuesta al tratamiento con gonadotropinas exógenas en la adultez (Santamaría et al., 2017). Utilizando dosis más bajas (3 µg/kg/día), se ha observado que BPA provoca alteraciones en el número total de folículos así como en el tamaño de las poblaciones de folículos en crecimiento y atresicos (Gámez et al., 2015). Asimismo, observamos que BP3 puede afectar el desarrollo folicular en etapas tempranas *in vitro* (Santamaría et al., 2019) y, como describimos en el capítulo 1, reducir la reserva ovocitaria en crías hembras expuestas perinatalmente a una dosis de 50 mg/kg/día, resultando en subfertilidad en la vida adulta (Galliani et al., 2024).

Sin embargo, aún persisten interrogantes importantes. Por ejemplo, no está claro si una exposición a BPA en dosis más bajas, acordes a las nuevas regulaciones, podría afectar la respuesta del ovario al estímulo con gonadotropinas. En 2015, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) estableció una ingesta diaria tolerable temporal (t-TDI) de 4 µg/kg.pc/día. No obstante, en 2023, y sobre la base de nueva evidencia inmunotoxicológica, la EFSA propuso una drástica reducción de este umbral a 0,2 ng/kg/día, lo cual fue formalmente adoptado en el Reglamento (UE) 2024/3190 (EFSA, 2023). Si bien la entrada en vigor de esta nueva disposición fue enero de 2025 (European Commission, 2024), cabe destacar que esta transición se estructura mediante plazos diferenciados según la complejidad técnica de la sustitución industrial. Un período general de 18 meses permite la comercialización de la mayoría de los plásticos, adhesivos y revestimientos con BPA hasta julio de 2026. No obstante, para aplicaciones críticas y más complejas, como el barniz externo de envases metálicos o el contacto con alimentos procesados (frutas, hortalizas y pescado), el plazo se extiende a 36 meses, alcanzando enero de 2028. Finalmente, el reglamento contempla una prórroga adicional para el agotamiento de existencias y el uso de artículos de uso repetido, lo que garantiza la presencia legal de estos materiales en el mercado hasta enero de 2029. De este modo, a pesar de la restricción normativa, la población continuará expuesta crónicamente al compuesto durante un proceso de retirada que se dilatará, en la práctica, hasta finales de la década.

De forma similar, aún no se ha evaluado el potencial del BP3 para alterar la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotrofinas, ni los potenciales efectos derivados de la exposición combinada a BP3 y BPA. El estudio de las mezclas de DEs ha sido señalado como muy relevante, dado que refleja con mayor fidelidad el escenario real de exposición a múltiples sustancias que tenemos los seres humanos (Kortenkamp, 2007; Rider et al., 2010).

Por otra parte, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento se han centrado en los efectos tras una única gestación, a pesar de que existe evidencia de que los parámetros endocrinos y reproductivos pueden verse modificados no solo por la exposición a DEs, sino también por el número de gestaciones. En este sentido, la historia reproductiva de la madre puede influir sobre la respuesta fisiológica del organismo frente a exposiciones subsecuentes (Bridges, 2015) modificando así su susceptibilidad a los DEs. Esta sensibilidad diferencial se debería a adaptaciones fisiológicas inducidas por la multiparidad, como cambios en la reserva ovárica, el estado metabólico y la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Merrill et al., 2021; Moon et al., 2023; Rebholz et al., 2012; Vicente et al., 2022). Por lo tanto, evaluar los efectos a lo largo de gestaciones sucesivas ofrece una perspectiva más integradora sobre los riesgos acumulativos asociados a la paridad, un contexto biológicamente relevante que a menudo se pasa por alto en estudios sobre disrupción endocrina.

El presente estudio integra los interrogantes anteriores, investigando los efectos de la exposición prenatal a dosis bajas de BP3, a BPA y a su combinación (BP3+BPA) sobre los parámetros gestacionales y la respuesta ovárica a la administración de gonadotrofinas exógenas en la descendencia de dos gestaciones sucesivas. Al examinar estos efectos a través de múltiples gestaciones, buscamos aportar nuevas perspectivas sobre cómo la exposición acumulativa y la multiparidad pueden influir en los efectos reproductivos del BP3 y el BPA.

4.2. Objetivos

En este experimento nos propusimos investigar los efectos de la exposición prenatal a BP3, BPA y a su mezcla (BP3+BPA) sobre los parámetros gestacionales maternos y la respuesta ovárica a la administración exógena de gonadotrofinas en la descendencia de dos gestaciones sucesivas.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Animales

Se utilizaron 49 hembras de ratón de la cepa C57BL/6, de 6 semanas de edad, con un peso entre 14 y 17 gramos, adquiridas en el Centro de Medicina Comparada - ICIVET Litoral (UNL, CONICET, Santa Fe, Argentina). Al llegar a las instalaciones del laboratorio, los animales fueron alojados durante dos semanas para su aclimatación y adaptación al nuevo entorno. Las evaluaciones sanitarias confirmaron la ausencia de patógenos virales, bacterianos y parasitarios conocidos en los animales provistos por el criadero.

Durante todo el experimento, los ratones tuvieron acceso ad libitum a agua y alimento, y fueron mantenidos en jaulas de acero inoxidable en un ambiente controlado con una temperatura constante de 22 ± 2 °C y un ciclo de luz de 14 horas, desde las 06:00 hasta las 20:00 horas. El bienestar de los animales fue supervisado diariamente, mediante evaluaciones del estado general, comportamiento y condiciones de las jaulas. Este monitoreo continuo permitió detectar de manera oportuna cualquier signo de malestar o problema de salud, asegurando una intervención inmediata.

Finalizado el período de aclimatación, se dio inicio a los procedimientos experimentales. Todas las prácticas realizadas se llevaron a cabo en conformidad con las directrices ARRIVE (Percie du Sert et al., 2020) y respetando los principios establecidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de EE.UU. Además, los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad en la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina (número de permiso CE: CE2018-61-C).

4.3.2. Dosis de benzofenona-3 y bisfenol-A

La solución de BPA (pureza 99%, Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) se administró por vía oral a una dosis de 4 µg/kg.pc/día, ajustada según el peso de cada animal, utilizando la técnica de administración guiada por micropipeta (MDA, por sus siglas en inglés) (**Figura 25**). La técnica MDA consiste en entregar la solución directamente en la cavidad oral del animal mediante una micropipeta calibrada. La administración se considera completa una vez que el animal ha ingerido voluntariamente todo el volumen. La solución se dispensa únicamente mientras el animal lame activamente la punta de la pipeta, sin necesidad de restricción total ni

procedimientos invasivos, lo que minimiza el estrés y permite un control preciso de la dosis y el momento de administración (Schalbetter et al., 2021).

La solución se preparó a partir de un stock de BPA de 4 mg/mL disuelto en etanol absoluto (Merck Chemistry Argentina, Buenos Aires, Argentina). Este stock se diluyó posteriormente 1:1000 en agua, obteniéndose una solución de trabajo final de 4 µg/mL, que se utilizó para administrar la dosis adecuada a cada ratón según su peso. Así, el BPA se disolvió en una solución de etanol/agua, consistente con estudios previos de nuestro grupo (Santamaría et al., 2017). Este vehículo asegura buena solubilidad y palatabilidad, facilitando la ingestión completa mediante MDA (Schalbetter et al., 2021).

La dosis de BPA se seleccionó con base en la ingesta diaria tolerable (TDI) de 4 µg/kg.pc/día. Aunque la EFSA emitió en 2023 un documento con una nueva opinión, recomendando una reducción drástica a 0,2 ng/kg peso corporal/día, que entró en vigor en enero de 2025, su implementación incluyó períodos de transición que permiten la comercialización de muchos productos que contienen BPA hasta distintas fechas, comprendidas entre 2026 y 2028 dependiendo del tipo de producto (Comisión Europea, 2024). Por lo tanto, estas transiciones regulatorias habilitan/permiten que la exposición humana a niveles comparables al TDI previo de 4 µg/kg.pc/día siga siendo plausible y por tanto relevante, reflejando escenarios realistas de exposición humana durante este período de cambio normativo.

Técnica de administración guiada por micropipeta



Figura 25: *Técnica de administración guiada por micropipeta (MDA).* Se muestra el procedimiento de sujeción manual y el posicionamiento del ratón para permitir la ingesta voluntaria de la solución de BPA. A diferencia de la administración por sonda orogástrica (gavage), la técnica MDA se basa en el reflejo de

lamer del animal, eliminando el riesgo de lesiones esofágicas y minimizando el estrés agudo por manipulación. Protocolo e imagen adaptado y modificado de Schalbetter et al. (2021).

La solución de BP3 (pureza 98%, Sigma-Aldrich, Argentina) se aplicó tópicamente siguiendo nuestro protocolo previamente publicado (Galliani et al., 2024; Santamaria et al., 2020). En resumen, BP3 se aplicó sobre el dorso afeitado de los ratones a una dosis de 50 mg/kg.pc/día, ajustada al peso de cada animal. Esta dosis se seleccionó con base en estimaciones de exposición dérmica humana reportadas por Janjua et al. (2008), quienes indicaron una dosis diaria equivalente de ~50 mg/kg peso corporal tras la aplicación de una crema con 10% de BP3. Esta estimación fue respaldada adicionalmente por modelado farmacocinético (Wang & Ganley, 2019). Finalmente, con esta dosis, los niveles séricos alcanzados en nuestro estudio previo (Santamaria et al., 2020) fueron comparables o inferiores a los reportados en humanos (Matta et al., 2019). La solución de BP3 se preparó disolviendo BP3 en aceite de oliva extra virgen en una concentración final de 10 mg/mL (Tres Marías, San Juan, Argentina).

Para validar el solvente utilizado como vehículo en los grupos control, se realizó un experimento piloto comparando tres vehículos diferentes: BPA (0,001% de etanol en agua), BP3 (aceite de oliva) y combinado para BP3+BPA (0,001 % etanol en agua y aceite de oliva aplicados por sus respectivas vías). No se observaron diferencias significativas en el número de ovocitos ovulados entre los grupos. Por consiguiente, el grupo control seleccionado para este estudio recibió ambos vehículos: 0,001 % etanol en agua vía oral mediante micropipeta y aceite de oliva extra virgen aplicado tópicamente sobre la piel.

4.3.3. Diseño experimental

Se realizó la cruce de machos BALB/c con hembras C57BL/6, alojándolos juntos en jaulas individuales. Este apareamiento alogénico, realizado cruzando hembras C57BL/6 con machos BALB/c, reproduce las condiciones naturales de apareamiento observadas en mamíferos, incluyendo humanos, y lo hemos validado en distintas publicaciones previas (Meyer et al., 2019; Müller et al., 2018; Santamaria et al., 2020). Se definió el dg0 como el día en que se detectó el tapón vaginal.

Las hembras gestantes se dividieron en cuatro grupos experimentales y se trataron de la siguiente manera:

- a) **Grupo BP3:** recibió aplicaciones tópicas de BP3 a 50 mg/kg.pc/día (n=11).
- b) **Grupo BPA:** se administró BPA por vía oral a 4 µg/kg.pc/día mediante la técnica de administración guiada por micropipeta (n=15).

- c) **Grupo BP3+BPA:** recibió ambos tratamientos, BP3 tópico y BPA oral (n=13).
d) **Grupo CONTROL:** recibió los vehículos correspondientes, por vía oral (0,001 % etanol en agua) y tópica (aceite de oliva extra virgen) (n=10).

El tratamiento comenzó en dg0 y continuó hasta dg9 durante dos gestaciones sucesivas en las mismas madres (**Figura 26**). Esto implica que, tras el parto de la primera gestación, las madres completaron la lactancia de sus crías hasta el destete en el día 21. Inmediatamente después del destete, cada hembra fue re-apareada con un macho BALB/c para iniciar una segunda gestación. Una vez preñadas, las madres fueron reexpuestas a los tratamientos desde dg0 hasta dg9 durante esta segunda gestación, permitiendo completar la segunda lactancia (ver **Figura 26**).

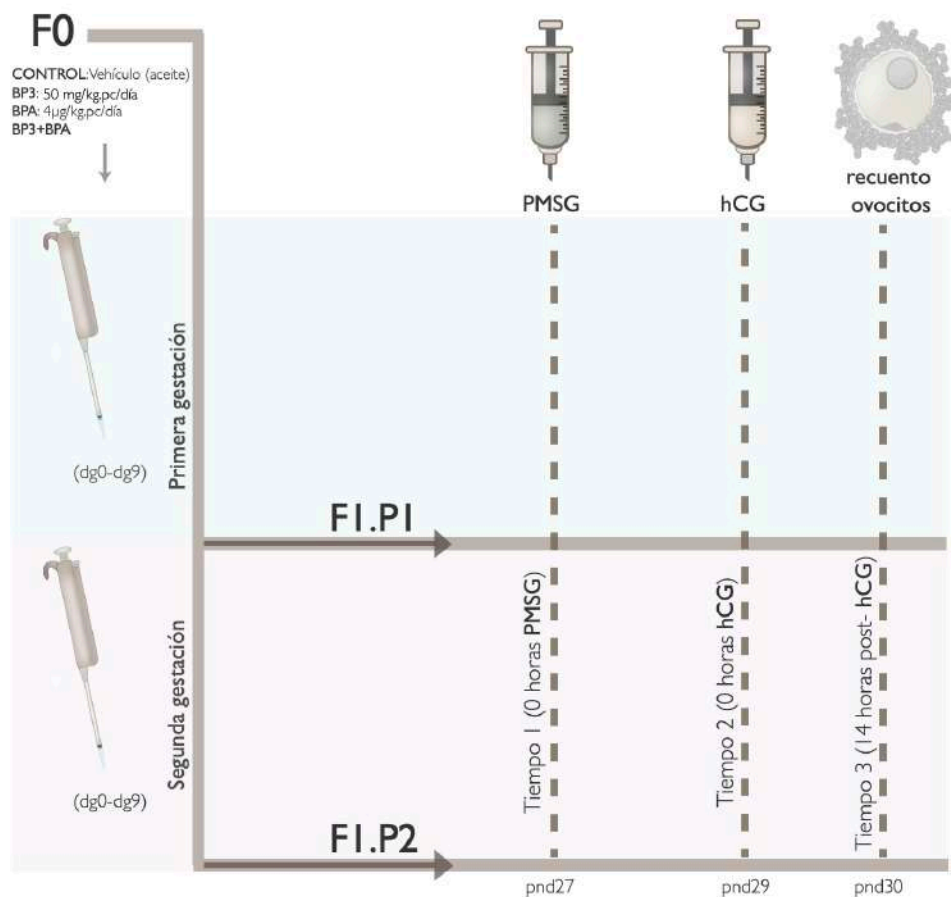


Figura 26: *Diseño experimental.* Las hembras C57BL/6 fueron cruzadas con machos BALB/C (primera gestación), y a partir del día 0 de gestación (dg0, día de detección del tapón vaginal) fueron tratadas con los compuestos (BP3, BPA, BP3+BPA o vehículo) hasta dg9. Al día postnatal 21 (pnd21), las crías fueron destetadas y las madres se aparearon nuevamente con un macho BALB/C (segunda gestación), siendo tratadas nuevamente con los compuestos desde dg0 hasta dg9. Las crías hembras (de la primera y segunda gestación) fueron sometidas a un protocolo de superovulación, en el cual se administró PMSG el día 0 del protocolo y hCG a las 48 horas posteriores. Los ovocitos ovulados se contaron 14 horas después de la inyección de hCG. Al inicio del protocolo, a las 48 horas post PMSG y a las 14 horas post hCG, se reservó un ovario para estudios histológicos y se almacenó el otro a -80°C para la extracción de ARN y posterior análisis de expresión génica mediante RT-PCR. En paralelo, se recolectaron muestras de sangre en los mismos momentos; el suero fue separado y almacenado a -20°C hasta el momento de la determinación de los niveles de hormonas esteroideas sexuales.

Este período de exposición fue seleccionado para abarcar eventos críticos del desarrollo temprano, incluyendo la implantación del embrión (dg4.5–5), la remodelación de las arterias espirales (dg6–10) (Charalambous et al., 2012; Rusidzé et al., 2023), y la especificación y migración de las células germinales primordiales (dg7,25–10) (Richardson & Lehmann, 2010). Estos procesos son altamente sensibles a la alteración endocrina y son relevantes para evaluar posibles efectos a largo plazo sobre la función reproductiva.

En la evaluación de parámetros gestacionales maternos se determinó el impacto de las exposiciones, a lo largo de las dos gestaciones sucesivas se evaluaron los siguientes parámetros:

- **Ganancia de peso materno:** El peso de las madres (F0) se registró diariamente durante todo el período de gestación.
- **Duración de la gestación:** Se determinó el tiempo transcurrido hasta el nacimiento. Considerando una duración típica de 19 a 20 días, los partos se clasificaron como prematuros (pretérmino) si ocurrieron en el dg18 o antes, y como postérmino si ocurrieron en el dg21 o después.
- **Características de la camada:** En el día de cada parto se registró el número total de crías, la proporción de sexos y el peso al nacer de las crías de ambas gestaciones (F1.P1 y F1.P2). Adicionalmente, se registraron los pesos de las crías durante el período de lactancia.

4.3.4. Protocolo de superovulación

La respuesta ovárica a la administración de gonadotrofinas exógenas es una estrategia experimental ampliamente utilizada para evaluar la capacidad del ovario de responder a la estimulación hormonal. Aunque no refleja un proceso fisiológico natural, permite determinar si dicha capacidad se conserva tras exposiciones experimentales (Santamaría et al., 2017). Este enfoque resulta particularmente relevante en el contexto de la FIV, donde las mujeres son sometidas a protocolos de superestimulación similares. Así, se pueden evaluar parámetros clave relacionados directamente con el éxito clínico de la FIV, como el número de ovocitos recuperados y la respuesta folicular a las gonadotrofinas. Si bien las diferencias interespecie limitan la extrapolación directa a humanos, este modelo proporciona información traslacional valiosa sobre cómo la exposición a BP3 o BPA podría comprometer la eficiencia de la estimulación ovárica en escenarios de FIV (Gaylord et al., 2025; Santamaría et al., 2017; Van der Auwera & D'Hooghe, 2001).

En el dpn21, las crías fueron destetadas y se seleccionaron las hembras para los análisis posteriores, mientras que los machos fueron sacrificados mediante exposición a CO₂ seguida de dislocación cervical y se obtuvieron muestras para ser utilizadas en otros experimentos. Por un monitoreo previo en nuestro bioterio, sabemos que la apertura vaginal en esta cepa híbrida C57BL/6 × BALB/c ocurre típicamente en el dpn30, lo que valida el uso del dpn27 como estadio prepuberal. La superovulación se realizó en este estadio prepuberal con el objetivo de asegurar que los animales aún no hubieran iniciado sus ciclos estrales endógenos. Este momento del desarrollo permite una exposición uniforme y controlada a las gonadotrofinas exógenas, minimizando la variabilidad en la respuesta ovárica asociada al estado puberal. Además, se ha demostrado que las hembras prepuberales producen un mayor número de ovocitos ovulados en comparación con hembras adultas (Kolbe et al., 2016).

El protocolo de superovulación que consistió en la inyección intraperitoneal de 5UI de PMSG, seguida 48 horas después por una inyección de 5UI de hCG siendo los ovocitos recolectados 14 horas después de esta última inyección. Estas condiciones experimentales seleccionadas (incluyendo las dosis de 5 UI, los intervalos temporales y el estadio de desarrollo prepuberal) corresponden a parámetros estándar y ampliamente respaldados en la literatura para maximizar la inducción de la respuesta ovulatoria en modelos murinos (Kolbe et al., 2016; Van der Auwera & D'Hooghe, 2001).

Para evaluar la respuesta a las gonadotrofinas, se utilizaron diferentes grupos de animales para la obtención de muestras en tres momentos del protocolo (**Figura 26**):

Tiempo 1 (T1) (Inicio del protocolo: 0 horas PMSG, 0 horas hCG): en dpn27, antes de cualquier inyección hormonal, se recolectaron ovarios para evaluar el estado ovárico basal.

Tiempo 2 (T2) (48 horas post-PMSG, 0 horas hCG): en dpn29, 48 horas después de la administración de PMSG, se recolectaron ovarios de otro grupo de crías para evaluar la respuesta ovárica a esta hormona.

Tiempo 3 (T3) (14 horas post-hCG): en dpn30, 14 horas después de la administración de hCG, se recolectaron ovarios de otro grupo de crías para evaluar el estado del ovario en este momento, y también se recuperaron y contaron los ovocitos ovulados.

En cada punto temporal, las hembras fueron sacrificadas mediante exposición a una atmósfera saturada de CO₂ seguida de decapitación. un ovario fue fijado para

estudios histológicos y el otro fue almacenado a -80°C para extracción de ARN y análisis de expresión génica por RT-PCR. Además, se recolectaron muestras de sangre en cada uno de los momentos, y el suero se separó y almacenó a -20°C hasta la determinación de los niveles hormonales.

4.3.5. Conteo de ovocitos ovulados

Los ovocitos liberados en respuesta al protocolo de superovulación fueron contabilizados en los ovarios obtenidos 14 horas después de la inyección de hCG (**Figura 27**). Los complejos cúmulo-ovocito fueron extraídos quirúrgicamente de los oviductos y colocados en medio Dulbecco modificado Eagle's: F12 (Gibco®, Life Technologies, Invitrogen). Posteriormente, los complejos fueron tratados con hialuronidasa al 0,3% (Sigma) durante 30 minutos a 37°C para dispersar las células del cúmulo. Luego de este tratamiento, los ovocitos aislados de las células del cúmulo fueron contabilizados. Con base en los resultados observados (véase sección 4.4 de Resultados), los análisis de dinámica folicular, niveles hormonales y expresión génica de enzimas esteroidogénicas se realizaron exclusivamente en muestras provenientes de la descendencia F1.P2.

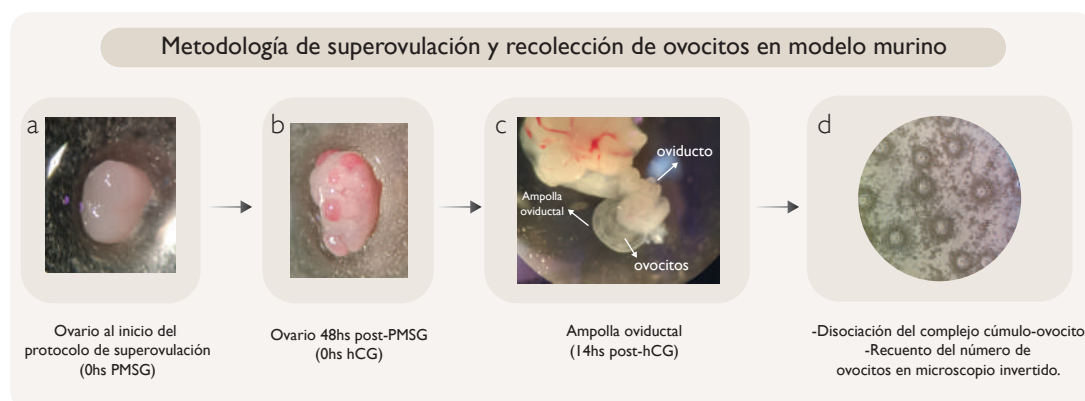


Figura 27: Metodología de superovulación y recolección de ovocitos en ratones. Representación cronológica del procedimiento para la obtención de ovocitos. a) Ovario al inicio del protocolo (0 hs PMSG). b) Ovario 48 hs post-PMSG, evidenciando el crecimiento folicular previo a la inducción de la ovulación con hCG. c) Detalle de la ampolla oviductal 14 hs post-hCG; se observa la presencia de los complejos cúmulo-ovocito (COCs) en el interior del oviducto. d) Microfotografía (microscopía invertida) de los ovocitos denudos tras la disociación enzimática con hialuronidasa al 0,3% del Complejo cúmulo-ovocito. Este paso permite la eliminación de las células del cúmulo para el posterior recuento de los ovocitos ovulados.

4.3.6. Dinámica folicular

La dinámica folicular fue evaluada en la descendencia F1.P2 en los tres puntos temporales previamente descriptos, siguiendo protocolos establecidos (Rodríguez et al., 2010; Santamaría, 2016). En resumen, los ovarios fueron fijados en Formol-Buffer al 10% durante la noche a temperatura ambiente y posteriormente incluidos en parafina. Se realizaron cortes seriados de $5\text{ }\mu\text{m}$ de espesor a partir del punto medio

del órgano, y cada décimo corte fue teñido con picrosirius-hematoxilina (P/H). Se analizaron un total de 4 cortes por ovario (Santamaría et al., 2019), considerando para el análisis la totalidad de los folículos presentes en la superficie de dichos cortes. El recuento de ovocitos se realizó utilizando un microscopio Olympus BH2 con un aumento de 400X. Se evaluaron los siguientes parámetros: a) Número total de ovocitos por micrómetro cuadrado, b) Número de folículos primordiales por micrómetro cuadrado, c) Porcentaje de folículos primordiales, d) Número de folículos antrales por micrómetro cuadrado, y e) Porcentaje de folículos antrales. Para calcular el número de ovocitos por área, se midió el área total de cada corte (en micrómetros cuadrados) utilizando el software Fiji.

4.3.7. Medición de estradiol, progesterona y testosterona

Las determinaciones hormonales se realizaron utilizando pools de suero obtenidos de hembras F1.P2 en los tres momentos establecidos del protocolo de superovulación. Dado el bajo volumen sanguíneo de las crías, el cual imposibilita alcanzar el volumen mínimo requerido por el ensayo de manera individual, para cada punto temporal el suero de muestras individuales fue combinado en pools de la siguiente manera:

T1 (Inicio del protocolo): 3 pools CONTROL (9 muestras), 3 pools BP3 (8 muestras), 4 pools BPA (12 muestras) y 4 pools BP3+BPA (10 muestras).

T2 (48 horas post-inyección de PMSG): 4 pools CONTROL (9 muestras), 3 pools BP3 (6 muestras), 3 pools BPA (8 muestras) y 5 pools BP3+BPA (11 muestras).

T3 (14 horas post-inyección de hCG): 4 pools CONTROL (10 muestras), 6 pools BP3 (12 muestras), 5 pools BPA (9 muestras) y 5 pools BP3+BPA (8 muestras).

Se realizó una extracción orgánica utilizando 200 µl de suero por pool. Con el objetivo de aislar selectivamente las hormonas esteroideas y eliminar posibles interferencias de la matriz del suero murino que afectaran la lectura, para la extracción se utilizó éter sulfúrico, y los extractos obtenidos fueron reconstituidos con 0,5 mL de gelatina al 0,1% en PBS-EDTA, siguiendo protocolos previamente establecidos (Portelinha et al., 2015).

Las concentraciones hormonales extraídas se midieron mediante el método ECLIA-Roche, bajo los siguientes parámetros:

- a) **E₂**: expresado en pg/mL, con un límite de detección de 5 pg/mL.
- b) **P₄**: expresada en ng/mL, con un límite de detección de 0,05 ng/mL.
- c) **T**: expresada en ng/mL, con un límite de detección de 0,03 ng/mL.

Todas las determinaciones hormonales se llevaron a cabo en el laboratorio Alkemy, en Santa Fe, Argentina, siguiendo protocolos estandarizados y procedimientos de control de calidad (<https://alkemy.com.ar/>).

4.3.8. PCR en Tiempo Real (qRT-PCR)

Se utilizó un protocolo optimizado de transcripción reversa y PCR en tiempo real (qRT-PCR) para analizar los niveles relativos de expresión de ARNm de las enzimas y receptores: citocromo P450scc (Cyp11a), 17 α -hidroxilasa (Cyp17a), P450 aromatasa (Cyp19), receptor de la hormona foliculoestimulante (FSHr) y receptor de la hormona luteinizante (LHr) en los ovarios obtenidos de la descendencia F1.P2. Las secuencias de los primers y el tamaño de los amplicones correspondientes a cada ARNm se detallan en la **Tabla 6** y fueron diseñados utilizando la herramienta Primer-BLAST del NCBI. Los ovarios de cada grupo experimental correspondiente al tiempo 2 (n=8 CONTROL, n=8 BP3, n=8 BPA, n=8 BP3+BPA) y los correspondiente al tiempo 3 (n=4 CONTROL, n=4 BP3, n=4 BPA, n=4 BP3+BPA) (fueron homogeneizados individualmente en Trizol (Life Technologies, NY, EE.UU.) y se extrajo el ARN total siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración de ARN se determinó mediante mediciones de absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Nanodrop, y posteriormente se almacenó a -80 °C hasta su uso. Cantidades iguales de ARN total (1 μ g) fueron retrotranscritas a ADNc utilizando transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y cebadores oligo(dT) (Invitrogen), siguiendo protocolos previamente publicados (Santamaría et al., 2016, 2017).

Los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo utilizando el reactivo HOT FIRE Pol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; Biocientífica) y un termociclador Step One (Applied Biosystem). Se incluyeron controles sin ADN molde en todos los ensayos, y no se observó amplificación consistente en estos controles. La pureza de los productos fue verificada mediante curvas de disociación, y muestras seleccionadas al azar fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa. Las curvas estándar se prepararon mediante seis diluciones seriadas de una mezcla de ADNc que contenía cantidades iguales de ADNc de diferentes grupos experimentales, como se ha reportado previamente. Todas las muestras y estándares se analizaron por duplicado en cada experimento independiente.

Para seleccionar un gen de referencia (housekeeping, HK) adecuado para la normalización, se evaluaron dos candidatos: proteína ribosomal L19 (L19) y β -actina (ACTB), siguiendo un protocolo previamente publicado (Abud et al., 2024). El análisis reveló que la expresión de L19 no fue afectada por el tratamiento con BP3, pero sí fue

alterada por los tratamientos con BPA y BP3+BPA. En cambio, la expresión de ACTB se mantuvo estable en todos los tratamientos (BP3, BPA y BP3+BPA), por lo que se seleccionó como gen de normalización.

Las condiciones del termociclador incluyeron una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 15 minutos, seguida de ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, alineamiento a 59 °C (para Cyp11a), 58 °C (para Cyp17a) y 60 °C (para Cyp19a, FSHr, LHr y L19) por 15 segundos, y extensión a 72 °C durante 30 segundos.

Las diferencias significativas en la expresión génica ($p < 0,05$) fueron determinadas mediante el Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test® utilizando el software Relative Expression Software Tool REST® 2009 v.2 (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002).

Tabla 6: Primers y productos de PCR utilizados en los experimentos de RT-PCR en tiempo real.

Gene	Secuencia de primers (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Código GenBank
β -actina	F: CCTGGCACCCAGCACAAT	70	NM_001272041.1
	R: GCCGATCCACACGGAGTACT		
L19	F: AGCCTGTGACTGTCCATTCC	153	NM_031103
	R: TGGCAGTACCCTTCCTCTTC		
Cyp17a	F: ACAGCGATCTGGTGGACATA	166	NM_007809.3
	R: AGAATGTCTGTCAGGCTGGA		
Cyp19a	F: CAACCCGAGCCTTTGGAGAA	164	NM_007810.4
	R: TGAGGGTCAACACATCCACG		
Cyp11a	F: CGAGACTTCAGCCAGTACCC	182	NM_001346787.1
	R: CGCAGCATCTCCTGTACCTT		
FSHr	F: ACAGGGTCTTCCTCTGCCAA	141	NM_013523.3
	R: TCTCCAGGTCCCAAATCCA		
LHr	F: ACTATAACCACGCCATAGAC	71	M81310.1

4.3.9. Estadística

Los datos se expresaron como promedio $\pm$ error estándar del promedio (SEM). La distribución normal de los datos fue evaluada mediante el test de Shapiro-Wilk. Para los datos con distribución normal, se realizó un análisis de varianza de dos vías

(ANOVA de dos factores) para evaluar dos variables independientes: exposición a BPA (presente/ausente) y exposición a BP3 (presente/ausente). Este diseño factorial 2×2 permitió analizar los efectos principales de cada compuesto, así como su posible interacción.

Cuando se detectaron efectos principales y/o interacción significativa, se realizaron comparaciones post test entre los grupos experimentales mediante la prueba de Fisher LSD sin corrección. No se aplicaron pruebas post test cuando no se observaron significancia estadística en los efectos principales ni en la interacción (Wei et al., 2012).

Además, las proporciones fueron analizadas mediante el test exacto de Fisher, y los resultados se expresaron en porcentajes. Para la comparación de los grupos P2 con el grupo control P1, se utilizó una prueba de proporciones.

El número de muestras o experimentos analizados, las pruebas estadísticas empleadas y los valores de p correspondientes a diferencias significativas se indican en las leyendas de cada figura. Se consideró un umbral de significancia de $p \leq 0,05$ para todos los análisis. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0.

4.4. Resultados

4.4.1. Parámetros gestacionales maternos

4.4.1.1. Benzofenona-3, bisfenol-A o la mezcla incrementan el porcentaje de partos fuera de término en los grupos de la segunda gestación

Las **Figura 28, panel a y b**, muestran comparaciones intragestacionales, evaluando la duración de la gestación en los grupos tratados en relación con sus respectivos controles dentro de cada preñez. En este análisis, la exposición a BPA y BP3+BPA durante los primeros diez días de gestación incrementó significativamente la incidencia de partos fuera de término (incluyendo tanto partos prematuros como postérmino) en ambas gestaciones. En cambio, la exposición a BP3 de forma aislada no alteró el momento del parto (**Figura 28, panel a y b**).

La (**Figura 28, panel c**) presenta una comparación intergestacional, en la que todos los grupos experimentales de la segunda gestación (P2), incluyendo el grupo control P2, fueron comparados con el grupo control de la primera gestación (P1). Este análisis reveló un aumento significativo en la proporción de partos prematuros en el grupo control de P2 en comparación con el control de P1, lo que indica que el parto

premature se presentó incluso en ausencia de exposición química durante la segunda gestación. Además, todos los grupos tratados en P2 (BP3, BPA y BP3+BPA) mostraron proporciones significativamente mayores de partos fuera de término en comparación con el control de P1 (**Figura 28, panel c**).

El peso materno durante la gestación no se vio afectado por la exposición a BP3, BPA ni BP3+BPA en ninguno de los grupos (**Figura 29**).

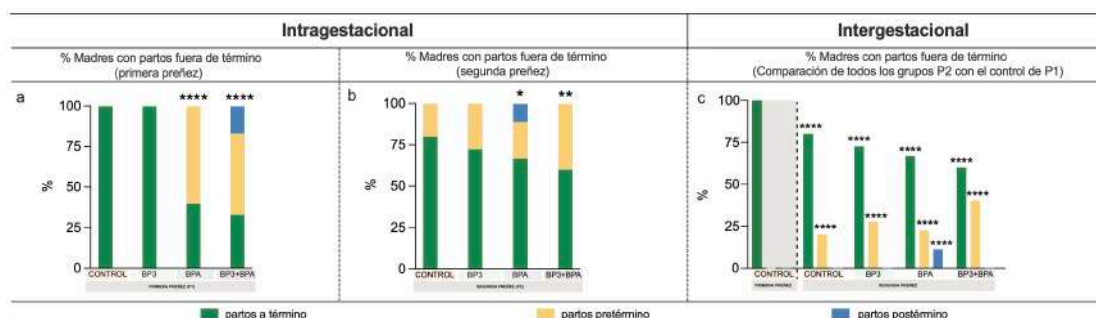


Figura 28: Porcentajes de madres con partos a término y fuera de término (partos pretérmino y posttérmino): a) Madres correspondientes a una primera exposición a BP3, BPA y BP3+BPA (primera gestación) (n=5 control, n=5 BP3, n=5 BPA, n=7 BP3+BPA). b) Madres con una segunda exposición a BP3, BPA y BP3+BPA (segunda gestación) (n=7 control, n=7 BP3, n=12 BPA, n=10 BP3+BPA). c) Comparación intergestacional de la proporción de partos fuera de término en todos los grupos de P2 (control, BP3, BPA, BP3+BPA) en relación con el grupo control de la primera gestación (P1). El análisis estadístico se realizó mediante el test exacto de Fisher para los paneles a y b, y mediante prueba de proporciones para el panel c. Los datos se expresan como porcentajes. Los niveles de significancia se indican de la siguiente manera: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$ vs. control.

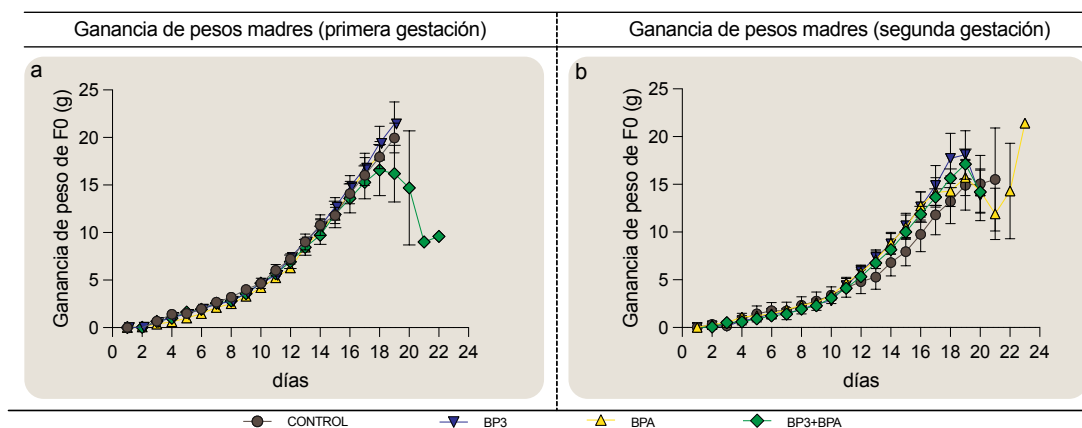


Figura 29: Ganancia de peso durante la gestación en madres expuestas a BP3, BPA y BP3+BPA: a) Madres expuestas por primera vez a los compuestos BP3, BPA y BP3+BPA (primera gestación). b) Madres expuestas por segunda vez a los compuestos BP3, BPA y BP3+BPA (segunda gestación). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías, sin observarse interacción entre los factores. Los datos se expresan como promedio $\pm$ SEM.

4.4.1.2. Impacto de benzofenona-3, bisfenol-A y la mezcla sobre el número de crías y la proporción de sexos de crías nacidas

El número de crías por parto (**Figura 30**) y la proporción de sexos (% de hembras respecto al total de la camada) (**Tabla 7**) no fueron afectados por la exposición a BP3, BPA o BP3+BPA en ninguna de las dos gestaciones.

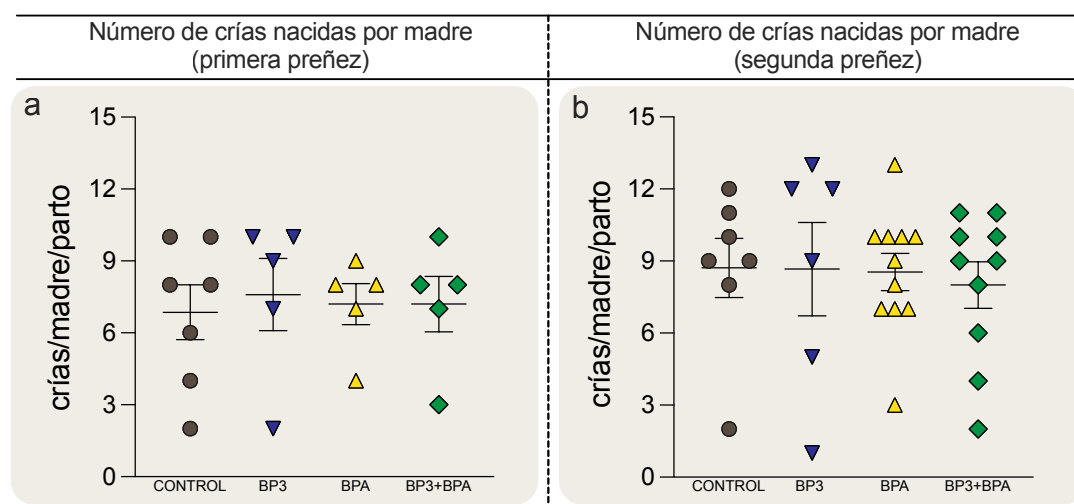


Figura 30: Número de crías por parto por madre: a) Crías nacidas de madres con una primera exposición a BP3, BPA y BP3+BPA (primera gestación) (n=7 CONTROL, n=5 BP3, n=5 BPA, n=5 BP3+BPA). b) Crías nacidas de madres tras una segunda exposición a BP3, BPA y BP3+BPA (segunda gestación) (n=7 CONTROL, n=6 BP3, n=11 BPA, n=10 BP3+BPA). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías, sin observarse interacción entre los factores. Los datos se expresan como promedio $\pm$ SEM.

Tabla 7: Proporción de sexos en la descendencia de primera (F1.P1) y segunda (F1.P2) gestación. Los valores representan el porcentaje de hembras y machos obtenido en cada grupo experimental. El tamaño de la muestra (n) para la primera preñez (F1.P1) fue: CONTROL (n=48), BP3 (n=38), BPA (n=36) y BP3+BPA (n=36). Para la segunda preñez (F1.P2), los tamaños de muestra fueron: CONTROL (n=61), BP3 (n=52), BPA (n=94) y BP3+BPA (n=80). El análisis estadístico se realizó mediante el test exacto de Fisher y los datos se expresan como porcentaje. No se observaron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0,05$).

Crías nacidas en una primera gestación (F1.P1)							
% Hembras				% Machos			
CONTROL	BP3	BPA	BP3+BPA	CONTROL	BP3	BPA	BP3+BPA
47,92	36,84	30,56	44,44	52,08	63,16	69,44	55,56
Crías nacidas en una segunda gestación (F1.P2)							
% Hembras				% Machos			
CONTROL	BP3	BPA	BP3+BPA	CONTROL	BP3	BPA	BP3+BPA
55,75	50	54,25	56,25	44,25	50	45,75	43,75

4.4.2. Parámetros de la descendencia

4.4.2.1. El peso total de las crías es alterado de forma transitoria por benzofenona-3, bisfenol-A y la mezcla

Se observaron variaciones en el peso durante la lactancia en ambas camadas (**Figura 31**). Los machos F1.P1 expuestos a BPA o BP3+BPA presentaron aumentos de peso (**Figura 31, panel b**), los cuales se normalizaron al momento del destete. En cambio, las hembras F1.P1 mostraron alteraciones en el peso únicamente en el día posnatal 15 (pnd15) o en el día 1 (pnd1) en el caso de BP3. En F1.P2, tanto machos como hembras presentaron aumentos de peso transitorios, principalmente tras la exposición a BP3+BPA, los cuales se normalizaron hacia el día posnatal 18 (**Figura 31, panel c y d**). En todos los casos, el impacto de la combinación de BP3+BPA fue similar a lo observado con cada compuesto aplicado individualmente, indicando la ausencia de interacción positiva o negativa entre los compuestos.

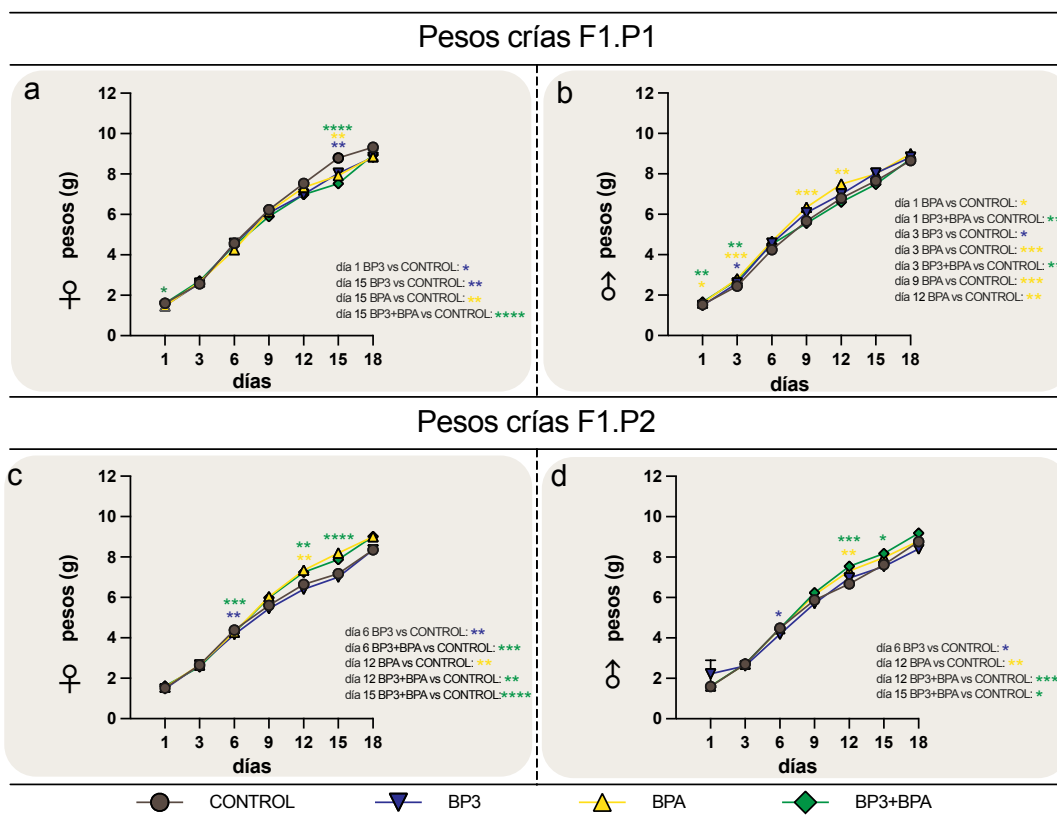


Figura 31: Pesos de la descendencia expuesta prenatalmente a BP3, BPA y BP3+BPA, de la primera y segunda gestación. a) Peso de hembras F1.P1 expuestas a BP3, BPA y BP3+BPA en comparación con el grupo control (n=19 control, n=12 BP3, n=10 BPA, n=20 BP3+BPA). b) Peso de machos F1.P1 expuestos a BP3, BPA y BP3+BPA en comparación con el grupo control (n=23 control, n=24 BP3, n=22 BPA, n=23 BP3+BPA). c) Peso de hembras F1.P2 expuestas a BP3, BPA y BP3+BPA en comparación con el grupo control (n=32 control, n=22 BP3, n=49 BPA, n=41 BP3+BPA). d) Peso de machos F1.P2 expuestos a BP3, BPA y BP3+BPA en comparación con el grupo control (n=27 control, n=23 BP3, n=43 BPA, n=33 BP3+BPA). El peso fue registrado únicamente en camadas con más de seis crías. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías. Los datos se expresan como promedio $\pm$ SEM, y

las diferencias significativas se determinaron utilizando la prueba post hoc Fisher's LSD sin corrección. Los asteriscos de colores indican diferencias significativas en comparación con el grupo control: Asteriscos azules: diferencias significativas entre BP3 y control. Asteriscos amarillos: diferencias significativas entre BPA y control. Asteriscos verdes: diferencias significativas entre BP3+BPA y control. Los niveles de significancia se indican como sigue: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$ vs. control. Efectos de interacción por día (pesos de la descendencia F1.P1): Hembras – día 1 (* $p = 0,0125$). Machos – día 3 (* $p = 0,0469$), día 9 (**** $p < 0,0001$), día 12 (*** $p = 0,0005$), día 15 (*** $p = 0,0009$). Efectos de interacción por día (pesos de la descendencia F1.P2): Hembras – día 15 (**** $p < 0,0001$).

4.4.2.2. Los pesos de los ovarios son similares en todos los grupos

Los pesos ováricos registrados en tres momentos del protocolo, en la etapa inicial (antes de la administración hormonal), a las 48 horas post-inyección de PMSG y a las 14 horas post-inyección de hCG no mostraron diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las dos gestaciones (**Tabla 8**).

Tabla 8: Pesos ováricos de la descendencia de madres expuestas a BP3, BPA y BP3+BPA durante una primera exposición (primera preñez) y de la descendencia de madres con una segunda exposición (segunda preñez) en diferentes puntos temporales del protocolo de superovulación. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías, sin observarse interacción significativa. Los datos se expresan como promedio $\pm$ SEM. BP3: benzofenona-3; BPA: bisfenol-A. Tiempo 1: Estadio inicial del protocolo de superovulación (sin inyección hormonal). Tiempo 2: 48 horas post-inyección de PMSG durante el protocolo de superovulación. Tiempo 3: 14 horas post-inyección de hCG durante el protocolo de superovulación.

Peso de los ovarios de crías F1.P1 en diferentes tiempos del protocolo de superovulación											
CONTROL			BP3			BPA			BP3+BPA		
Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3
3.80 $\pm$ 0.21	8.10 $\pm$ 0.51	8.94 $\pm$ 0.59	3.67 $\pm$ 0.75	7.74 $\pm$ 0.45	7.72 $\pm$ 0.95	3.10 $\pm$ 0.52	6.03 $\pm$ 0.75	9.05 $\pm$ 0.78	4.04 $\pm$ 0.28	6.72 $\pm$ 0.79	7.80 $\pm$ 0.56
n=7	n=6	n=8	n=4	n=5	n=4	n=3	n=3	n=4	n=5	n=6	n=8
Peso de los ovarios de crías F1.P2 en diferentes tiempos del protocolo de superovulación											
CONTROL			BP3			BPA			BP3+BPA		
Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3
3.54 $\pm$ 0.24	7.00 $\pm$ 0.70	7.97 $\pm$ 1.07	4.35 $\pm$ 0.24	7.10 $\pm$ 0.66	9.62 $\pm$ 1.02	3.77 $\pm$ 0.41	6.35 $\pm$ 0.66	8.02 $\pm$ 0.53	3.92 $\pm$ 0.48	6.62 $\pm$ 0.40	7.66 $\pm$ 0.43
n=8	n=8	n=8	n=6	n=7	n=10	n=9	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10

4.4.2.3. Benzofenona-3, bisfenol-A y la mezcla inhiben la tasa de ovulación sólo en las crías de la segunda gestación

La descendencia F1.P1 no presentó alteraciones en el número de ovocitos ovulados tras la aplicación del protocolo de superovulación (**Figura 32, panel a**). Por el contrario, las crías de F1.P2 expuestas a BP3, BPA o BP3+BPA mostraron un número significativamente menor de ovocitos ovulados en comparación con el grupo control (**Figura 32, panel b**). En todos los casos, el impacto de la combinación de

BP3+BPA fue similar a lo observado con cada compuesto aplicado individualmente, indicando la ausencia de interacción positiva o negativa entre los compuestos.

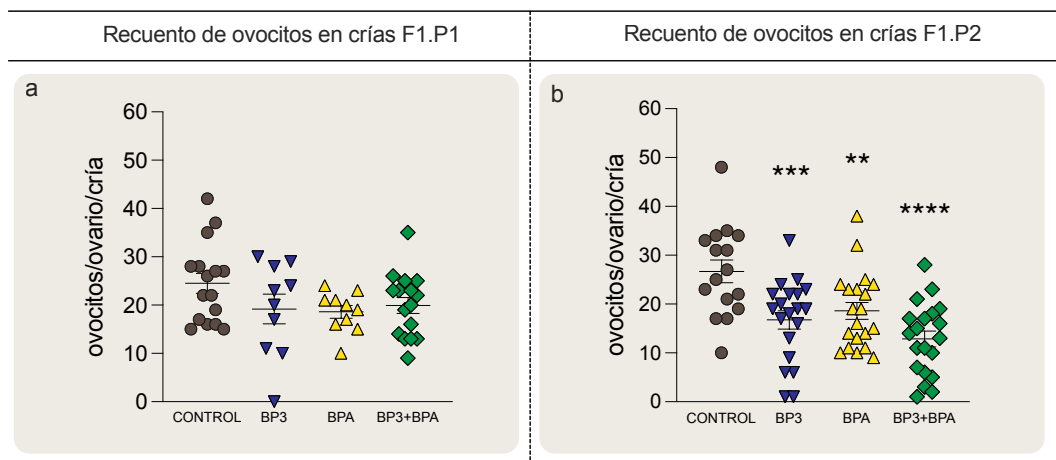


Figura 32: Recuento de ovocitos tras un protocolo de superovulación en descendencia expuesta prenatalmente a BP3, BPA o BP3+BPA: a) Recuento de ovocitos en la descendencia F1.P1 (n=16 control, n=10 BP3, n=10 BPA, n=16 BP3+BPA). b) Recuento de ovocitos en la descendencia F1.P2 (n=16 control, n=20 BP3, n=20 BPA, n=20 BP3+BPA). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías, sin observarse interacción entre los factores. Los datos se expresan como promedio $\pm$ SEM, y las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba post hoc Fisher's LSD sin corrección. Los niveles de significancia se indican de la siguiente manera: **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$ vs. control.

4.4.2.4. Las poblaciones foliculares están alteradas en F1.P2

En T1, que representa el estado de los ovarios previo al estímulo con PMSG, aquellos expuestos a BPA o BP3+BPA mostraron un menor número tanto de folículos totales como de folículos primordiales (**Figura 33, panel a y c**). En T2, es decir a las 48 horas posteriores a la inyección de PMSG y previo al estímulo con hCG, los ovarios de todos los grupos tratados (BP3, BPA y BP3+BPA) tenían menor cantidad de FA (**Figura 33, panel b**). Finalmente, en T3 (14 horas después de la inyección de hCG), en los ovarios de BPA y BP3+BPA observamos menor cantidad de primordiales (**Figura 33, panel a**). Por tanto, todos los grupos tratados tenían una población reducida de FA justo antes del momento del estímulo con hCG. En todos los casos, el impacto de la combinación de BP3+BPA fue similar a lo observado con cada compuesto aplicado individualmente, indicando la ausencia de interacción positiva o negativa entre los compuestos.

4.4.2.5. Benzofenona-3 y su mezcla con bisfenol-A modifican los niveles de estradiol y testosterona

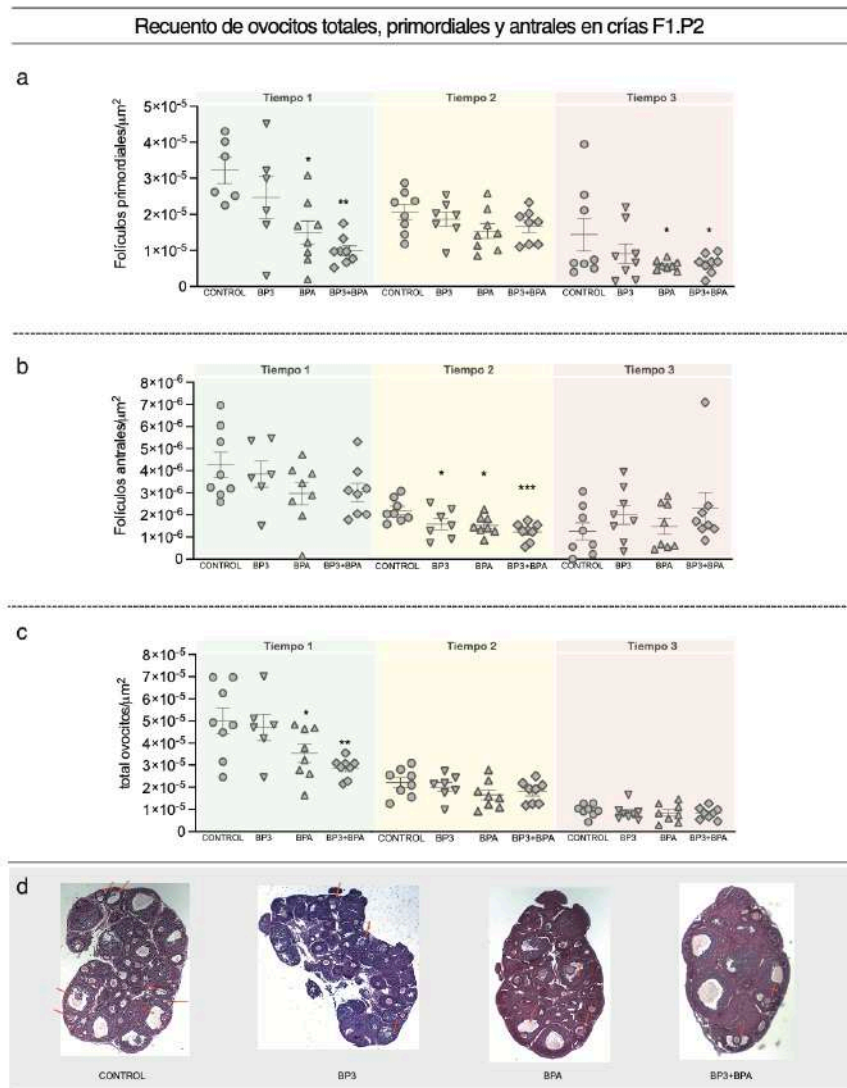


Figura 33: Recuento total, de folículos primordiales y antrales en la descendencia F1.P2: a) Recuento de folículos primordiales por área en los siguientes puntos temporales: Tiempo 1 (n=8 CONTROL, n=6 BP3, n=8 BPA, n=8 BP3+BPA), Tiempo 2 (n=8 CONTROL, n=7 BP3, n=8 BPA, n=8 BP3+BPA), Tiempo 3 (n=8 CONTROL, n=8 BP3, n=8 BPA, n=8 BP3+BPA). b) Recuento de folículos antrales por área en los mismos puntos temporales: Tiempo 1 (n=8 control, n=6 BP3, n=8 BPA, n=8 BP3+BPA), Tiempo 2 (n=8 control, n=7 BP3, n=8 BPA, n=8 BP3+BPA), Tiempo 3 (n=8 control, n=8 BP3, n=8 BPA, n=8 BP3+BPA). c) Recuento total de ovocitos por área en los puntos temporales: Tiempo 1 (n=8 control, n=6 BP3, n=8 BPA, n=8 BP3+BPA), Tiempo 2 (n=8 control, n=7 BP3, n=8 BPA, n=8 BP3+BPA), Tiempo 3 (n=8 control, n=8 BP3, n=8 BPA, n=8 BP3+BPA). d) Imágenes representativas de ovarios completos a las 48 horas posteriores a la inyección de PMSG analizadas en 40X en F1.P2 (control, BP3, BPA, BP3+BPA). Las flechas rojas indican los folículos antrales. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías, sin observarse interacción entre los factores. Los datos se expresan como promedio $\pm$ SEM, y las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba post hoc Fisher's LSD sin corrección. Los niveles de significancia se indican de la siguiente manera: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ vs. control.

El análisis hormonal a partir de muestra de suero de crías F1.P2 realizado en distintos momentos del protocolo de superovulación reveló un aumento en los niveles de E_2 en los grupos BP3 y BP3+BPA a las 14 horas posteriores a la inyección de hCG (**Figura 34, panel a**). Además, los niveles de T estaban elevados en BP3+BPA en ese mismo momento en F1.P2 (**Figura 34, panel c**). Por otro lado, los niveles de P_4 se mantuvieron sin cambios en todo momento (**Figura 34, panel b**). En todos los casos,

el impacto de la combinación de BP3+BPA fue similar a lo observado con cada compuesto aplicado individualmente, indicando la ausencia de interacción positiva o negativa entre los compuestos.

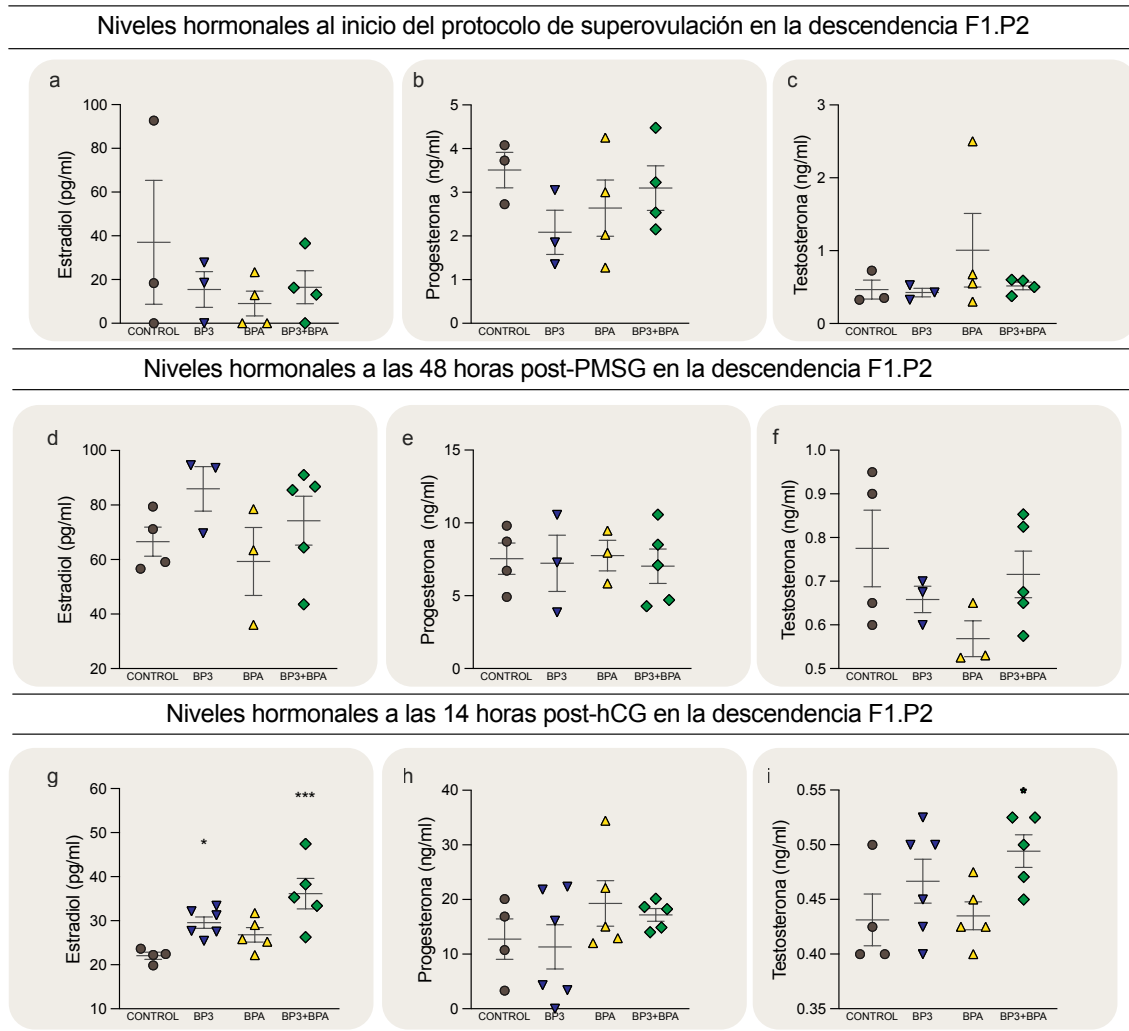


Figura 34: Niveles hormonales de E_2 , P_4 y T en F1.P2: a) Niveles de E_2 en los tiempos 1, 2 y 3. b) Niveles de P_4 en los tiempos 1, 2 y 3. c) Niveles de T en los tiempos 1, 2 y 3. Las mediciones hormonales se realizaron a partir de muestras séricas. Para el análisis hormonal, se generaron pools de suero provenientes de hembras de cada grupo en los tres puntos temporales evaluados: Tiempo 1: 3 pools para el grupo CONTROL (9 crías), 3 pools para BP3 (8 crías), 4 pools para BPA (12 crías) y 4 pools para BP3+BPA (10 crías). Tiempo 2: 4 pools para CONTROL (9 crías), 3 pools para BP3 (6 crías), 3 pools para BPA (8 crías) y 5 pools para BP3+BPA (11 crías). Tiempo 3: 4 pools para CONTROL (10 crías), 6 pools para BP3 (12 crías), 5 pools para BPA (9 crías) y 5 pools para BP3+BPA (8 crías). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías, sin observarse interacción entre los factores. Los datos se expresan como promedio $\pm$ SEM, y las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba post hoc Fisher's LSD sin corrección. Los niveles de significancia se indican de la siguiente manera: *: $p < 0,05$; ****: $p < 0,0001$ vs. control.

4.4.2.6. Los niveles de ARNm de enzimas esteroidogénicas y receptores de gonadotropinas permanecieron inalterados

La expresión de las enzimas esteroidogénicas (Cyp19a, Cyp17a, Cyp11a) y de los receptores de gonadotropinas (FSHr, LHr) no presentaron alteraciones en los ovarios de F1.P2 (**Figura 35, panel a y b**) en ninguno de los grupos experimentales.

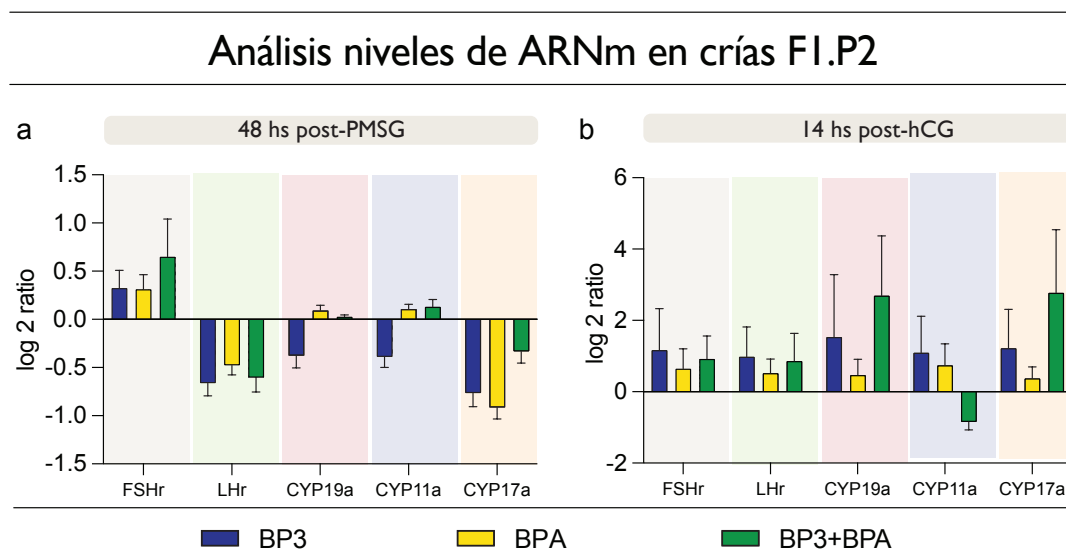


Figura 35: Niveles de ARNm de enzimas esteroidogénicas y receptores de gonadotropinas en tejido ovárico: a) Análisis de los niveles de ARNm de enzimas esteroidogénicas y receptores de gonadotropinas a las 48 horas post-inyección de MSG en un protocolo de superovulación en crías expuesta prenatalmente a BP3, BPA y BP3+BPA, nacida de madres con una segunda exposición a estos compuestos (segunda gestación) (n=8 control, n=8 BP3, n=8 BPA, n=8 BP3+BPA). b) Análisis de los niveles de ARNm de enzimas esteroidogénicas y receptores de gonadotropinas a las 14 horas post-inyección de hCG en un protocolo de superovulación en descendencia expuesta prenatalmente a BP3, BPA y BP3+BPA, nacida de madres con una segunda exposición a estos compuestos (segunda gestación) (n=4 control, n=4 BP3, n=4 BPA, n=4 BP3+BPA). Las muestras se obtuvieron de ovarios, y los niveles de expresión fueron normalizados con respecto a ACTB (beta actina) y al grupo control. El análisis estadístico se realizó mediante el test de aleatorización con reasignación fija par a par (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test). Los datos se expresan como promedio $\pm$ SEM.

4.5. Discusión

El impacto de BP3 y BPA sobre la fisiología reproductiva ha recibido considerable atención debido a su presencia generalizada en PCP y la consiguiente exposición ubicua de seres humanos. En estudios previos, demostramos que tanto BP3 como BPA afectan individualmente la función ovárica (Galliani et al., 2024; Santamaría et al., 2017, 2019). Sin embargo, varios aspectos permanecen sin explorar. Si BP3, o BPA en dosis similar a TDI de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/día, son capaces de alterar la respuesta del ovario a gonadotropinas, es uno de ellos. Otro aspecto es si estos compuestos ejercen efectos sinérgicos cuando se combinan. Por último, también es importante considerar si las madres con embarazos múltiples pueden tener una susceptibilidad diferente a los DEs en comparación con aquellas

que tienen un solo embarazo. Para abordar esta complejidad, empleamos un modelo animal de multiparidad con múltiples exposiciones para examinar los efectos combinados de BP3 y BPA. Este diseño busca reflejar el escenario real donde las mujeres están expuestas a DEs durante ventanas gestacionales sucesivas. Específicamente, estudiamos en ratones si la exposición a BP3, BPA o su combinación altera los parámetros gestacionales y la respuesta ovárica a gonadotrofinas exógenas en la descendencia, y si la historia reproductiva de la madre influye en estas alteraciones.

Nuestros resultados revelaron que la tasa de ovulación en la descendencia nacida de madres expuestas a BP3, BPA o BP3+BPA durante la primera gestación permanece sin cambios. Sin embargo, las crías nacidas de madres expuestas a estos compuestos durante una segunda gestación mostraron una respuesta considerablemente disminuida a la estimulación con gonadotrofinas, evidenciada por un menor número de ovocitos ovulados a las 14 horas post-inyección de hCG en los grupos BP3, BPA y BP3+BPA. Para entender mejor los mecanismos subyacentes a esta reducción en la tasa de ovulación, estudiamos la dinámica folicular, los niveles hormonales y la expresión de enzimas esteroidogénicas y de receptores gonadotrópicos en las crías de la camada F1.P2, en tres momentos claves durante el protocolo de superovulación: **T1**: al inicio del protocolo (antes de la inyección de PMSG), **T2**: a las 48 horas post-inyección de PMSG, **T3**: a las 14 horas post-inyección de hCG.

En los ovarios de BP3, BPA y BP3+BPA se evidenció una disminución significativa en el número de FA en T2 (48 horas post-PMSG). Esta reducción en la población de FA indicaría que el grupo de folículos ovulatorios disponibles para la maduración y ovulación inducida por hCG está disminuido en el momento previo al estímulo con hCG, contribuyendo a las menores tasas de ovulación observadas. Estos resultados concuerdan con estudios humanos que asocian la exposición a BPA y BP3 con disfunciones reproductivas. El BPA ha sido vinculado a un menor RFA (recuento de FA) en mujeres con tratamientos para FIV (Souter et al., 2013) y a una reserva ovárica disminuida asociada con infertilidad (Park et al., 2020). Además, se han reportado niveles séricos elevados de BPA en mujeres infértiles comparadas con sus pares fértiles (Caserta et al., 2013; La Rocca et al., 2014). Otros estudios han asociado la exposición de BPA con resultados negativos en FIV, incluyendo un menor número de ovocitos recuperados, menores tasas de implantación y menor éxito en el embarazo (Ehrlich et al., 2012; Mok-Lin et al., 2010; Pivonello et al., 2020). En relación con BP3, hallazgos recientes indican una correlación negativa entre las

concentraciones urinarias de BP3 y el RFA, particularmente en mujeres jóvenes, sugiriendo que esta población puede ser más vulnerable a los efectos adversos del BP3 debido a sus mayores RFA (Silva et al., 2024). Más recientemente, algunas evidencias indican que la exposición a mezclas de DEs (incluyendo BP3 y BPA) puede afectar los procesos de reproducción asistida y el desarrollo embrionario temprano (Tzouma et al., 2025). Dado que la FIV depende de la estimulación hormonal controlada para maximizar el número de ovocitos disponibles para fertilización, nuestros resultados alertan sobre el impacto negativo que podría tener la exposición crónica a BP3 o BPA en la fertilidad en el contexto de parejas que acuden a las técnicas de reproducción asistida.

También observamos una reducción en la población de folículos primordiales en los ovarios de las crías expuestas a BPA y BP3+BPA en T1, es decir previamente al inicio del protocolo antes de la inyección de PMSG) y en T3, 14 horas post-inyección de hCG. Este patrón sugiere fuertemente que el BPA afecta específicamente a la población de folículos primordiales, ya que la reducción observada antes de la estimulación con gonadotrofinas indica un efecto directo de la exposición prenatal a BPA. La ausencia de estos cambios en el grupo expuesto solo a BP3 y la falta de interacción entre ambos compuestos, posiciona a BPA como el principal agente responsable de estos efectos. Esta conclusión se ve reforzada por la disminución del conteo total de ovocitos/folículos en los mismos grupos y en el mismo momento (T1). Por otro lado, la disminución en la reserva de folículos primordiales puede contribuir a la reducción en el RFA observada al final de la estimulación con PMSG (Fortune, 2003; McGee & Hsueh, 2000). Los folículos primordiales son activamente reclutados y estimulados para crecer, alcanzando eventualmente la etapa antral. Por lo tanto, una reducción en la reserva de folículos primordiales disponibles para el reclutamiento podría llevar a un menor número de FA disponibles para su desarrollo y ovulación, lo cual coincide con la reducción observada en ovocitos ovulados y subraya el papel crítico de la reserva de folículos primordiales en la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotrofinas, especialmente bajo exposición a BPA.

Esta pobre respuesta ovulatoria estuvo acompañada por un aumento en los niveles de E_2 en BP3 y BP3+BPA en T3 (14 horas post-inyección de hCG), con un aumento también de T en BP3+BPA en el mismo momento. Sin embargo, los niveles de ARNm de enzimas esteroideogénicas y receptores gonadotrópicos permanecieron sin cambios. En el caso del grupo expuesto únicamente a BP3, los niveles elevados de E_2 con testosterona y progesterona normales sugieren una alteración selectiva en la vía de síntesis de estrógenos. Los posibles mecanismos incluyen la potenciación

de la actividad de la aromatasa, la modulación de receptores de estrógenos entre otros. Sin embargo, los niveles de ARNm de aromatasa (Cyp19a1) junto con otras enzimas esteroidogénicas se encontraron dentro de rangos normales, lo que sugiere que el aumento observado de E₂ probablemente no se deba a un incremento en la expresión de aromatasa. Estudios previos han demostrado que BPA puede alterar la señalización gonadotrópica (Gámez et al., 2015) y que BP3 afecta las vías mediadas por receptores de estrógenos (Li et al., 2024), lo que podría contribuir a los cambios hormonales observados. Claramente, son necesarios más experimentos y nuevas investigaciones para explorar los efectos de estos disruptores en la regulación hormonal.

Además, aunque la mayoría de la investigación se ha centrado en los resultados de una gestación, algunos trabajos sugieren que la historia reproductiva de la madre puede influir en varios parámetros endocrinos (Rebholz et al., 2012; Vicente et al., 2022). Las preñeces repetidas pueden alterar la respuesta fisiológica del organismo a exposiciones subsecuentes (Bridges, 2015), modificando potencialmente la susceptibilidad a los DEs. Esta sensibilidad diferencial puede derivarse de adaptaciones fisiológicas inducidas por la multiparidad, incluyendo cambios en la reserva ovárica, el estado metabólico y la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Rebholz et al., 2012; Vicente et al., 2022). Por lo tanto, evaluar los efectos a lo largo de dos preñeces proporciona una perspectiva integradora de los riesgos acumulativos asociados con la paridad, un contexto biológicamente relevante frecuentemente pasado por alto en estudios de perturbación endocrina. Un estudio reciente de Friedman et al. (2023) demostró que las concentraciones séricas maternas de sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas estuvieron inversamente asociadas con la duración de la lactancia, pero solo en mujeres multíparas (Friedman et al., 2023). Además, es importante considerar que las madres están expuestas de forma continua a compuestos ambientales a lo largo de toda su vida, y que en cada gestación, los nuevos embriones en desarrollo se exponen a estos compuestos de manera intrauterina. Así, la concurrencia de exposición gestacional junto con los cambios fisiológicos inducidos por la multiparidad, puede amplificar el impacto acumulativo de estos compuestos en la salud reproductiva de la descendencia.

Es interesante destacar que estas alteraciones se observaron a dosis relevantes para la exposición humana. Las dosis de BP3 utilizadas en este estudio reflejan los niveles de exposición tras una aplicación tópica corporal completa (Janjua et al., 2008). Esta dosis fue validada adicionalmente por nuestro grupo (Santamaria et al., 2020), donde demostramos que la aplicación tópica de 50 mg/kg peso corporal

resultó en niveles sanguíneos aproximados de 20 ng/mL. Estos niveles son, de hecho, similares o inferiores a los reportados en humanos tras cuatro o siete días de aplicación tópica de BP3 (Matta et al., 2019, 2020). En cuanto al BPA, la dosis empleada en nuestro estudio corresponde al umbral de 4 µg/kg peso corporal/día establecido por la Unión Europea en 2015. Este nivel de TDI está actualmente en revisión: la EFSA (Panel de Materiales en Contacto con Alimentos, 2023) emitió en 2023 una nueva opinión científica recomendando una reducción del TDI a 0.2 ng/kg peso corporal/día, que entró en vigor en enero de 2025 e introdujo una prohibición total del BPA en materiales en contacto con alimentos (EFSA Panel on Food Contact Materials). Sin embargo, definió períodos de transición que permiten la comercialización continua de ciertos productos que contienen BPA hasta fechas comprendidas entre 2026 y 2028, dependiendo del tipo de producto (Comisión Europea, 2024). Por lo tanto, la exposición humana a BPA en niveles comparables al TDI de 4 µg/kg peso corporal/día sigue siendo plausible y refleja escenarios realistas de exposición humana durante esta transición regulatoria en curso. En consecuencia, nuestros hallazgos aportan evidencia adicional que respalda la necesidad de reducir o prohibir los niveles de BPA en productos de consumo, en línea con las recomendaciones de la EFSA.

En cuanto a los parámetros gestacionales y de la descendencia, no se observaron cambios significativos en el peso materno durante la gestación y la lactancia, el tamaño de camada o la proporción de sexos en la descendencia. Sin embargo, se detectó una alteración en la duración de la gestación en madres expuestas a BPA y a BP3+BPA durante ambas preñeces (análisis intragestacional). Este hallazgo coincide con estudios previos que han asociado a BPA con cambios en la duración de la gestación (Aker et al., 2019; Cantonwine et al., 2010; Mustieles et al., 2023; Weinberger et al., 2013).

Por otro lado, el análisis intergestacional reveló que los nacimientos prematuros aumentan en la segunda gestación en el grupo control, independientemente de la exposición a BP3 o BPA. Esto plantea el interrogante de si los cambios observados en los grupos tratados durante la segunda gestación son atribuibles a los DEs o simplemente reflejan un cambio basal ya evidente en el segundo grupo control. Al realizar ambas comparaciones (intra e intergestacionales), BP3, BPA y BP3+BPA mostraron diferencias significativas frente al control de primera preñez (Control-P1), pero solo BPA y BP3+BPA mostraron diferencias respecto a su control correspondiente en segunda preñez (Control-P2). Estos hallazgos sugieren que el aumento en nacimientos prematuros observado en BP3 durante la segunda

gestación probablemente está impulsado por factores asociados a la multiparidad más que por BP3 en sí. En contraste, BPA y la combinación BP3+BPA indujeron una proporción de nacimientos fuera de término mayor a la esperada en la segunda preñez.

Las alteraciones en el peso de la descendencia fueron esporádicas, con un aumento transitorio en el peso de los machos vinculado a la exposición a BPA en primera gestación y a BP3+BPA en la segunda. Si bien estos hallazgos son consistentes con reportes que sugieren que la exposición a BPA puede alterar la composición de la leche materna, potencialmente aumentando su contenido lipídico y contribuyendo así al aumento de peso en la descendencia a través de la lactancia (Altamirano et al., 2015), pensamos que por su naturaleza esporádica y limitada deben interpretarse con cautela.

4.6. Conclusiones

Notablemente, en nuestro estudio, los cambios más significativos, particularmente la reducción en la tasa de ovulación, se observaron solo durante una segunda gestación y luego de dos exposiciones a BP3 o BPA, vinculados a alteraciones en la reserva ovárica de primordiales y en la población de FA. Esta observación resulta especialmente relevante al considerar que los ovocitos que dieron origen a la descendencia de primera generación (F1.P1) no estuvieron expuestos a BP3, BPA ni a la combinación de BP3+BPA, dado que estos compuestos fueron administrados después de la gestación ya había comenzado. En contraste, los ovocitos que dieron origen a la descendencia de la segunda preñez (F1.P2) sí estuvieron expuestos a BP3, BPA o BP3+BPA. Los efectos observados sobre la dinámica folicular y la ovulación en F1.P2 podrían atribuirse a cambios epigenéticos o alteraciones en las células germinales de F0, los cuales solo se manifestaron tras una segunda gestación y segunda exposición. Por lo tanto, la posible interacción entre la multiparidad, la exposición acumulativa a estos disruptores endocrinos y los eventuales cambios epigenéticos abre el camino a nuevos experimentos y a una investigación más profunda.

Los hallazgos presentados en este capítulo han sido publicados en la siguiente revista indexada de alto impacto (**Anexo V**: Galliani et al., 2025):

Galliani, V., Fessia, J., Santamaría, C. G., Abud, J. E., & Rodríguez, H. A. (2025). Benzophenone-3 (BP3), bisphenol A (BPA), and their combination impair ovarian response to gonadotropin stimulation in a multi-exposure multiparity model.

Environmental Toxicology and Pharmacology, 119, 104821.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104821>.

Capítulo 3

Proteómica del ovario prepuberal en un modelo de multiparidad expuesto a benzofenona-3



5. Capítulo 3: Proteómica del ovario prepuberal en un modelo de multiparidad expuesto a benzofenona-3

5.1. Introducción

Un escenario fisiológicamente relevante que rara vez se considera en la investigación sobre disrupción endocrina es la multiparidad (Merrill et al., 2021; Moon et al., 2023). Las gestaciones repetidas pueden modificar los estados endocrino, metabólico o inmunológico maternos y, de esta manera, influir en la susceptibilidad de la descendencia a los DEs. En el Capítulo 2, abordamos esta cuestión utilizando un modelo murino de exposición repetida en dos gestaciones sucesivas y en el que evaluamos la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotrofinas en las crías de las dos camadas. Demostramos que la exposición gestacional a BP3, BPA o a su combinación reduce marcadamente la respuesta ovulatoria, con un patrón dependiente de la camada: mientras que la primera progenie (F1.P1) mantuvo una respuesta normal, la de la segunda gestación (F1.P2) mostró un deterioro de la ovulación (Galliani et al., 2025).

A partir de este hallazgo, nos interesamos en determinar las posibles diferencias entre los ovarios de las progenes F1.P1 y F1.P2 antes de la estimulación con gonadotrofinas y, de existir, si dichas diferencias podrían contribuir a la diferencia funcional observada. Para abordar esto, recurrimos a una de las tecnologías denominadas “ómicas”. Las tecnologías ómicas han revolucionado la biología molecular moderna al permitir el análisis simultáneo y a gran escala de distintos componentes celulares (genes, transcritos, proteínas, metabolitos, etc.) (Al-Amrani et al., 2021; Dai & Shen, 2022). Estos enfoques complementan la información genética y transcriptómica tradicional, ofreciendo una visión funcional de los sistemas biológicos. En particular, la proteómica, que determina la abundancia relativa de las proteínas que se están expresando en un tejido, refleja con mayor fidelidad la respuesta real de las células a señales y condiciones externas que los estudios basados en ADN o ARN (Al-Amrani et al., 2021; Dai & Shen, 2022).

Para ello, hicimos un experimento en base a un análisis proteómico de los ovarios prepuberales (dpn27) de la primera y segunda progenie antes de ser estimulados con Gn (dpn27). En este caso nos limitamos a los ovarios de animales del grupo control y expuestos a BP3.

5.2. Objetivos

Determinar el impacto de la exposición repetida a BP3 durante dos gestaciones sucesivas sobre el perfil proteómico de los ovarios previo al estímulo con gonadotrofinas en las progenies F1.P1 y F1.P2.

5.3. Materiales y métodos

El experimento sigue un flujo de trabajo bottom-up estándar: extracción total de proteínas (usando TRIzol/SDS/urea), cuantificación (BCA) y fraccionamiento por SDS-PAGE. Luego se realiza una digestión con tripsina *in-gel* y análisis por nanoLC-MS/MS en un espectrómetro Orbitrap. En conjunto, esta estrategia está alineada con protocolos reconocidos en la literatura (Dupree et al., 2020) (**Figura 36**).

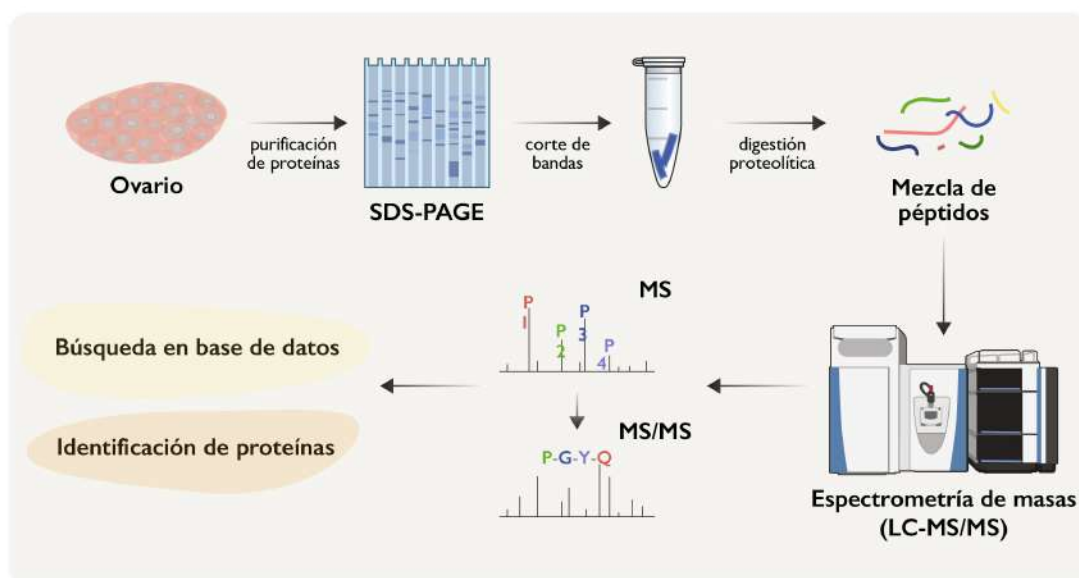


Figura 36: Flujo de trabajo en un experimento de proteómica *bottom-up*. Modificado de Dupree et al., 2020).

5.3.1. Obtención de muestras y diseño experimental

El protocolo de tratamiento materno con BP3, las condiciones de bioterio y el diseño detallado de la obtención de ambas descendencias se encuentran descritos en el Capítulo 2, sección 5.3.

5.3.2. Recolección y preservación de tejido

Para el desarrollo de este experimento, se utilizaron los ovarios de las progenies F1.P1 y F1.P2 en el momento T1: ovarios prepuberales de dpn27, previo al estímulo con PMSG. Los ovarios fueron extraídos quirúrgicamente inmediatamente después del sacrificio de las crías mediante exposición a CO₂ seguida de dislocación cervical, y procesados de manera inmediata bajo lupa estereoscópica para la

remoción del tejido adiposo circundante y de la bursa ovárica. Una vez limpios, los órganos fueron rotulados y almacenados a -80 °C hasta el momento de realizar la extracción de proteínas totales detallada en las secciones posteriores, asegurando así la estabilidad de las muestras para el análisis proteómico.

5.3.3. Extracción y solubilización de proteínas totales

La extracción de proteínas a partir de los ovarios se realizó utilizando el reactivo TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo del fabricante basado en la separación de fases por quimiosorción. Tras la obtención del pellet proteico, se llevó a cabo una adaptación del método descrito por Simões et al. (2013) para su solubilización.

Los pellets se resuspendieron en una solución buffer compuesta por una mezcla 1:1 de SDS al 1% y Urea 8 M en Tris-HCl (pH 8,0). Para asegurar una desnaturalización y solubilización completa de los complejos proteicos, las muestras se sometieron a cinco ciclos de sonicación, intercalados con períodos de 30 segundos de incubación en hielo. Una vez resuspendidas, las muestras se centrifugaron para eliminar residuos insolubles y el sobrenadante resultante se cuantificó realizando ensayo de BCA (ver inciso 5.3.4).

5.3.4. Cuantificación de proteínas (ensayo de BCA)

Previa a la corrida electroforética, se determinó la concentración proteica de las muestras mediante el ensayo de ácido bicinonínico utilizando el *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). Para ello, se empleó una curva de calibración estándar con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 562 nm en un lector de microplacas, permitiendo normalizar la carga de proteínas a 30 µg por calle para los análisis posteriores mediante SDS-PAGE. Las muestras se conservaron a -20 °C durante 24 horas.

5.3.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación de las proteínas se realizó bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Se empleó un sistema de geles discontinuos de 0,77 mm de espesor, compuesto por un gel de apilamiento al 4,5% y un gel de resolución al 12% de poliacrilamida (Bio-Rad Laboratories).

Las muestras fueron diluidas en buffer de carga en presencia de SDS y β -mercaptoetanol, e incubadas durante 5 minutos a 95 °C para asegurar su desnaturalización completa. En cada calle se sembraron 30 μ g de proteína.

La corrida electroforética se llevó a cabo en solución Laemmli (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v, pH 8,3) aplicando un voltaje constante de 10 V/cm. Cabe destacar que el frente de corrida se detuvo una vez que las proteínas avanzaron 1 cm dentro del gel de resolución (**Figura 37, panel a**). Esta restricción en el recorrido se realiza con el objetivo de concentrar el proteoma total en una banda reducida, garantizando que los cortes posteriores de gel para el análisis por espectrometría de masas no excedieran dimensiones de 1 cm x 1 cm (**Figura 37, panel a**).

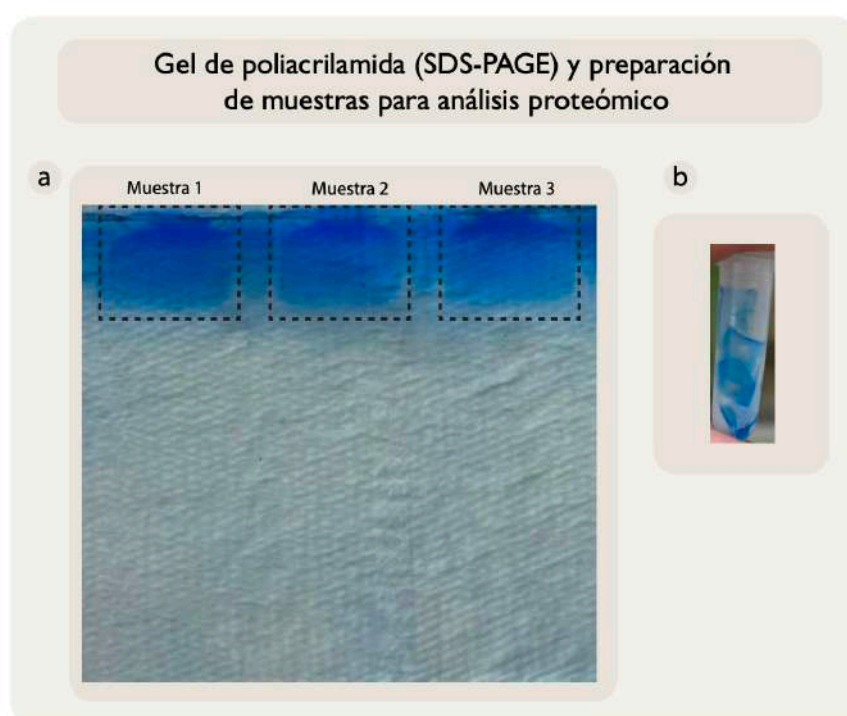


Figura 37: Preparación y concentración de muestras para proteómica mediante SDS-PAGE. a) Imagen representativa de un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie, donde se observan tres réplicas biológicas independientes. Cada carril contiene una carga de 30 μ g de proteína total proveniente de muestras de ovario. Los recuadros punteados delimitan el frente de corrida restringido a 1 cm en el gel de resolución, técnica empleada para concentrar el proteoma total y optimizar la densidad proteica para la posterior espectrometría de masas. b) Detalle del procesamiento de la muestra: tubo Eppendorf conteniendo el corte de gel (1 cm x 1 cm) proveniente del carril correspondiente. Las muestras fueron conservadas a 4°C para su posterior envío y procesamiento en el servicio de proteómica.

5.3.6. Tinción de geles con coomassie blue coloidal.

Para la visualización y posterior análisis de las proteínas, se empleó la técnica de tinción con Coomassie Blue Coloidal (**Figura 37, panel a**), siguiendo el protocolo estandarizado por el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM). Con el fin de evitar la contaminación con queratinas exógenas,

todo el procedimiento se realizó utilizando guantes, recipientes rigurosamente limpios y reactivos de alta pureza analítica.

5.3.6.1. Preparación de soluciones

Se prepararon volúmenes de 250 ml para cada una de las siguientes soluciones:

Solución Fijadora: Compuesta por etanol (EtOH) al 30% (v/v) y ácido fosfórico al 2% (v/v) (preparado a partir de un stock al 85%).

Solución de Tinción: Constituida por metanol (MeOH) al 18% (v/v), sulfato de amonio al 17% (w/v) y ácido fosfórico al 2% (v/v).

5.3.6.2. Protocolo de tinción

Fijación: Tras la electroforesis, los geles se incubaron en la solución fijadora durante un periodo mínimo de 3 horas u *overnight* para asegurar la inmovilización de las proteínas en la matriz del gel.

Lavado: Se realizaron tres lavados sucesivos de 30 minutos cada uno con agua destilada para eliminar el exceso de fijador.

Pre-tinción y tinción coloidal: Los geles se transfirieron a la solución de tinción y se mantuvieron en agitación constante durante una hora. Posteriormente, se adicionó Coomassie Blue G-250 en polvo (0,5 g/L) para generar una suspensión coloidal. La mezcla se mantuvo bajo agitación suave durante un periodo de 1 a 2 días en recipientes herméticamente cerrados para prevenir la evaporación y la entrada de contaminantes.

Finalización: Una vez alcanzado el nivel de tinción deseado, el gel se lavó exhaustivamente y se conservó en agua destilada. El corte de las bandas de interés (1cm x 1cm) para el análisis proteómico se realizó inmediatamente después del lavado, se colocó cada corte de cada muestra en eppendorf individuales y se conservó a 4°C hasta el procesado y posterior cuantificación de las proteínas (**Figura 37, panel b**).

5.3.6.3. Análisis Proteómico por NanoHPLC-MS/MS

El análisis proteómico global de las muestras de ovario se llevó a cabo en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM, <http://cequibiem.qb.fcen.uba.ar/>). Este proceso incluyó el tratamiento de las muestras, la separación por cromatografía líquida de alta resolución y la identificación mediante espectrometría de masas de alta resolución.

5.3.6.4. Tratamiento de las muestras y digestión triptica

Las proteínas extraídas fueron sometidas a un proceso de reducción con DTT 20 mM durante 45 minutos a 56 °C, seguido de una alquilación con iodoacetamida 50 mM durante 45 minutos en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se realizó la digestión proteolítica utilizando tripsina (grado secuenciación) durante 12-16 horas, con el fin de hidrolizar los enlaces peptídicos en los residuos de Arg y Lys en el extremo C-terminal.

Los péptidos resultantes fueron extraídos con acetonitrilo, liofilizados en un equipo Speed Vac y resuspendidos en 30 l de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%. Finalmente, se realizó un desalado de la mezcla peptídica utilizando resinas de fase reversa C18 (Merck) previo a su inyección en el sistema cromatográfico.

5.3.6.5. Configuración del sistema LC-MS/MS (Orbitrap)

Para la separación y análisis de los péptidos, se utilizó un cromatógrafo EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Q-Exactive (Thermo Scientific) equipado con un analizador Orbitrap y una celda de colisión HCD (High Collision Dissociation).

La separación cromatográfica se realizó en una columna de fase reversa EASY-Spray Accucore (C18, 2 m, 100 Å, 75 m x 250 mm) a una temperatura constante de 35 °C. Se empleó un gradiente lineal de 120 minutos con un flujo de 200 nl/min, utilizando como fase móvil A agua con ácido fórmico al 0,1% y como fase móvil B acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1%. El gradiente de elución se incrementó del 5% al 35% de fase B durante los primeros 100 minutos del análisis.

La ionización se llevó a cabo mediante una fuente de electrospray (EASY-SPRAY) con un voltaje de spray ajustado entre 1,5 y 3,5 kV en modo de polaridad positiva. El espectrómetro operó en un modo dependiente de datos (DDA), realizando un escaneo de Full MS con una resolución de 70.000 (rango 400–2000; AGC target) seguido de la fragmentación de los 12 iones precursores más intensos (MSMS) con una resolución de 17.500 (AGC target). Se aplicó exclusión dinámica para optimizar la identificación de péptidos de baja abundancia.

5.3.7. Procesamiento de datos y análisis bioinformático integrativo

El procesamiento de los datos crudos se realizó mediante el software *Proteome Discoverer* (v2.2, Thermo Scientific). Las búsquedas se efectuaron contra la base de datos de referencia de *Mus musculus* (UniProt UP000000589) utilizando la enzima tripsina (con hasta 2 sitios de corte fallidos). Se establecieron tolerancias de

masa de 10 ppm para el precursor y 0,05 Da para los fragmentos, considerando la carbamidometilación de cisteínas como modificación estática y la oxidación de metioninas como dinámica. Para la cuantificación y consolidación de los resultados, se utilizó la función *Feature Mapper* y un análisis de *Multiconsensus* (MC/LFQ), aplicando un filtro de tasa de falso descubrimiento de 0,01 (Percolator). Solo se consideraron proteínas identificadas con un nivel de confianza "High" y un mínimo de dos péptidos distintivos por proteína.

El análisis estadístico posterior fue realizado a través del software Perseus (v1.6.6.0, *Max Planck Institute of Biochemistry*), donde se aplicaron filtros de calidad, transformaciones logarítmicas de los datos de abundancia y pruebas estadísticas de *T-test* de Student para generar comparaciones entre las progenies F1.P1 y F1.P2 respecto al grupo control. Estos resultados se visualizaron mediante gráficos de Volcano Plot, estableciendo umbrales de significancia para identificar las proteínas con expresión diferencial (subreguladas y sobreexpresadas).

A partir de los resultados y listados proporcionados por el servicio, realizamos un análisis de integración funcional. En primer lugar, los identificadores de las proteínas seleccionadas fueron consultados en la plataforma UniProt (<https://www.uniprot.org/>) para obtener una anotación funcional detallada, permitiendo su categorización según procesos biológicos (*Gene Ontology*), funciones moleculares y vías metabólicas específicas. Finalmente, se utilizó el software *Cytoscape* para la construcción y visualización de mapas de interacción proteína-proteína. Este análisis integrativo facilitó la identificación de los clústeres funcionales y los nodos críticos que explican las alteraciones moleculares observadas en los ovarios de las crías expuestas prenatalmente a BP3.

5.4. Resultados

5.4.1. Análisis proteómico de ovarios F1.P1: alteraciones en la integridad epitelial y activación de vías de señalización compensatorias

El análisis cuantitativo reveló un cambio significativo en la abundancia de proteínas, visualizado en el *volcano plot*, donde se distinguen claramente poblaciones subreguladas (naranja) y sobreexpresadas (azul) (**Figura 38, panel b**) en los ovarios de las crías expuestas a BP3.

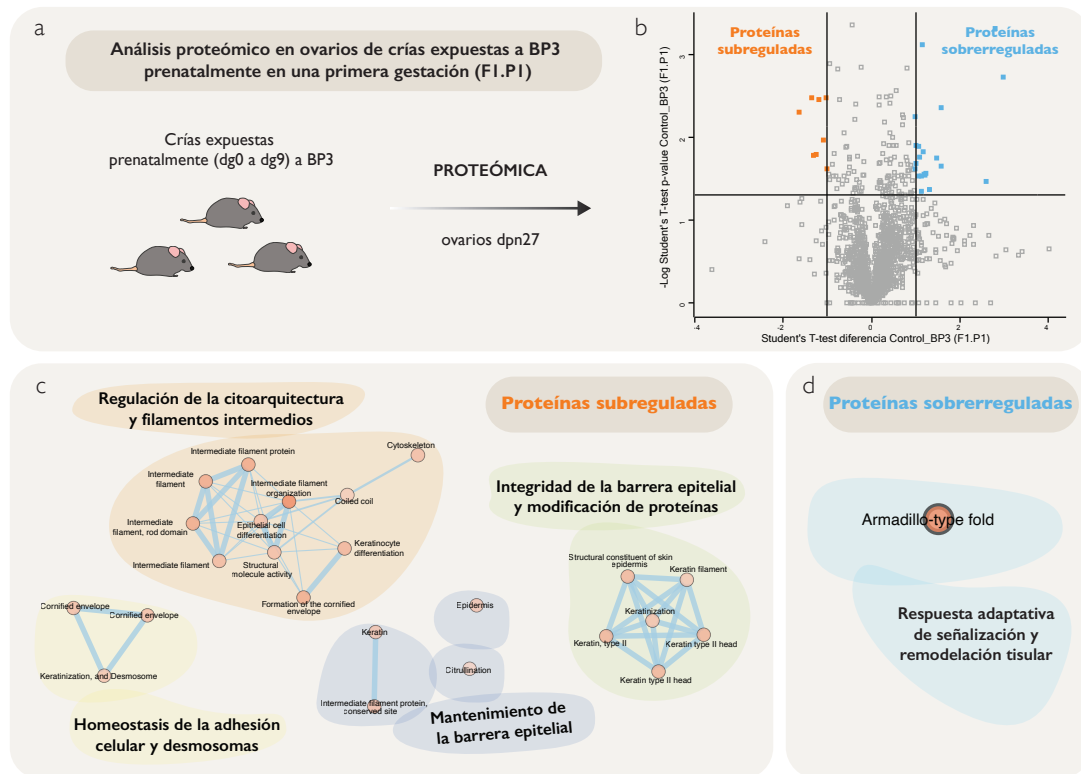


Figura 38: Caracterización del proteoma ovárico en crías con exposición prenatal a BP3 durante la primera gestación (F1.P1). a) Representación del diseño experimental: las madres fueron expuestas a BP3 desde el día de gestación 0 (dg0) al 9 (dg9), y se recolectaron los ovarios de las crías hembras al día postnatal 27 (dnp27) para su análisis proteómico. b) Gráfico de volcán (Volcano plot) que muestra el perfil de expresión diferencial; los puntos naranjas representan proteínas con subregulación significativa, mientras que los puntos azules indican proteínas sobreexpresadas (Student's T-test, p-value < 0.05). c) Redes de interacción funcional de las proteínas subreguladas obtenidas mediante Cytoscape. Se identifican clústeres críticos asociados a la regulación de la citoarquitectura, la organización de filamentos intermedios, la integridad de la barrera epitelial y la homeostasis de la adhesión celular (desmosomas). d) Análisis funcional del grupo de proteínas sobreexpresadas, destacando la prevalencia de dominios estructurales de tipo Armadillo (Armadillo-type fold) vinculados a procesos de señalización celular y respuestas adaptativas de remodelación tisular frente al daño estructural.

El análisis de redes de interacción (Cytoscape) de las proteínas **subreguladas** (Tabla 9) reveló alteraciones en la maquinaria de soporte estructural del ovario (Figura 38, panel c). Los clusters principales se asociaron con la "Organización de filamentos intermedios" y la "Integridad de la barrera epitelial". Esto se confirma con la disminución significativa de múltiples isoformas de queratinas, incluyendo Krt1 (P04104), Krt76 (Q3UV17) y Krt78 (E9Q0F0), las cuales son fundamentales para la estabilidad mecánica de los epitelios.

Se observó, además, una afectación en la "Homeostasis de la adhesión celular y desmosomas" (Figura 38, panel c). Identificamos una reducción en la Desmoplaquina (Dsp, E9Q557), una proteína clave para el anclaje de los filamentos intermedios a la membrana plasmática en los desmosomas. La pérdida conjunta de Dsp y queratinas sugiere un desmantelamiento de las uniones intercelulares, vitales para mantener la cohesión entre las células de la granulosa y la estructura del folículo

en crecimiento. Además, se observó una disminución en Top2a (Q01320), una topoisomerasa esencial para la segregación cromosómica, lo que podría vincular la falla estructural con defectos en la división celular.

Tabla 9: Perfil proteómico diferencial en crías expuestas (F1.P1) a BP3. La tabla enumera las proteínas que mostraron variaciones en su abundancia relativa en comparación con el grupo control. Se clasifican en proteínas subreguladas y sobreexpresadas, detallando su código de acceso (UniProt) y el nombre del gen correspondiente.

Análisis proteómico crías expuestas a BP3 F1.P1			
Proteínas subreguladas		Proteínas sobreexpresadas	
Código de acceso (UniProt)	Nombre del gen	Código de acceso (UniProt)	Nombre del gen
E9Q0F0	Krt78	P02088	Hbb-b1
P04104	Krt1	P62849	Rps24
Q3UV17	Krt76	Q8VCT3	Rnpep
F6T4M4	Srrm1	Q8BWM0	Ptges2
Q62419	Sh3gl1	P21279	Gnaq
Q6IFX2	Krt42	Q61216	Mre11
Q01320	Top2a	Q3UMU9	Hdgfl2
E9Q557	Dsp	Q08093	Cnn2
		A0A0R4J0H7	Ncapd2
		P43135	Nr2f2
		Q3URQ0	Tex10
		B1AZI6	Thoc2
		O35465	Fkbp8
		Q80WQ2	Vac14
		Q8K2V6	Ipo11
		Q8JZK9	Hmgcs1
		Q19LI2	A1bg

En contraste, el mapa de las proteínas **sobreexpresadas** (Tabla 9) mostró un enriquecimiento funcional vinculado a "Respuestas adaptativas de señalización", destacando dominios estructurales de señalización (*Armadillo-type fold*) (Figura 38, panel d).

Identificamos un aumento significativo en Mre11 (Q61216), una proteína central en la reparación de roturas de doble cadena de ADN y la recombinación homóloga, lo que sugiere que el tejido está respondiendo activamente a un daño genómico persistente. Además, se observó una reprogramación metabólica evidenciada por el aumento de Hmgcs1 (Q8JZK9), enzima limitante en la biosíntesis de colesterol, y de Ptges2 (Q8BWM0), implicada en la síntesis de prostaglandinas.

Asimismo, la elevación del factor de transcripción Nr2f2 (COUP-TFII, P43135) refuerza la hipótesis de que el ovario está activando vías de señalización compensatorias para sostener el desarrollo frente al daño estructural descrito en el panel **Figura 38, panel c**.

5.4.2. Análisis proteómico de ovarios F1.P2: Estrés metabólico y reprogramación epigenética ante la exposición prenatal a BP3

El análisis del proteoma ovárico en crías F1.P2 (expuestas como gametos y como embriones) (**Figura 39, panel a**) reveló una alteración profunda en la bioenergética celular y la maquinaria de mantenimiento de la cromatina (**Figura 39, panel d y c**) en los ovarios de las crías expuestas a BP3.

El análisis de redes de las proteínas **subreguladas** (**Tabla 10**) en el grupo F1.P2 mostró una afectación central no solo en el metabolismo energético, sino también en el mantenimiento de la calidad proteica (**Figura 39, panel c**). Por un lado, se confirmó el compromiso de la "Función mitocondrial" y el "Metabolismo lipídico" mediante la caída de enzimas de la β -oxidación de ácidos grasos y la cadena de transporte de electrones, como Etfa (Q99LC5), Acads (Q07417) y componentes del complejo III mitocondrial (Uqcrc2, Q9DB77). Específicamente, se observó una disminución de Soat1 (Sterol O-acyltransferase 1, Q61263), la enzima responsable de esterificar el colesterol para su almacenamiento en gotas lipídicas, y de Anxa1 (Anexina A1, P10107), un mediador antiinflamatorio y regulador de la señalización celular.

Además, el análisis reveló una supresión significativa del clúster "Degradación proteica y maquinaria de plegamiento" evidenciado por la disminución de múltiples subunidades reguladoras del proteasoma 26S, incluyendo Psmd5 (Q8BJY1), Psmd8 (Q9CX56) y Psmd13 (Q9WVJ2), así como del activador del proteasoma Psme3 (P61290). Esta falla en la maquinaria de degradación ocurre concomitantemente con la baja en el complejo de chaperoninas CCT (Cct2, Cct7), esenciales para el plegamiento del citoesqueleto y proteínas citosólicas.

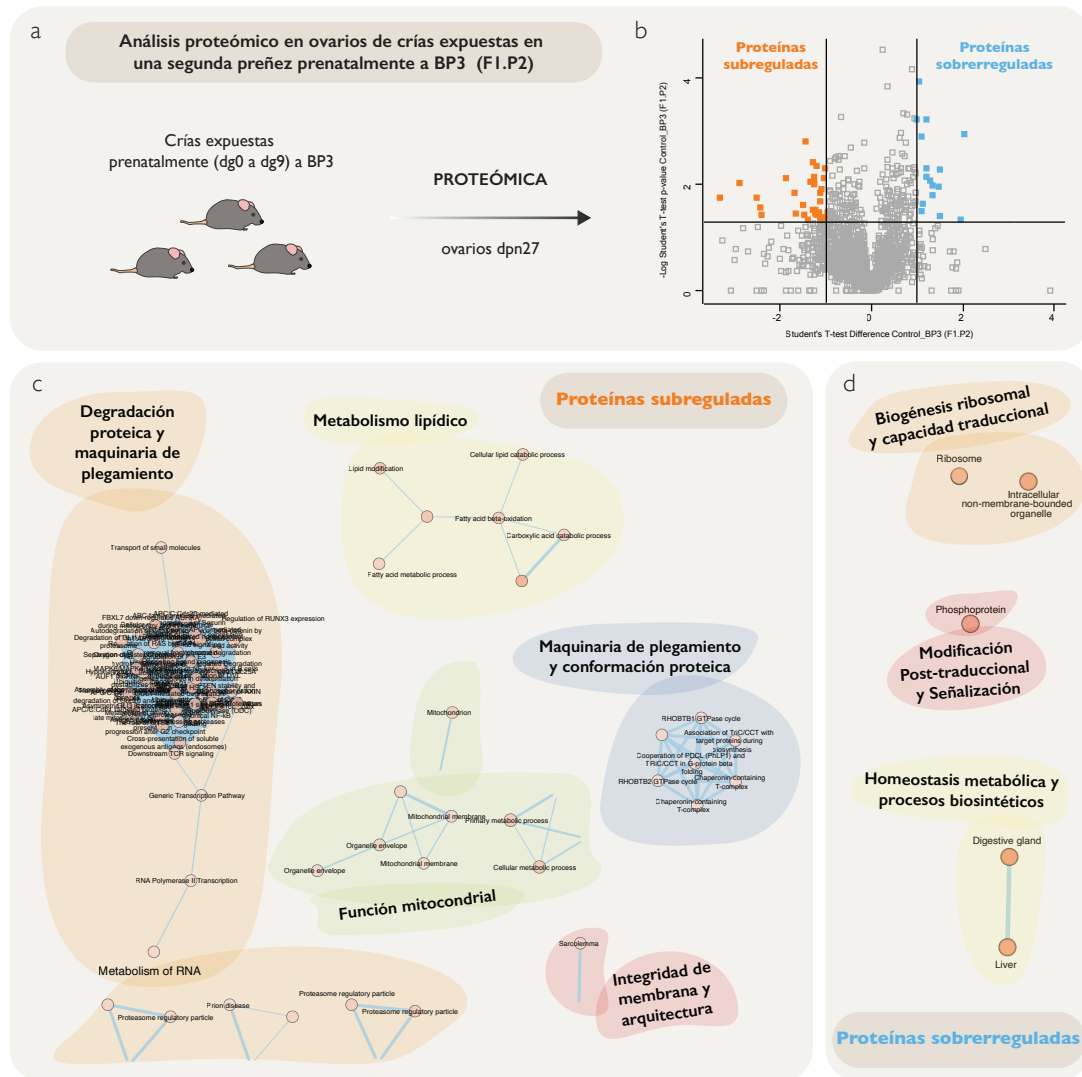


Figura 39: Caracterización del proteoma ovárico en crías con exposición prenatal a BP3 durante una segunda gestación (F1.P2). a) Esquema del diseño experimental: exposición prenatal a BP3 (dg0 a dg9) y obtención de muestras de ovario al día postnatal 21 (dpn21) en crías nacidas de una segunda preñez. b) Gráfico de volcán (Volcano plot) que ilustra el perfil proteómico diferencial; los puntos naranjas indican proteínas subreguladas y los puntos azules proteínas sobreexpresadas (Student's T-test, p-value < 0.05). c) Redes de interacción de las proteínas subreguladas, donde se observa una afectación multiorganelar que incluye clústeres de degradación proteica y maquinaria de plegamiento, metabolismo de RNA, metabolismo lipídico y función mitocondrial. Se destaca además un nodo crítico relacionado con la integridad de membrana y la arquitectura celular. d) Análisis funcional de las proteínas sobreexpresadas, evidenciando una respuesta focalizada en la biogénesis ribosomal y la capacidad traduccional, la homeostasis metabólica y procesos biosintéticos, así como mecanismos de modificación post-traducciona y señalización.

En contraste, las proteínas **sobreexpresadas** (Tabla 10) indicaron una respuesta agresiva de supervivencia metabólica y epigenética. El hallazgo más destacado fue la sobreexpresión de Prkaa1 (AMPK alfa-1, Q5EG47), el sensor maestro de energía celular que se activa ante bajos niveles de ATP.

Tabla 10: Perfil proteómico diferencial en crías expuestas (F1.P2) a BP3. La tabla enumera las proteínas que mostraron variaciones en su abundancia relativa en comparación con el grupo control. Se clasifican en proteínas subreguladas y sobreexpuestas, detallando su código de acceso (UniProt) y el nombre del gen correspondiente.

Análisis proteómico crías expuestas a BP3 F1.P2			
Proteínas subreguladas		Proteínas sobreexpuestas	
Código de acceso (UniProt)	Nombre del gen	Código de acceso (UniProt)	Nombre del gen
Q03265	Atp5f1a	P43274	H1-4
P01942	Hba	A0A0A6YX26	Rpl31
P80314	Cct2	Q6ZWW7	Rpl35
P45376	Akr1b1	Q8BG13	Rbm3
F8WIV2	Serpnb6a	Q8R349	Cdc16
P80313	Cct7	Q9D7S7	Rpl22l1
Q9D154	Serpnb1a	P54227	Stmn1
Q99LC5	Etfa	A0A087WPM0	Selenoh
Q9DB77	Uqcrc2	E9QAS5	Chd4
Q07417	Acads	Q3URD3	Slmap
Q8BJY1	Psm5	Q5EG47	Prkaa1
P10107	Anxa1	A0A494BB95	Eif1a
Q9CQ62	Decr1	Q9CR86	Carhsp1
Q91VB8	Hba-a1	A0A0R4J170	Smarca4
Q9WVJ2	Psm13	A6H644	Ppp1r12b
Q61183	Papola		
Q9CX56	Psm8		
Q8CFI7	Polr2b		
Q62465	Vat1		
P61290	Psme3		
P48774	Gstm5		
Q99L13	Hibadh		
P42125	Eci1		
A0A0G2JEC4	Sh3glb1		
Q61263	Soat1		
P13439	Umps		
O89112	Lanc1		
B1AT82	Prpsap1		
Q8BH69	Sephs1		
Q9Z2N8	Actl6a		
Q6ZPR5	Smpd4		
O08917	Flot1		
Q08857	Cd36		
Q8CGA0	Ppm1f		

Concurrentemente, se observó un enriquecimiento masivo en maquinaria de "Modificación Post-traducciona y Cromatina", esto incluye el aumento de Smarca4 (Brg1, A0A0R4J170) y Chd4 (E9QAS5), ambos motores de complejos de remodelación de cromatina dependientes de ATP (SWI/SNF y NuRD), así como la histona linker H1-4 (P43274). Asimismo, se detectó un aumento en la capacidad de síntesis de proteínas (Biogénesis ribosomal) evidenciado por múltiples proteínas ribosomales (Rpl31, Rpl35).

En los anexos se puede acceder a la información completa sobre el proceso biológico en el que están implicadas las proteínas subreguladas y sobreexpresadas de las crías F1.P1 (**Anexo I: Análisis proteómico en ovarios de crías expuestas a BP3 prenatalmente (primera gestación)**) y F1.P2 (**Anexo II: Análisis proteómico en ovarios de crías expuestas a BP3 prenatalmente (segunda gestación)**)

5.5. Discusión

El presente estudio evaluó el impacto de la exposición prenatal a BP3 en el proteoma ovárico al momento del destete (dpn21). Al comparar los efectos de una exposición simple (F1.P1) versus una exposición acumulativa multigestacional (F1.P2), podemos concluir que el impacto de BP3 sobre el estado proteómico de los ovarios de las progenies antes de la estimulación con gonadotrofinas es notablemente diferente entre F1.P1 y F1.P2: mientras que el primer impacto compromete la maquinaria de división y estructura celular, la exposición acumulativa induce un marcado declive en la bioenergética y el control de calidad proteica.

En el grupo de exposición simple (F1.P1), la toxicidad se centró en la integridad física y replicativa del tejido. El hallazgo distintivo fue la subregulación de la Topoisomerasa II alfa (Top2a) y de la Desmoplaquina (Dsp). La Top2a es una enzima esencial para desenredar las moléculas de ADN y separar las cromátidas hermanas durante la mitosis (Alberts et al., 2015); su disminución podría representar un obstáculo directo para la proliferación de las células de la granulosa en desarrollo. Simultáneamente, la baja de Dsp compromete los desmosomas, que otorgan resistencia mecánica al epitelio, sugiriendo que estos folículos podrían ser estructuralmente frágiles.

El análisis proteómico revela alteraciones marcadas en la arquitectura estructural del ovario F1.P1, caracterizadas por una disminución significativa de Dsp y queratinas (Krt1, 76, 78, 42). Estos componentes del citoesqueleto son críticos para la fisiología ovárica: el epitelio superficial y la corteza deben soportar cambios morfológicos drásticos y el trauma físico repetido de la ruptura folicular durante la

ovulación, son procesos que requieren una sólida integridad de los desmosomas y filamentos intermedios para la posterior reparación tisular (Auersperg et al., 2001). Si bien la tasa ovulatoria se mantiene normal en esta etapa (posiblemente debido a una compensación funcional evidenciada por la sobreexpresión de reguladores de actina como Calponina-2), el perfil proteómico sugiere una fragilidad estructural subyacente compatible con estudios previos. Piprek et al., (2022) demostraron que la delección funcional de Dsp en células somáticas gonadales compromete severamente la supervivencia de las células germinales e impide la formación adecuada de folículos, resultando en gónadas hipoplásicas. De manera similar, Fuchs & Cleveland, (1998) establecieron que las redes de queratina defectuosas no necesariamente fallan en reposo, sino que predisponen a las células a la citólisis mecánica bajo estrés físico.

En conjunto, estos antecedentes sugieren que la disminución de estas proteínas estructurales en la F1.P1 no es inocua, sino que constituye un estado de "vulnerabilidad". La persistencia de un microambiente biomecánicamente comprometido representa un factor de riesgo para el agotamiento prematuro de la reserva ovárica o la falla ante desafíos reproductivos futuros.

Sin embargo, el ovario F1.P1 parece montar una respuesta defensiva a través de la sobrerregulación de Mre11, que indica una activación de la reparación de roturas de doble cadena del ADN, y el aumento de Hmgcs1 sugiere un esfuerzo biosintético para mantener la producción de colesterol *de novo*, un sustrato crítico para la esteroidogénesis ovárica (Leung & Adashi, 2019).

A diferencia del grupo anterior, en el grupo F1.P2 el daño evolucionó hacia un compromiso metabólico severo. Aquí no observamos fallas en Top2a, sino una caída crítica en la maquinaria mitocondrial (enzimas de la β -oxidación y cadena de transporte de electrones como Etfa y Uqcrc2) y una fuerte activación del sensor de estrés energético AMPK (Prkaa1). La activación de AMPK ocurre cuando los niveles de ATP son bajos y actúa como un "freno" metabólico, inhibiendo procesos costosos como la biosíntesis para conservar energía.

El análisis proteómico revela alteraciones marcadas en vías metabólicas del ovario F1.P2, especialmente relacionadas con la energía celular. Las reducciones en proteínas de la β -oxidación de ácidos grasos y de la cadena respiratoria mitocondrial, señalan un estrés energético severo. Estos procesos son críticos en el folículo: la β -oxidación mitocondrial degrada ácidos grasos para generar acetil-CoA (Dunning et al., 2014)(**Figura 40**). En el desarrollo folicular, las células de granulosa y teca consumen gran cantidad de ATP en proliferación, producción de esteroides y preparación para la ovulación (Dunning et al., 2010). El hallazgo de proteínas disminuidas en la β -

oxidación concuerda con estudios previos. Valsangkar & Downs, (2013) mostraron que durante la maduración inducida, la β -oxidación aumenta significativamente en ovocitos estimulados con FSH+EGF (Dunning et al., 2010). En contraste, el bloqueo de la β -oxidación con etomoxir durante la maduración ovocitaria impidió el desarrollo posterior de blastocistos (Dunning et al., 2010). Similarmente, Valsangkar & Downs (2013) demostraron que la reanudación meiótica inducida por FSH o hCG en ovocitos de ratón se acompañaba de un aumento de la FAO (β -oxidación) en el complejo cúmulo-ovocito. De hecho, inhibidores de la β -oxidación (ej. etomoxir, malonil-CoA) bloquearon completamente la ovulación inducida por FSH en sus ensayos. Estas evidencias experimentales señalan la importancia de los hallazgos del análisis proteómico: un déficit en β -oxidación mitocondrial en F1.P2 comprometería la producción de ATP necesaria para que el folículo responda al pico gonadotrópico.

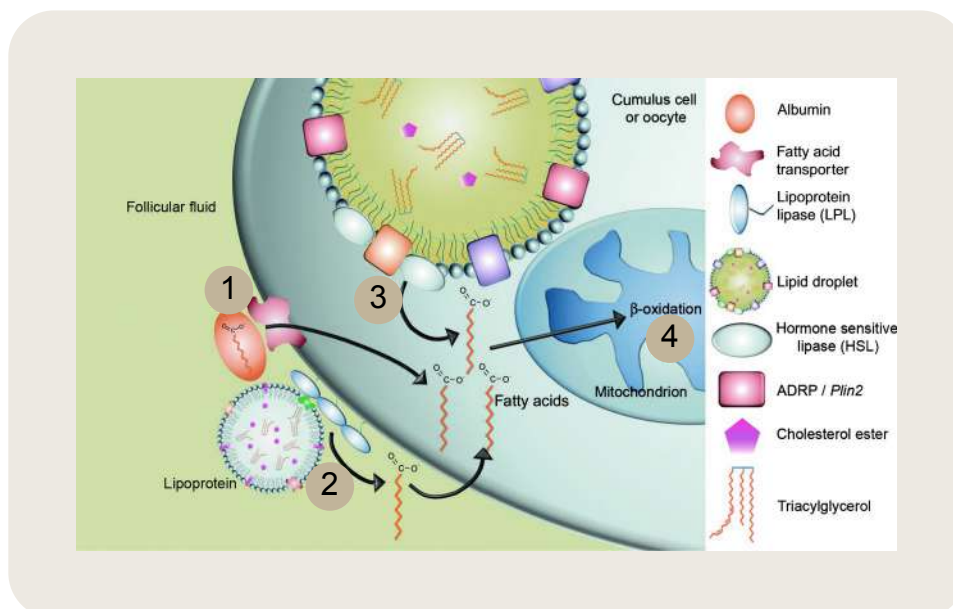


Figura 40: Esquema de los mecanismos propuestos de movilización y catabolismo de ácidos grasos libres en el complejo cúmulo-ovocito. (1) Los ácidos grasos libres (FFAs) en el líquido folicular se encuentran unidos a la albúmina e ingresan a las células a través de transportadores de ácidos grasos o por difusión directa a través de la bicapa lipídica, aunque los mecanismos exactos no se conocen por completo. (2) La movilización de triacilglicerol desde las lipoproteínas en el líquido folicular puede ocurrir mediante la acción de la lipoproteína lipasa extracelular, la cual libera FFAs que quedan disponibles para la captación celular. (3) Los triacilglicerol intracelulares se almacenan en células del cúmulo y ovocitos dentro de gotas lipídicas rodeadas por proteínas de revestimiento, incluyendo la Perilipina 2 (Plin2) en los ovocitos; tras su activación, las proteínas de estas gotas facilitan la hidrólisis mediada por lipasas y la liberación de FFAs. (4) Finalmente, los FFAs intracelulares generados mediante transporte o lipólisis quedan disponibles para el metabolismo a través de la β -oxidación en las mitocondrias. Modificado de Duning et al., 2014.

Otra observación en los ovarios de F1.P2 fue la falla en la proteostasis (homeostasis de proteínas). Identificamos una disminución simultánea del complejo de chaperoninas CCT (necesarias para plegar proteínas nuevas) y de subunidades del proteasoma (Psm5, Psm8, Psm13) encargadas de degradar proteínas

dañadas. la incapacidad de plegar proteínas o eliminar las defectuosas conduce a la acumulación de agregados tóxicos, un sello distintivo de envejecimiento celular acelerado y estrés crónico que no se observó en la primera generación (Alberts et al., 2015).

5.6. Conclusiones

Estos cambios a nivel proteómico se correlacionan con las distintas respuestas de los animales al estímulo con gonadotrofinas. Las hembras del grupo F1.P1 mantuvieron una tasa de ovulación normal tras la estimulación hormonal, lo que sugiere que los mecanismos de reparación (Mre11) y compensación biosintética (Hmgcs1) fueron suficientes para preservar la funcionalidad folicular frente a una primera exposición a BP3. Por el contrario, la disminución en el número de ovocitos ovulados en el grupo F1.P2 es consistente con el perfil de "agotamiento metabólico". La ovulación es un proceso de alta demanda energética. Según Leung & Adashi (2019), la activación de AMPK inhibe la síntesis de esteroides y el crecimiento celular en el ovario. Sumado a la falta de mitocondrias funcionales y la baja de Soat1 (que impide almacenar reservas de colesterol), el ovario en F1.P2 carecería de la "reserva funcional" necesaria para responder exitosamente a la superovulación.

Nuestros resultados en ovulación en el modelo de exposición a BP3 en dos gestaciones, no sugieren una falla primaria del evento ovulatorio en folículos plenamente maduros, sino un déficit en la progresión hacia un estado de crecimiento y diferenciación compatible con la competencia ovulatoria, un proceso fuertemente dependiente de la señalización por FSH. Esto se evidencia en que los folículos que no ovularon fueron consistentemente los que no alcanzaron tamaños comparables a los folículos ovulatorios, y que la exposición incrementó la proporción de folículos 'rezagados' dentro de la población. En este contexto, la alteración de vías metabólicas mitocondriales (incluida la β -oxidación de ácidos grasos) puede interpretarse como un factor limitante para sostener el programa transcripcional inducido por FSH (proliferación y diferenciación de células de la granulosa/teca, expansión antral y esteroidogénesis), favoreciendo que una fracción mayor de folículos no alcance el umbral requerido para ovular. Esta interpretación es consistente con los trabajos que vinculan la señalización de FSH con un incremento de la oxidación de ácidos grasos (Dunning et al., 2010; Valsangkar & Downs, 2013).

Desde el marco DOHaD, se ha propuesto que exposiciones tempranas pueden inducir adaptaciones metabólicas y endocrinas que permanecen latentes y se manifiestan solo ante demandas fisiológicas posteriores, como desafíos hormonales

o energéticos (Bar et al., 2021; Hales & Barker, 2001; Miller et al., 2011; Miller & Chen, 2013)

Capítulo 4

**Cultivos *in vitro* 3D de folículos revelan
que benzofenona-3, bisfenol-A y su
combinación inhiben la ovulación de forma
directa a dosis ambientalmente relevantes**



6. Capítulo 4: Cultivos *in vitro* 3D de folículos revelan que benzofenona-3, bisfenol-A y su combinación inhiben la ovulación de forma directa a dosis ambientalmente relevantes

6.1. Introducción

En trabajos previos hemos demostrado que la exposición perinatal o crónica a dosis de BPA ambientalmente relevantes altera la ovulación natural y la respuesta a gonadotrofinas en roedores, afectando el pool de folículos que expresan receptores de P₄ (Santamaría et al., 2016; Santamaría et al., 2017). Más recientemente, mostramos que tanto BPA como BP3, de forma individual o combinada, inhiben la ovulación en un modelo de multiexposición y multiparidad (Galliani et al., 2025). En seres humanos, la evidencia epidemiológica ha vinculado la exposición a BPA y BP3 con disfunciones reproductivas significativas en mujeres, incluyendo infertilidad, una disminución en el recuento de FA (Land et al., 2022; Pivonello et al., 2020) y malos resultados en tratamientos de fertilidad asistida, tales como una menor cantidad de ovocitos recuperados y menores tasas de implantación (Ehrlich et al., 2012; Mok-Lin et al., 2010; Pivonello et al., 2020). Particularmente en el caso de BP3, hay hallazgos recientes que indican una correlación negativa entre sus concentraciones urinarias y el recuento de FA, particularmente en mujeres jóvenes (Silva et al., 2024). Asimismo, se ha propuesto que la exposición a mezclas de DEs podría comprometer la calidad embrionaria y aumentar el riesgo de partos prematuros (Aker et al., 2019; Aung et al., 2019; Parra-Forero et al., 2026).

De particular interés para estudiar el impacto en la fisiología ovárica, es tener en cuenta las concentraciones de DEs en FF, el microambiente que rodea al ovocito. En este sentido, varios trabajos han informado los niveles de BPA y BP3 presentes en FF en mujeres de distintas partes del mundo. En el caso de BPA, se han reportado concentraciones en el rango de 0.3-68 ng/mL, con concentraciones pico de 0.15 µg/mL (Poormoosavi et al., 2019). En el caso de P3, hay menos trabajos que informen la presencia en FF, estando en alrededor de 0,00042 µg/mL (Hoffmann-Dishon et al., 2024).

Teniendo en cuenta estos antecedentes que muestran la presencia de BPA y BP3 en FF y los trabajos previos sobre su impacto en ovulación, resulta de interés saber si BP3, BPA, o ambos, tienen la capacidad de afectar el desarrollo folicular y ovulación de manera directa. En este sentido, una herramienta poderosa para desentrañar los efectos y los mecanismos subyacentes de compuestos químicos

sobre etapas específicas de la foliculogénesis y la ovulación es el uso de modelos *in vitro* de cultivo de folículos. Si bien hay trabajos publicados donde distintos grupos han aplicado este enfoque, los resultados obtenidos a partir de modelos *in vitro* no siempre han sido paralelos a los hallazgos *in vivo*. Por ejemplo, se ha demostrado que el BPA disminuye el crecimiento folicular e inhibe la ovulación *in vitro* únicamente a concentraciones relativamente altas (superiores a 100 μM) y no fisiológicas, lo que limita su relevancia para escenarios de exposición humana (Lenie et al., 2008; Zhang et al., 2019). Hasta donde sabemos, en el caso de BP3, no se ha estudiado su efecto sobre la ovulación *in vitro*.

En el caso de BPA, si bien es posible que en bajas concentraciones sea inocuo para el desarrollo folicular, hay algunos aspectos metodológicos a considerar, uno de los cuales es el estadio de desarrollo de los folículos al inicio del cultivo. La mayoría de los estudios que evaluaron su efecto sobre el desarrollo folicular *in vitro* utilizaron folículos preantrales pequeños (100–120 μm), los cuales podrían carecer de la competencia fisiológica de estadios más avanzados (Peretz et al., 2011; Zhang et al., 2019). Además del estadio folicular, el formato de cultivo desempeña un rol crucial; mientras que el cultivo 2D es ampliamente utilizado, los sistemas 3D encapsulados en alginato preservan mejor la arquitectura folicular, la interacción teca-granulosa y la comunicación mediada por uniones gap, ofreciendo una mayor fidelidad biológica para el estudio de la maduración y la ovulación (Desai et al., 2010).

Finalmente, dado que el receptor de estrógeno beta ($\text{RE}\beta$) es esencial para la diferenciación folicular normal y la respuesta a la FSH (Krege et al., 1998; Leung & Adashi, 2019), resulta indispensable estudiar su participación como mecanismo molecular subyacente a las posibles acciones de BPA o BP3.

En base a lo descripto, el presente estudio tuvo como objetivo cubrir las lagunas potenciales descritas en la literatura mediante la evaluación integral de los efectos BPA, BP3 y su combinación sobre la dinámica de la ovulación *in vitro* en concentraciones que estén dentro del rango de las detectadas en el FF humano. En primer lugar, se compararon los formatos de cultivo folicular 2D y 3D para determinar qué modelo ofrece mayor sensibilidad y relevancia fisiológica para detectar los efectos disruptores de la ovulación. En segundo lugar, para identificar los posibles mecanismos de acción subyacentes, se investigó si la disrupción de la competencia ovulatoria inducida por el BPA está mediada por la vía del receptor de estrógeno beta ($\text{RE}\beta$, junto con el perfil de producción de hormonas esteroides (E_2 y E_1), y la expresión de genes clave de la esteroidogénesis (*Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*) y receptores de gonadotrofinas (*Fshr*, *Lhcgr*). Por último, tras identificar el sistema más

idóneo, se realizó el cultivo folicular 3D en ratón con el fin de explorar diferencias de sensibilidad interespecies.

6.2. Objetivos

Identificar efectos y mecanismos de acción directa de BP3, BPA y BP3+BPA sobre desarrollo folicular y ovulación en modelos *in vitro* 2D y 3D de cultivo de folículos aislados.

6.3. Materiales y métodos

6.3.1. Animales

Se obtuvieron 4 ratonas hembra C57BL/6 y ratas Wistar, de 6 semanas de edad, del Centro de Medicina Comparada - ICIVET Litoral (UNL, CONICET, Santa Fe, Argentina). A su llegada a nuestras instalaciones de investigación, los animales se alojaron durante dos semanas para permitir la aclimatación y adaptación al nuevo entorno. Durante este período, tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum* y se mantuvieron en jaulas de acero inoxidable en un entorno controlado con una temperatura constante de 22 ± 2 °C y un ciclo de luz de 14 horas (de 06:00 a 20:00). El bienestar animal se garantizó mediante evaluaciones diarias que incluyeron la monitorización de su apariencia, comportamiento y las condiciones de la jaula.

Después del período de aclimatación, las hembras se aparearon con machos de fertilidad comprobada para asegurar una reproducción exitosa tanto en ratas como en ratones. Para los experimentos murinos, empleamos un modelo de ratón híbrido F1, denominado en adelante (C57BL/6 × BALB/c)F1, generado al aparear hembras C57BL/6 con machos BALB/c, ambos obtenidos originalmente del Centro de Medicina Comparada – ICIVET.

Este modelo híbrido se eligió por dos razones principales. Primero, el apareamiento alogénico de hembras C57BL/6 con machos BALB/c imita las condiciones de apareamiento naturales en mamíferos no endogámicos, incluidos los humanos, lo que mejora la relevancia traslacional de los hallazgos, como demostramos previamente (Meyer et al., 2019; Müller et al., 2018; Santamaria et al., 2020). Segundo, según lo informado por Carola et al. (2005), la descendencia híbrida F1 resultante es genéticamente idéntica, lo que minimiza la variabilidad biológica entre individuos (Carola et al., 2005). Esta uniformidad genética es particularmente ventajosa para los ensayos *in vitro*, ya que garantiza que las diferencias observadas en el desarrollo folicular y la ovulación sean atribuibles de manera más directa a los tratamientos químicos en lugar de a diferencias inherentes en el *background* genético.

La descendencia se utilizó para el aislamiento de folículos en el día postnatal 21 (día del destete). Todos los procedimientos experimentales se adhirieron a las directrices ARRIVE (Percie du Sert et al., 2020) y cumplieron con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de EE. UU. Además, los protocolos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad en la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-UNL, Santa Fe, Argentina (número de permiso CE: CE2018-61-C).

6.3.2. Selección y preparación de soluciones

Las dosis a las que se expusieron los folículos cultivados se eligieron basándonos en concentraciones informadas previamente en el FF humano. La dosis de BPA (99% de pureza, Sigma-Aldrich) utilizada fue de 0,15 µg/mL (Poormoosavi et al., 2019) y la dosis de BP3 (98% de pureza, Sigma-Aldrich) fue de 0,00042 µg/mL (Hoffmann-Dishon et al., 2024). Para los estudios mecanísticos, se incorporó el antagonista selectivo del RE β , PHTPP (4-[2-phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol), en una concentración de 0.65 pM. Las soluciones madre se prepararon en DMSO, asegurando que la dilución final en contacto con los folículos no superara el 0,01% (v/v) para evitar comprometer la viabilidad celular.

Teniendo en cuenta los criterios de dosimetría para sistemas *in vitro*, las concentraciones nominales no reflejan necesariamente la fracción biológicamente disponible de un compuesto (Groothuis, Heringa, Nicol, Hermens, Bas. J. Blaauboer, et al., 2015). Los enfoques de modelado de balance de masa que tienen en cuenta la partición en fases que contienen proteínas y lípidos predicen que la concentración libremente disuelta de estos DEs en dichos medios es sustancialmente menor que la concentración nominal añadida (Fischer et al. 2017). Por ello, para la selección de las dosis consideramos que la extrapolación directa de las concentraciones de fluidos *in vivo* a las condiciones de exposición *in vitro* requiere la consideración de la biodisponibilidad química. El medio de cultivo utilizado en este estudio contiene albúmina sérica bovina (BSA) y albúmina rica en lípidos (AlbuMAX), que son conocidas por unirse a compuestos hidrofóbicos como el BPA y la BP3, reduciendo así la fracción libremente disuelta disponible para la difusión en los tejidos (Ikhlas et al., 2019; Teegarden et al., 2005). Además, los folículos fueron encapsulados en una matriz de hidrogel de alginato, lo que introduce otra barrera de difusión para los

compuestos lipofílicos que migran desde el medio rico en proteínas hacia el compartimento folicular (Hoare & Kohane, 2008; Lee & Mooney, 2012).

Debido a que estos modelos de dosimetría no incorporan el secuestro adicional asociado con las matrices de alginato 3D, consideramos que la concentración efectiva de BPA y de BP3 que llega al folículo en nuestro sistema se reduce aún más. Por lo tanto, seleccionamos como concentraciones nominales los rangos superiores informados en el fluido folicular humano, asumiendo que la exposición efectiva del folículo se reduce considerablemente en todos los tratamientos debido a estos factores de matriz.

6.3.3. Diseño experimental

6.3.3.1. Cultivo de folículos en un modelo 2D

Las ratas hembras de 21 días de edad fueron sacrificadas mediante exposición a una atmósfera saturada de CO₂ seguida de dislocación cervical. Inmediatamente, se extrajeron los ovarios y se transfirieron a un medio de mantenimiento (MM, ver más adelante). Bajo condiciones estériles y utilizando un estereomicroscopio, los folículos preantrales tardíos (~220-250 µm de diámetro) fueron aislados mediante microdissección mecánica con dos agujas finas estériles. El tejido ovárico fue fragmentado cuidadosamente y los folículos fueron liberados de manera individual evitando dañar la membrana basal y preservando la integridad de las capas de células de la granulosa y de la teca. Sólo se seleccionaron para cultivo aquellos folículos con morfología esférica, ovocito central visible, múltiples capas compactas de células de la granulosa, membrana basal intacta y ausencia de signos de atresia o tejido estromal adherido. Los folículos seleccionados fueron transferidos inmediatamente al medio de cultivo correspondiente para los experimentos en sistemas 2D o 3D, previamente equilibrado a 37 °C. Una vez aislados, los folículos se colocaron en una placa de Petri que contenía MM mantenido sobre una placa térmica a 37 °C (**Figura 41**).



Figura 41: Esquema metodológico del cultivo *in vitro* de folículos ováricos en modelo bidimensional (2D). a) Aislamiento y selección manual de folículos preantrales tardíos en gotas de medio de mantenimiento (MM). b) Disposición de los folículos en cultivo individual en placa de 96 pocillos, conteniendo 200 μ L de medio de crecimiento y una capa superior de 100 μ L de aceite mineral para evitar la evaporación. c) Microfotografía representativa de un foliculo aislado obtenida mediante microscopía invertida.

Posteriormente, bajo una campana de flujo laminar, se transfirió un foliculo por pocillo a una placa de 96 pocillos que contenía 200 μ L de medio de cultivo con el tratamiento correspondiente para cada grupo experimental (**Figura 41, panel b**). Finalmente, se añadieron 100 μ L de aceite mineral a cada pocillo para evitar la evaporación (Heidari et al., 2011). Las placas se incubaron durante 14 días a 37 °C en una atmósfera controlada con 5% de CO₂ (Thermo Fisher Scientific).

6.3.3.2. Cultivo de folículos en un modelo 3D

Los folículos se obtuvieron de la descendencia de 21 días de edad de (C57BL/6 $\times$ BALB/c)F1, ratones y ratas Wistar, los folículos fueron disecados manualmente bajo condiciones estériles, del mismo modo que para el cultivo 2D (ver sección 6.3.3.1).

Para el modelo 3D, los folículos seleccionados fueron encapsulados en alginato al 0,5% (Converse et al., 2023) (**Figura 42**). Todo el proceso de encapsulación se realizó bajo condiciones estériles. Cada foliculo se colocó en una gota de 5 μ L de solución de alginato sobre una membrana (**Figura 42, panel a**), que luego se transfirió cuidadosamente a una solución salina que contenía 140 mM de NaCl y 50 mM de CaCl₂ (Converse et al., 2023) (**Figura 42, panel b**). Los folículos permanecieron en esta solución durante 5 minutos para permitir la gelificación del alginato.

Una vez encapsulados, los folículos se transfirieron al medio de mantenimiento (MM) colocado sobre una placa térmica a 37 °C (**Figura 42, panel c**). Finalmente, en cabina de seguridad biológica grado 2, se colocó un foliculo encapsulado por pocillo

en una placa de 96 pocillos, cada uno con 200 μ L de medio de cultivo específico para el crecimiento folicular (GM) (**Figura 42, panel d**).



Figura 42: Metodología de encapsulación de folículos en matriz de alginato para cultivo tridimensional (3D). a) El folículo aislado se coloca en una gota de 5 μ L de alginato al 0,5% sobre un soporte de membrana bajo condiciones estériles. b) Inmersión del soporte en una solución salina (140 mM NaCl y 50 mM CaCl₂) durante 5 minutos para inducir la gelificación de la matriz de alginato. c) Recuperación y estabilización del folículo encapsulado en medio de mantenimiento (MM) a 37 °C previo a su distribución en las placas de cultivo. d) Microfotografía representativa de un folículo encapsulado ovulando tras 14 días de incubación en medio de crecimiento (GM), observada mediante microscopía invertida.

6.3.3.3. Concentraciones de gonadotrofinas en el cultivo (aplicable a ambos modelos)

Desde el día 1 hasta el día 11 de cultivo, todos los folículos fueron estimulados con un medio de crecimiento con 0,1 IU/mL de FSH y 0,01 IU/mL de hCG (Dinopoulou et al., 2013; Sun et al., 2004; Zhang et al., 2019) (**Figura 43**). El día 12 se aplicó un estímulo ovulatorio con 1,5 IU/mL de hCG (Converse et al., 2023; Dinopoulou et al., 2013; Sun et al., 2004; Zhang et al., 2019)(**Figura 43**). Los ovocitos ovulados se contaron los días 13 y 14 (**Figura 43**). Se realizaron cambios de medio de 100 μ L cada 48 horas para mantener condiciones óptimas.

Los grupos experimentales incluyeron: **CONTROL** (DMSO, vehículo); b) **BP3**; c) **BPA**; y d) **BP3 + BPA**.

El número de folículos analizados en cada grupo se detalla en las leyendas de las figuras dentro de la sección de Resultados. Los folículos que presentaron ovulación espontánea antes del estímulo con hCG, fueron excluidos de todos los análisis cuantitativos.

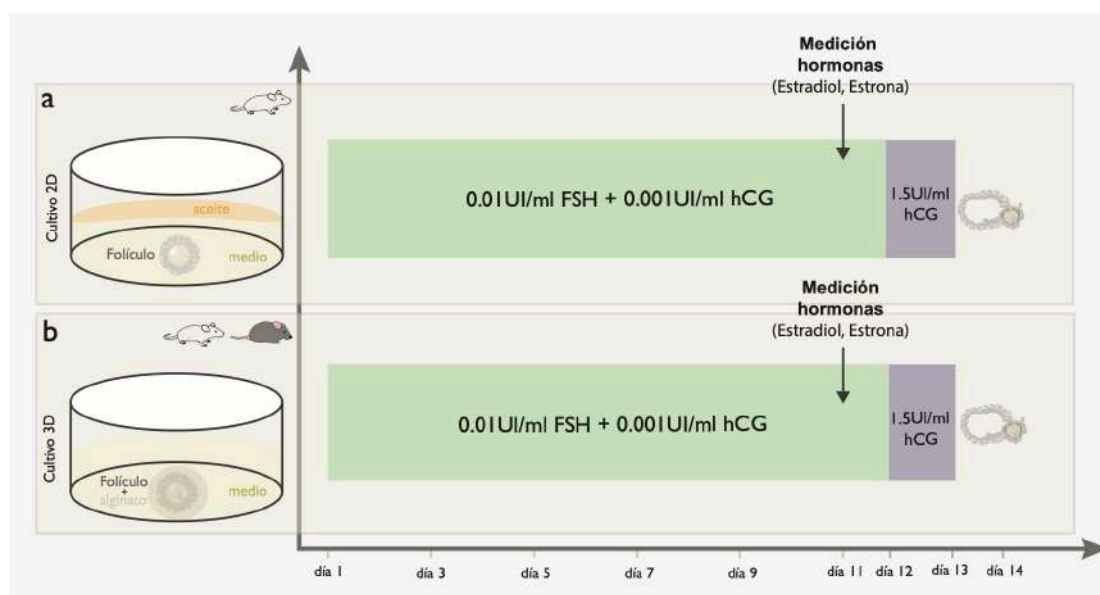


Figura 43: Cultivo de folículos aislados en formatos 2D y 3D. a) Cultivo de folículos de rata en un modelo bidimensional (2D) utilizando una placa de 96 pocillos, con aceite mineral sobrepuesto al medio de cultivo. El cultivo tuvo una duración de 14 días, con el crecimiento folicular estimulado con 0,1 IU/mL de FSH y 0,01 IU/mL de hCG. El día 12 se administró un estímulo ovulatorio de 1,5 IU/mL de hCG, y la ovulación se evaluó los días 13 y 14. b) Cultivo de folículos de ratas Wistar y de ratones (C57BL/6 × BALB/c)F1 en un modelo tridimensional (3D), donde los folículos fueron encapsulados en alginato y cultivados en placas de 96 pocillos durante 14 días, bajo las mismas condiciones hormonales que el modelo 2D. La ovulación se evaluó los días 13 y 14 tras el estímulo con hCG en el día 12.

6.3.4. Composición de los Medios de Cultivo

6.3.4.1. Medio de mantenimiento (MM)

El MM consistió en DMEM/Ham's F12 suplementado con AlbuMAX I (BSA rica en lípidos; Gibco™, Thermo Fisher Scientific) y una mezcla de antibióticos de penicilina-estreptomicina (Converse et al., 2023).

6.3.4.2. Medio de crecimiento (GM)

El GM se compuso de DMEM/Ham's F12 suplementado con insulina-transferrina-selenio (ITS-X; Gibco™, Thermo Fisher Scientific), BSA (MilliporeSigma), AlbuMAX I (BSA rica en lípidos; Gibco™, Thermo Fisher Scientific), ácido ascórbico (MilliporeSigma), 0.1 UI/mL de FSH y 0.01 UI/mL de hCG.

En el día 12 de cultivo, se administró un pico de hCG de 1.5 UI/mL para inducir la ovulación (Converse et al., 2023).

6.3.5. Medición de diámetros foliculares

Se capturaron imágenes utilizando un microscopio de contraste de fases invertido (Olympus, aumento: 10X) equipado con una cámara Nikon Coolpix L20. El diámetro más largo (µm) de cada folículo se midió cada 48 horas durante todo el período de cultivo utilizando el software Fiji (**Figura 44**). La calibración para las

mediciones en Fiji se realizó utilizando una cámara de Neubauer como referencia de escala.



Figura 44: *Medición del crecimiento folicular.* Captura de imágenes representativas mediante microscopía de contraste de fases invertido (10X) y determinación del diámetro folicular mayor (μm) con una frecuencia de 48 h durante todo el período de cultivo. El procesamiento de las imágenes se realizó mediante el software Fiji, utilizando una cámara de Neubauer como referencia de escala para la calibración de las mediciones.

6.3.6. Cuantificación de estradiol y estrona mediante sistemas UHPLC

6.3.6.1. Sustancias químicas y reactivos

Las soluciones estándar de reserva se prepararon mediante pesada de precisión y disolviendo una porción de cada estándar hasta alcanzar concentraciones de 1,00 mg/mL en MeOH. Estas soluciones se almacenaron a 4 °C en recipientes resistentes a la luz y se dejaron alcanzar la temperatura ambiente antes de su uso. Cuando fue necesario, se prepararon soluciones estándar de trabajo mediante dilución (1/10 o 1/100) de cada solución de reserva en una mezcla de agua: ACN (60:40). Tanto las soluciones como los solventes para la fase móvil se filtraron siempre a través de membranas de nylon de 0,45 μm . Asimismo, las soluciones de las muestras se filtraron a través de filtros para jeringa de 0,22 μm antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

6.3.6.2. Análisis UHPLC-FLD para estradiol y estrona

Las determinaciones se realizaron utilizando por UHPLC en un sistema Agilent 1260 Infinity UHPLC (Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba binaria, membrana desgasificadora, inyector automático, compartimento de columna termostaticado y detector FLD. Para el control del instrumento, la adquisición de datos y el análisis de los mismos se empleó el paquete de software OpenLab CDS Chemstation (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (3 μm $\times$ 100 mm, tamaño de partícula de 4,6 μm) de Agilent (Waldbronn, Alemania). La temperatura de la columna se fijó en 25 °C y el caudal en 0,7 mL/min utilizando una proporción de 60% ACN y 40% de agua. El volumen de inyección fue de 10 μL , mientras que las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas para fines de cuantificación fueron de 225 nm y 315 nm, respectivamente.

6.3.7. Análisis de la expresión génica

6.3.7.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Los folículos se cultivaron durante 14 días *in vitro* y se estimularon con FSH y hCG para promover el crecimiento y la posterior ovulación. Tras el período de cultivo, los folículos se recolectaron y homogeneizaron en grupos (pools) de entre 2 y 9 folículos por muestra. El ARN total se extrajo utilizando el reactivo Trizol (Life Technologies, NY, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración y pureza del ARN se evaluaron mediante mediciones de A260/A280 utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, para mantener la representatividad biológica de cada grupo, el volumen total de ARN extraído de cada muestra se transcribió inversamente a ADNc utilizando la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen) y cebadores oligo(dT) (Invitrogen), siguiendo protocolos publicados anteriormente. El ADNc resultante se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

6.3.7.2. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Se analizaron los niveles de expresión relativa de ARNm de citocromo P450scc (Cyp11a1), 17 α -hidroxilasa (Cyp17a1), P450aromatasa (Cyp19a1), receptor de la hormona folículo-estimulante (Fshr) y receptor de la hormona luteinizante (Lhcgr). Los cebadores específicos se diseñaron utilizando la herramienta NCBI Primer-BLAST (**Tabla 11**). Los ensayos de RT-qPCR se realizaron utilizando HOT FIRE Pol EvaGreen qPCR Mix Plus en un sistema StepOne Real-Time PCR. Las

condiciones de termociclado consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C por 15 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s, hibridación por 15 s a temperaturas específicas (59 °C, 58 °C o 60 °C según el gen) y una extensión final a 72 °C por 30 s. Se incluyeron controles sin molde (NTC) y se generaron curvas estándar para determinar las eficiencias de amplificación. Cada muestra se analizó en tres corridas independientes por duplicado técnico.

Tabla 11: Cebadores (primers) y productos de PCR para experimentos de RT-PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia de primers (5'-3')	Tamaño del amplicón	Número de acceso a Genbank
		(pb)	
L19	F:AGCCTGTGACTGTCCATTCC	153	NM_031103
	R:TGGCAGTACCCTTCCTCTTC		
Cyp11	F:AGGGAGAACGGCACACACAG	143	NM_017286.2
	R:TCGCAGGAGAAGAGAGTCGC		
Cyp17	F:GGTGATAAAGGGTTATGCCA	117	NM_012753
	R:GCTTGAATCAGAATGTCCGT		
Cyp19	F:TGGCAGATTCTTGTGGATGG	118	AC_000076.1
	R:CGAGGACTTGCTGATGATGAGT		
Fshr	F:TTGCTGGATTTGGAGACCTG	90	NM_199237.1
	R:TGGGTAGGTTGGAGAACACA		
Lhcgr	F:ACTATAACCACGCCATAGAC	71	NM_012978.1
	R:GGCAAACACAGTAAAGAAGC		

6.3.7.3. Normalización de datos y análisis estadístico

Para considerar las variaciones en el rendimiento del ARN y la biomasa, los valores de Ct se ajustaron por unidad biológica (por folículo). El Ct ajustado (Ct_{aj}) se calculó mediante la fórmula: $Ct_{aj} = Ct_{medido} + \log_2(n)$, donde n representa el número de folículos por pool. La significancia estadística se determinó mediante la prueba Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test en el software REST 2009. Debido a que la normalización se realizó por unidad biológica antes de ingresar los datos al software, el gen de referencia se configuró con un valor constante para aplicar la ecuación de expresión relativa simplificada. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0.05$.

6.3.8. Estadística

El análisis estadístico para la expresión génica se llevó a cabo utilizando el software REST, tal como se detalló en la sección 7.2.7.3. de este capítulo. Para todos los demás parámetros experimentales, los datos se procesaron de la siguiente manera: los datos del diámetro folicular se presentan como la promedio $\pm$ SEM; los datos de producción hormonal, específicamente de E_2 y E_1 , se expresaron como Log_2 Fold Change. Para considerar la variabilidad biológica, cada réplica individual se normalizó respecto al promedio del grupo control correspondiente, y posteriormente se transformó mediante Log_2 . Esta transformación proporcionó una representación simétrica de los cambios relativos, facilitando la comparación directa entre los patrones de incremento (up-regulated) y disminución (down-regulated), al tiempo que estabilizó la varianza para el análisis estadístico.

La normalidad de la distribución de los datos se evaluó mediante la prueba de normalidad ómnibus de D'Agostino-Pearson (K^2), y los supuestos para el análisis paramétrico se verificaron confirmando la distribución normal de los residuales del modelo. Las diferencias entre los grupos experimentales se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías específicamente para los datos de crecimiento folicular en cultivos 2D y 3D que en sus grupos incluían la mezcla de compuestos, permitiendo evaluar su interacción, para todos los demás parámetros experimentales, se empleó un ANOVA de una vía. Cuando se detectaron diferencias significativas, se realizó la prueba post-hoc de la Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher no ajustada para comparaciones múltiples. Además, las proporciones de folículos ovulados y no ovulados se analizaron mediante la prueba exacta de Fisher, con los resultados expresados como porcentajes. Para todas las evaluaciones estadísticas, la significancia se estableció en $p \leq 0.05$. Todos los análisis y representaciones gráficas se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 5.0.

6.4. Resultados

6.4.1. Cultivo de folículos 2D vs. cultivo de folículos 3D

6.4.1.1. Tasa de ovulación y dinámica de crecimiento folicular en un modelo 2D de rata

En primera instancia, se evaluó el impacto de BPA y BP3 sobre los folículos utilizando un sistema de cultivo bidimensional. La exposición individual a BP3 o BPA inhibió significativamente la tasa de ovulación en los folículos de rata en comparación

con el grupo control (**Figura 45, panel a**). Sin embargo, no observamos inhibición cuando ambos compuestos se combinaron. De esta manera, en un sistema 2D, BP3 y BPA alteraron el proceso ovulatorio de manera independiente, sin observarse una interacción (potenciación de dicha inhibición o un efecto aditivo) cuando se usan combinados. Por el contrario, la ovulación fue similar al control en BP3+BPA.

Para analizar la dinámica de crecimiento, los folículos se categorizaron en dos grupos: aquellos que pudieron ovular y aquellos que permanecieron sin ovular. Dentro de cada categoría, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos tratados con BP3 o BPA y el grupo control (**Figura 45, panel c y d**). Sin embargo, e independientemente del grupo experimental, los folículos que no ovularon exhibieron un diámetro y una tasa de crecimiento reducidos en comparación con los folículos ovulados. Esto indica que la inhibición de la ovulación por exposición a BP3 o BPA estaría más vinculada a una alteración en el crecimiento folicular en respuesta al estímulo con las gonadotrofinas, y no a una alteración en la última etapa de ovulación en respuesta a hCG.

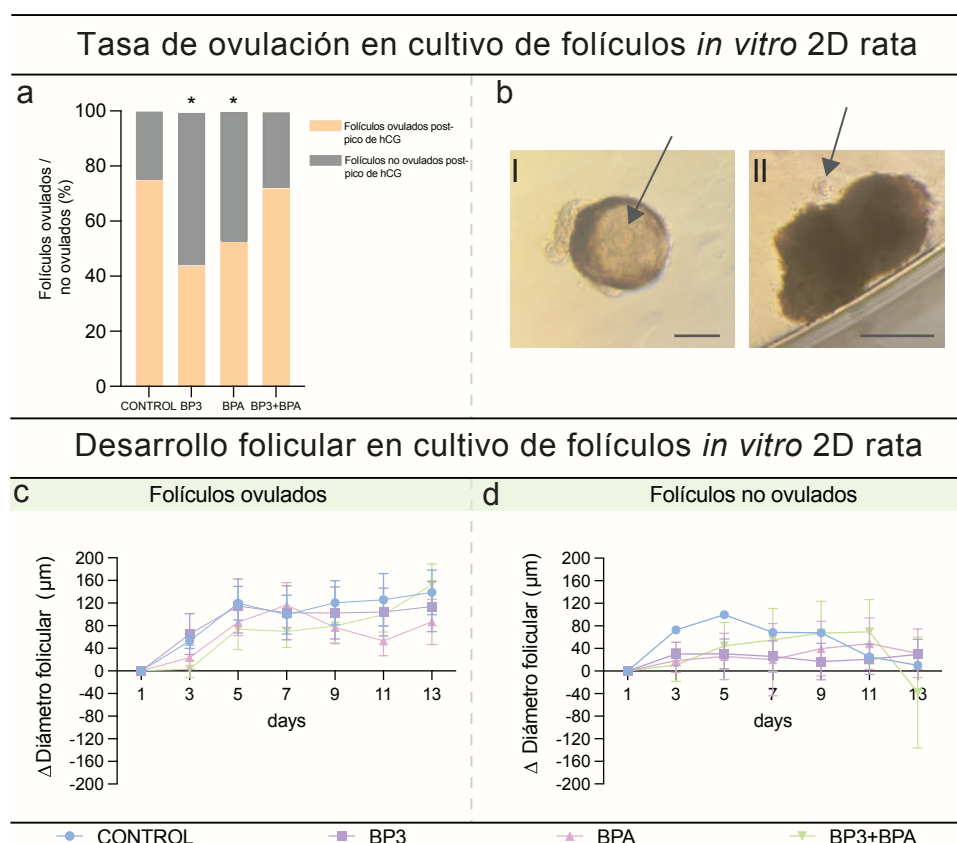


Figura 45: Tasa de ovulación y crecimiento de folículos ovulados y no ovulados después de la exposición a BP3, BPA y su mezcla (cultivo 2D de rata). a) Porcentaje de folículos ovulados y no ovulados en el día 14 de cultivo 2D, después del pico de hCG (n=20 CONTROL, n=18 BP3, n=18 BPA, n=18 BP3+BPA). b) I) Imagen representativa de folículos preantrales tardíos del grupo control en el día 1 de cultivo. II) Imagen representativa de un folículo en el día 14 de cultivo, después de la maduración con 0.1 UI/mL de FSH más 0.01 UI/mL de hCG y ovulación inducida con 1.5 UI/mL de hCG. c) Delta de crecimiento de los folículos ovulados a lo largo de 13 días de cultivo, medido cada dos días (n=15 CONTROL, n=8 BP3,

n=9 BPA, n=12 BP3+BPA). d) Delta de crecimiento de los folículos no ovulados a lo largo de 13 días de cultivo, medido cada dos días (n=5 CONTROL, n=10 BP3, n=9 BPA, n=6 BP3+BPA). Las flechas grises (→) indican los ovocitos. La barra de escala (línea) representa 100 μ m. El análisis estadístico en (a) se realizó utilizando la prueba exacta de Fisher; los datos se expresan como porcentajes. Para (c) y (d), el análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de dos vías; los datos se expresan como promedio $\pm$ SEM. No se observó interacción. Los niveles de significancia se indican como sigue: *:p<0.05. BP3 = benzofenona-3, BPA = bisfenol-A.

6.4.1.2. Tasa de ovulación y dinámica de crecimiento folicular en un modelo 3D de rata

A diferencia de lo observado en el sistema bidimensional, en el modelo de cultivo tridimensional (3D) las exposiciones a BP3 y BPA como su combinación (BP3+BPA) inhibieron de manera significativa la tasa de ovulación en comparación con el grupo control (Figura 46, panel a).

Como mencionamos antes, no hay trabajos que evalúen el efecto *in vivo* de BP3 y BPA sobre la ovulación. Por lo que, aun considerando las diferencias y la distancia entre los diseños experimentales, nuestra referencia *in vivo* para este caso son los resultados que describimos en el capítulo 2, donde vimos que BP3+BPA inhibe la ovulación en la camada de la segunda gestación. Por ello, seleccionamos al formato 3D como aquel que logra reproducir los resultados *in vivo* con mayor fidelidad. Este hallazgo nos parece particularmente relevante, ya que indicaría que la arquitectura tridimensional provista por la matriz de alginato facilita la detección de efectos que podrían pasar desapercibidos en sistemas de cultivo convencionales, especialmente en el caso de mezclas complejas de compuestos.

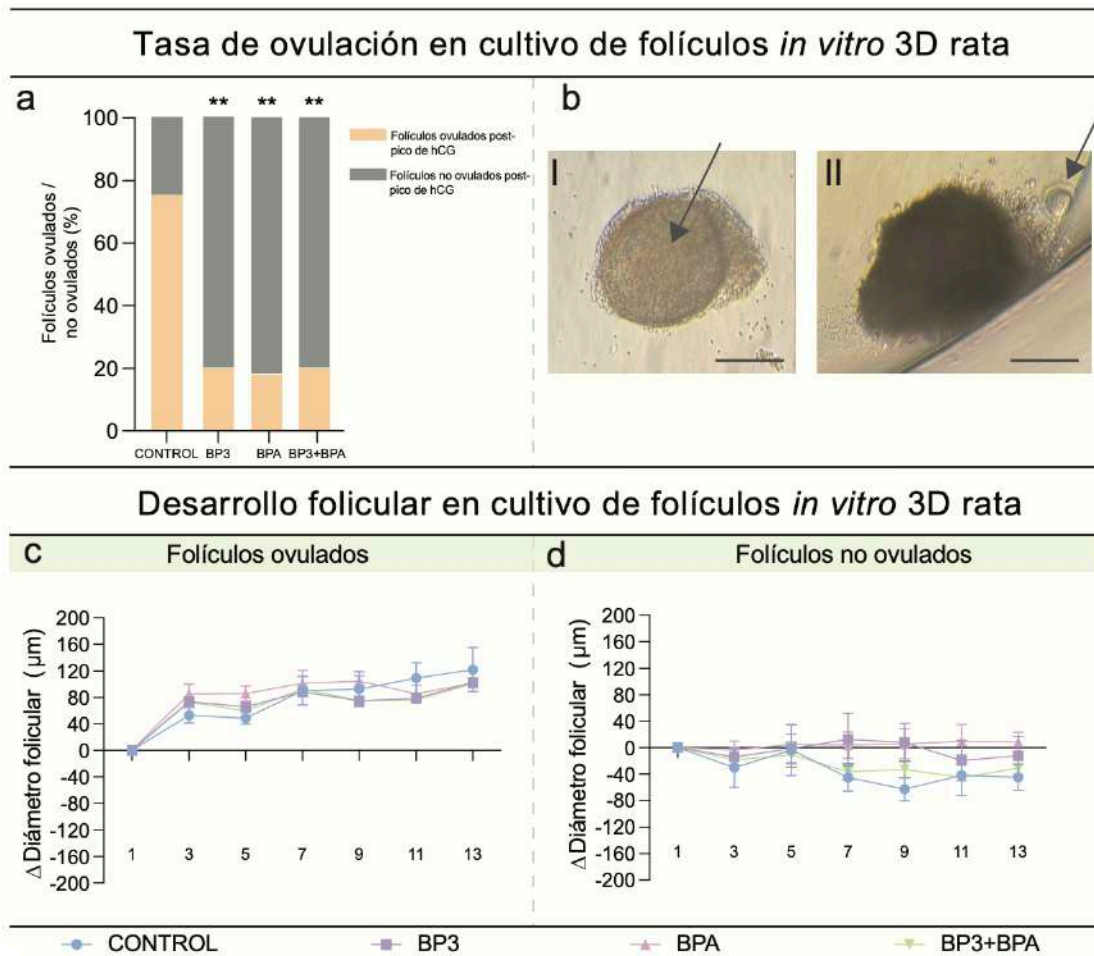


Figura 46: Tasa de Ovulación y Crecimiento de Folículos Ovulados y No Ovulados Después de la Exposición a BP3, BPA y su Mezcla (Cultivo 3D de Rata). a) Porcentaje de folículos ovulados y no ovulados en el día 14 de cultivo 3D, después del pico de hCG (n=12 CONTROL, n=10 BP3, n=11 BPA, n=10 BP3+BPA). b) I) Imagen representativa de folículos preantrales tardíos del grupo control en el día 1 de cultivo. II) Imagen representativa de un folículo en el día 14 de cultivo, después de la maduración con 0.1 UI/mL de FSH más 0.01 UI/mL de hCG y ovulación inducida con 1.5 UI/mL de hCG. c) Delta de crecimiento de los folículos ovulados a lo largo de 13 días de cultivo, medido cada dos días (n=9 CONTROL, n=2 BP3, n=2 BPA, n=2 BP3+BPA). d) Delta de crecimiento de los folículos no ovulados a lo largo de 13 días de cultivo, medido cada dos días (n=3 CONTROL, n=8 BP3, n=9 BPA, n=8 BP3+BPA). Las flechas grises (→) indican los ovocitos. La barra de escala (línea) representa 100 µm. El análisis estadístico en (a) se realizó utilizando la prueba exacta de Fisher; los datos se expresan como porcentajes. Para (c) y (d), el análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de dos vías; los datos se expresan como promedio ± SEM. Los niveles de significancia se indican como sigue: **:p<0.01 vs. CONTROL. BP3 = benzofenona-3, BPA = bisfenol-A.

Nuevamente se analizó la dinámica de crecimiento folicular diferenciando entre aquellos folículos que completaron la ovulación y aquellos que permanecieron sin ovular. Al igual que en el modelo 2D, no se detectaron diferencias significativas en el crecimiento folicular dentro de cada categoría, al comparar los grupos expuestos a DEs con el control (**Figura 46, panel c y d**). Además, se mantuvo un patrón consistente donde los folículos que no ovularon son los que mostraron un crecimiento reducido o nulo, en comparación con los folículos ovulados. *Este aumento en la proporción de folículos que no logran ovular sugiere que la falla ovulatoria provocada*

por BP3 y BPA estaría vinculada a una incapacidad de crecimiento y de maduración folicular en respuesta al estímulo con gonadotrofinas, particularmente de la FSH.

6.4.1.3. Perfil de producción de hormonas esteroides en cultivo 3D de rata

Folículos que ovularon exitosamente: en los folículos ovulados (**Figura 47, panel a**), los niveles de E₂ aumentaron en BPA, junto con un aumento de E₁ en respuesta a BP3, BPA y la mezcla BP3+BPA.

Folículos que no lograron ovular: al analizar las hormonas en los folículos no ovulados de los grupos expuestos a los DEs frente a los no ovulados del control (**Figura 47, panel b**), BPA y la mezcla incrementaron los niveles de E₁.

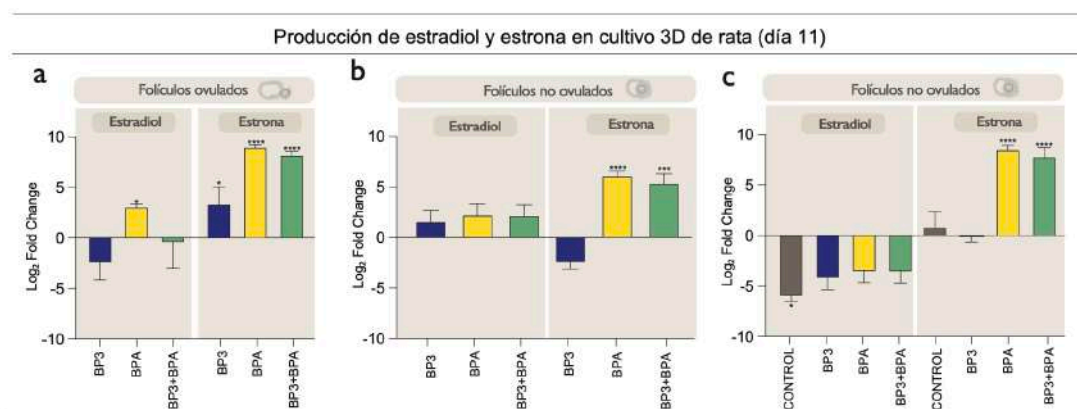


Figura 47: Producción de estradiol y estrona en cultivo 3D de rata al día 11. Los niveles hormonales se representan mediante el Log₂ Fold Change. a) Niveles hormonales en folículos ovulados expuestos a BP3, BPA y la mezcla respecto al control ovulado. b) Comparación de folículos no ovulados frente a su correspondiente control no ovulado. c) Comparación del perfil hormonal de todos los folículos no ovulados contra el control ovulado. Los datos se representan como promedio $\pm$ SEM y los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles correspondientes (***p < 0.001, ****p < 0.0001).

Sin embargo, esta comparación no nos dice nada respecto a cómo son los niveles de hormonas en los folículos no ovulados en comparación con los que sí lograron ovular. Por ello hicimos un segundo análisis, comparando los niveles de hormonas de los folículos no ovulados de todos los grupos experimentales, con los niveles de hormonas de los folículos que sí lograron ovular del grupo control (**Figura 47, panel c**). Al hacer este análisis (**Figura 47, panel c**), observamos que los folículos que no lograron ovular del grupo control tienen menores niveles de E₂ que su contraparte de folículos que sí lograron ovular. Por su parte, los folículos de BP3, BPA y la mezcla mostraron una tendencia a menores cantidades de E₂ (a diferencia del primer análisis), mientras que E₁ está aumentado en BPA y BP3+BPA (similar al primer análisis).

En resumen, estos resultados indican que los folículos no ovulados tienden a producir menos E2 que los que sí logran ovular.

6.4.2. Evaluación del rol del receptor de estrógeno beta en la mediación de los efectos del bisfenol-A

En base a lo anterior, seleccionamos el modelo 3D para realizar el siguiente experimento. Luego de observar los efectos de BP3 y BPA sobre la ovulación, nos propusimos estudiar si estas acciones estaban mediadas por el RE β . Hicimos un estudio inicial con BPA para establecer las bases del mecanismo y determinar la pertinencia de realizar ensayos similares con BP3, en función de los resultados obtenidos. Por tanto, el objetivo de este experimento fue evaluar si la acción de BPA está mediada por la vía del RE β , utilizando para ello el antagonista selectivo PHTPP. Determinamos la dinámica de crecimiento, la tasa de ovulación, las concentraciones de hormonas y la expresión génica, buscando obtener un perfil completo de la respuesta folicular.

6.4.2.1. Bisfenol-A y PHTPP inhiben la ovulación *in vitro*

La cuantificación de la respuesta ovulatoria tras el pico de hCG demostró que el grupo control alcanzó una tasa de ovulación de aproximadamente el 80% (**Figura 48**). En contraste, los tratamientos con el antagonista PHTPP, BPA y su combinación (BPA+PHTPP) indujeron una reducción de la capacidad ovulatoria, la cual cayó a niveles aproximados al 20% en los tres grupos experimentales (**Figura 48**). De manera recíproca, se registró un aumento en el porcentaje de folículos no ovulados en todos los grupos tratados respecto al control, sin diferencias entre los grupos tratados.

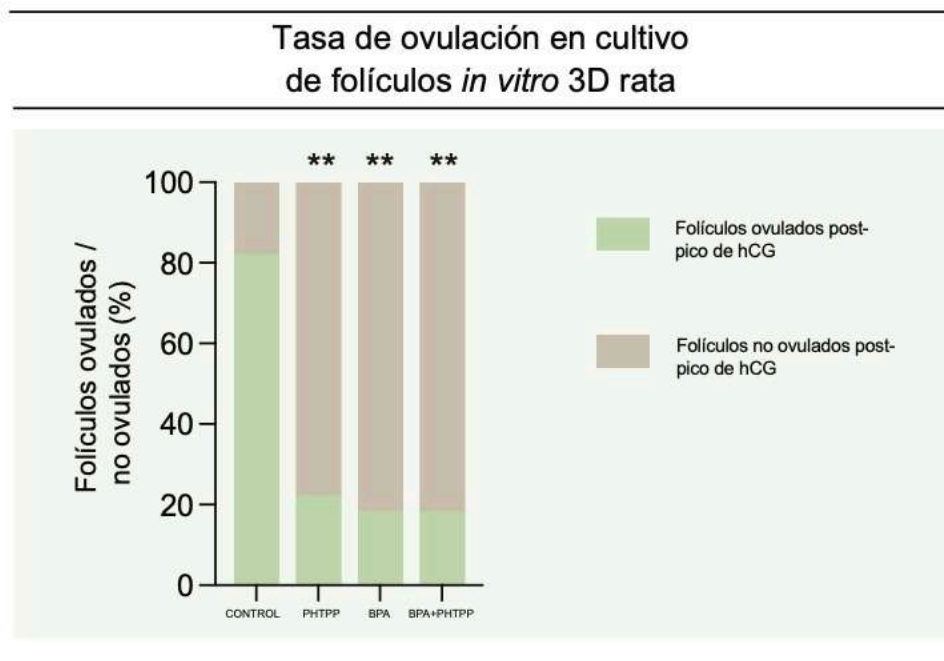


Figura 48: Tasa de ovulación en cultivo de folículos *in vitro* 3D de rata. El gráfico representa el porcentaje de folículos que lograron ovular (en verde) frente a los que permanecieron sin ovular (en marrón) tras la inducción con hCG. Se evaluó el impacto del grupo control y de los tratamientos con PHTPP, BPA y la combinación BPA+PHTPP. Los valores se presentan en porcentaje (%) y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba exacta de Fisher. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles correspondientes (** $p < 0.01$).

6.4.2.2. Cinética de crecimiento folicular

Nuevamente, el crecimiento folicular durante los 14 días de cultivo mostró patrones marcadamente diferentes (**Figura 49**):

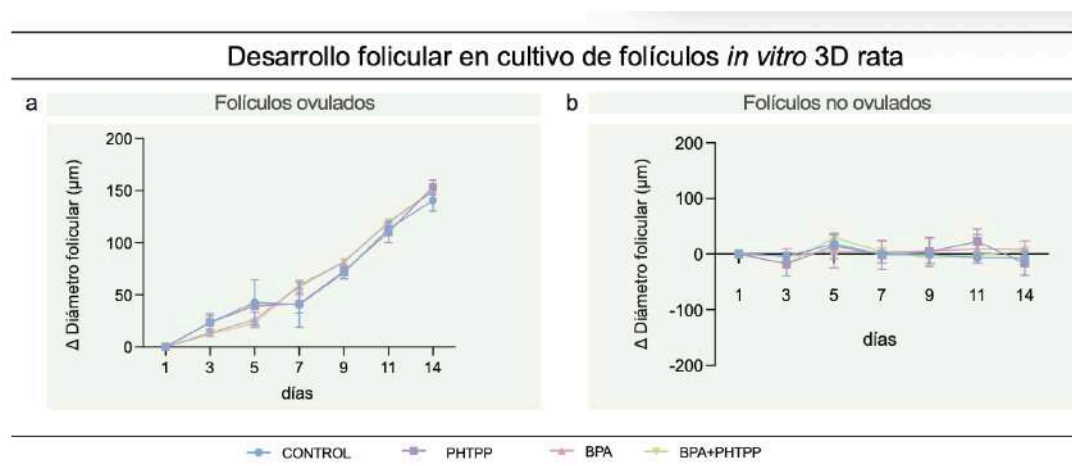


Figura 49: Dinámica del crecimiento folicular. El diámetro folicular se registró cada 48 horas para determinar el incremento del crecimiento (crecimiento). En esta figura, el panel (a) representa el incremento del crecimiento de los folículos que ovularon exitosamente tras el pico de hCG, mientras que el panel (b) representa el incremento de los folículos que no lograron ovular. Cada punto representa el promedio $\pm$ SEM del aumento del diámetro folicular en relación con la medición anterior. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA de una vía. Los tamaños finales de las muestras fueron los siguientes: CONTROL ($n = 11$), PHTPP ($n = 9$), BPA ($n = 11$) y BPA+PHTPP ($n = 11$). BPA: Bisfenol A; PHTPP: 4-[2-fenil-5,7-bis(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]fenol, un antagonista selectivo de RE β .

Folículos que ovularon exitosamente (Figura 49, panel a): exhibieron un aumento constante y progresivo del diámetro folicular, sin diferencias significativas entre los folículos ovulados del control y los ovulados de los tratados con PHTPP, BPA o la mezcla (BPA+PHTPP). Esto muestra que aquellos folículos que lograron madurar siguen una curva de crecimiento uniforme independientemente del tratamiento.

Folículos que no lograron ovular (Figura 49, panel b): mostraron una ausencia total de crecimiento a lo largo del cultivo. En todos los grupos, el diámetro permaneció cerca de los valores basales (cambio cercano a 0 μ m), lo que indicaría que la inhibición ovulatoria está dada por una falla en el crecimiento folicular en respuesta a las gonadotrofinas, principalmente FSH.

6.4.2.3. Análisis de la expresión génica

Folículos que ovularon exitosamente: el análisis de la expresión génica en los folículos que lograron ovular tras el estímulo de hCG reveló que PHTPP, ya sea de forma individual o en combinación con BPA, incrementó significativamente los niveles de ARNm de todos los genes estudiados (*Fshr*, *Lhcgr*, *Cyp19a1*, *Cyp11a* y *Cyp17a*) en comparación con los folículos que ovularon del grupo control (**Figura 50, panel a**). Por su parte, BPA también indujo una regulación positiva de *Fshr*, *Lhcgr*, *Cyp11a* y *Cyp17a1*, aunque sin cambios de *Cyp19a1* (**Figura 50, panel a**).

Folículos que no lograron ovular: en cuanto a los folículos que no lograron ovular, los niveles de expresión génica fueron comparados contra los niveles de expresión en los folículos no ovulados del grupo control. De esta manera, los folículos que no lograron ovular mostraron niveles de *Fshr* y *Cyp17a1* reducidos cuando fueron expuestos a BP3, BPA o BP3+BPA, mientras que la expresión de *Cyp11a1* se incrementó en todos los casos (**Figura 50, panel b**). Las respuestas de *Lhcgr* y *Cyp19a1* resultaron ser dependientes del tratamiento: BPA aumentó la expresión de *Lhcgr*, mientras que PHTPP y el tratamiento combinado la redujeron (**Figura 50, panel. b**). Finalmente, *Cyp19a1* disminuyó en los folículos tratados con PHTPP y PHTPP+BPA, mientras que no hubo cambios con BPA (**Figura 50, panel b**).

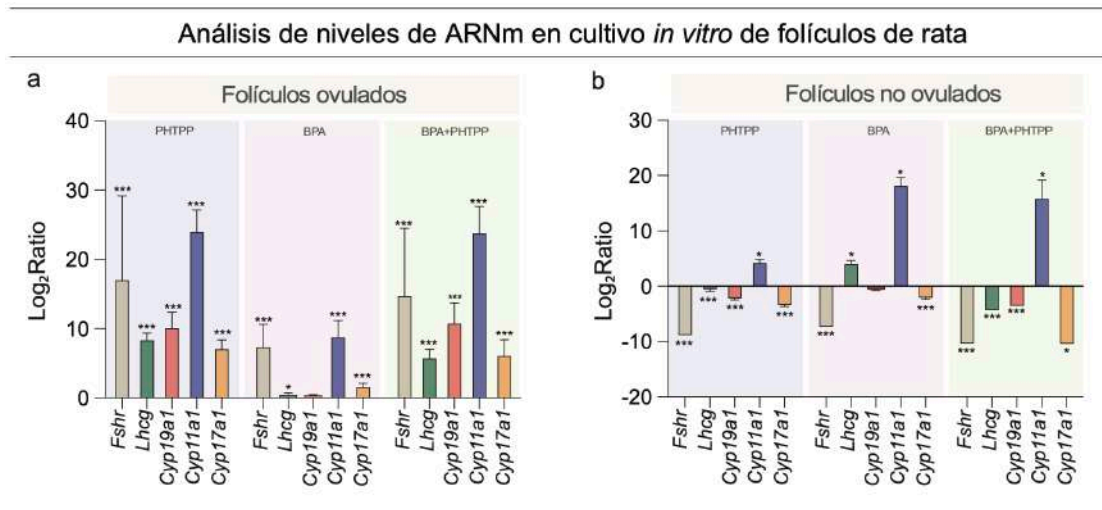


Figura 50: Perfil de expresión génica en folículos ovulados y no ovulados. Los gráficos representan los niveles de ARNm, expresados como $\log_2$ Ratio y determinados mediante qPCR, para genes clave de la maduración folicular (Cyp11a1, Cyp17a1, Cyp19a1, Fshr y Lhcgr) en folículos mantenidos en cultivo 3D, comparando los efectos del BPA y el PHTPP. Para compensar las variaciones en la biomasa, los valores de Ct fueron ajustados por unidad biológica (folículo) siguiendo la fórmula $Ct_{adj} = Ct_{medido} + \log_2(n)$, donde n representa el número de folículos por pool (rango de 2 a 9). a) Niveles de expresión génica en folículos que completaron la ovulación. b) Niveles de expresión génica en folículos no ovulados. Los datos se presentan como la promedia $\pm$ SEM de réplicas biológicas independientes (CONTROL, n=11; PHTPP, n=9; BPA, n=11; y BPA+PHTPP, n=11), analizando cada muestra a través de seis determinaciones técnicas (tres corridas de qPCR independientes por duplicado). La significancia estadística se determinó mediante la prueba Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test (software REST 2009). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control (*p < 0.05; ***p < 0.001). BPA: Bisfenol A; PHTPP: 4-[2-fenil-5,7-bis(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]fenol (antagonista selectivo de ER-beta); Cyp11a1: citocromo P450sc; Cyp17a1: 17 α -hidroxilasa; Cyp19a1: P450aromatasa; Fshr: receptor de la hormona folículo-estimulante; Lhcgr: receptor de la hormona luteinizante.

En resumen, parecería que los folículos que llegan a ovular son los que logran montar una respuesta transcripcional positiva en las vías esteroidogénicas y de los receptores de gonadotrofinas.

6.4.2.4. Perfil de producción de hormonas esteroides en folículos ovulados y no ovulados

Folículos que ovularon exitosamente: la exposición a BPA resultó en un aumento de los niveles de E_2 y E_1 en relación con los folículos ovulados del grupo control (**Figura 51, panel a**). BPA+PHTPP aumentó la producción de E_1 , mientras que PHTPP por sí solo no mostró cambios (**Figura 51, panel a**).

Folículos que no lograron ovular: hicimos dos análisis, tal como describimos en 3.4.1.3. En comparación con sus respectivos folículos no ovulados del control (**Figura 51, panel b**), tanto PHTPP como PHTPP+BPA incrementaron E_2 , mientras que BPA y PHTPP indujeron un aumento de E_1 . De esta manera, los folículos no ovulados también tendrían niveles elevados de E_2 y E_1 .

Sin embargo, un panorama distinto surge al realizar la comparación entre los niveles de hormonas de los folículos no ovulados y los de aquellos folículos que sí

lograron ovular (**Figura 51, panel c**): los folículos que no lograron ovular del grupo control tienen menores niveles de E_2 que su contraparte de folículos que sí lograron ovular, mientras que los folículos de PHTPP, BPA y la mezcla mostraron una tendencia a menores cantidades de E_2 (a diferencia del primer análisis). Respecto a la estrona, todos los folículos no ovulados exhibieron niveles superiores al control ovulado, con incrementos significativos específicamente en PHTPP, BPA y su combinación.

En resumen, vemos nuevamente que los folículos que no logran ovular tienden a producir menos E_2 que los que sí logran hacerlo.

Por último, debido a que PHTPP por sí solo inhibió la ovulación, no podemos determinar si las acciones son mediadas por el $RE\beta$. Es por este motivo que decidimos no proceder con la realización del experimento correspondiente con BP3.

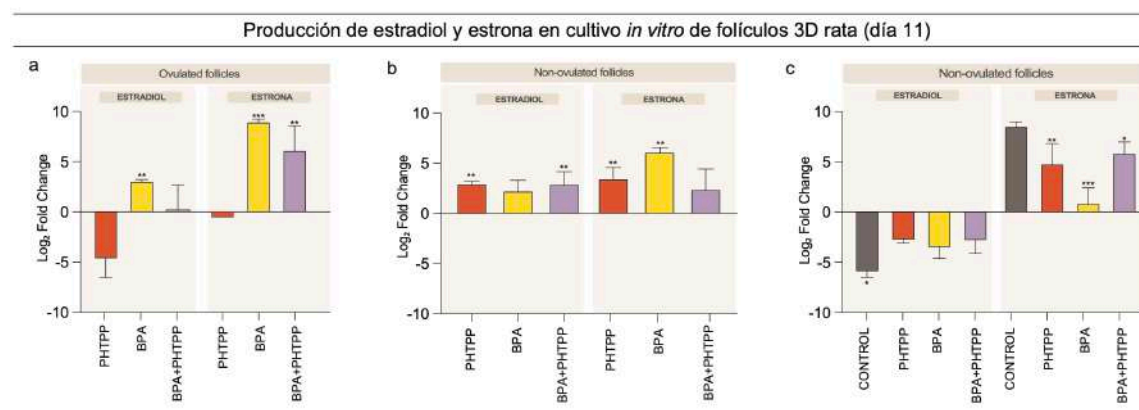


Figura 51: Producción de E_2 y E_1 en cultivo *in vitro* 3D (día 11). Los niveles de las hormonas esteroides, estradiol y estrona, se determinaron en el sobrenadante de cultivo al día 11. El panel **a** detalla el perfil hormonal de los folículos que completaron exitosamente el proceso de ovulación tras la estimulación con hCG, comparados directamente con el grupo CONTROL ovulado. El panel **b** representa la producción hormonal de los folículos que no lograron ovular, normalizada contra su respectivo grupo CONTROL no ovulado. Por último, el panel **c** muestra la comparación de todos los folículos no ovulados frente al grupo CONTROL ovulado, lo que permite cuantificar la magnitud de la alteración endocrina en relación con el estándar de una respuesta ovulatoria exitosa. Para mantener la homogeneidad de la muestra, se excluyeron de todos los análisis aquellos folículos que presentaron ovulación espontánea antes de la estimulación con hCG. Los datos se expresan como *Fold Change* y se presentan como la promedia $\pm$ SEM. La significancia estadística se determinó mediante un ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post-hoc* LSD de Fisher no corregida. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control específico descrito para cada comparación en los paneles (a), (b) y (c) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Los tamaños finales de las muestras fueron: CONTROL ($n = 8$), PHTPP ($n = 8$), BPA ($n = 8$) y BPA+PHTPP ($n = 8$). BPA: Bisfenol A; PHTPP: 4-[2-fenil-5,7-bis(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]fenol (antagonista selectivo de $ER\beta$).

6.4.3. Tasa de ovulación y dinámica de crecimiento folicular en un modelo 3D de ratón

Para evaluar si las alteraciones que observamos con folículos de ratas Wistar se conservan entre diferentes especies, hicimos el mismo experimento con folículos de ratón. De manera consistente, la exposición a BP3, BPA y su combinación

(BP3+BPA) inhibió la tasa de ovulación en comparación con el grupo control (**Figura 52, panel a**).

Folículos que ovularon exitosamente: el análisis del crecimiento folicular reveló que aquellos folículos que lograron ovular son los que crecieron y alcanzaron un diámetro final similar en todos los grupos experimentales, tanto los del grupo control como los expuestos a los DEs (**Figura 52, panel c**).

Folículos que no ovularon: por el contrario, los folículos que no lograron ovular permanecieron pequeños incluso al finalizar el cultivo (**Figura 52, panel d**). Nuevamente, la exposición a los DEs provocó un aumento en la proporción de estos folículos de menor tamaño.

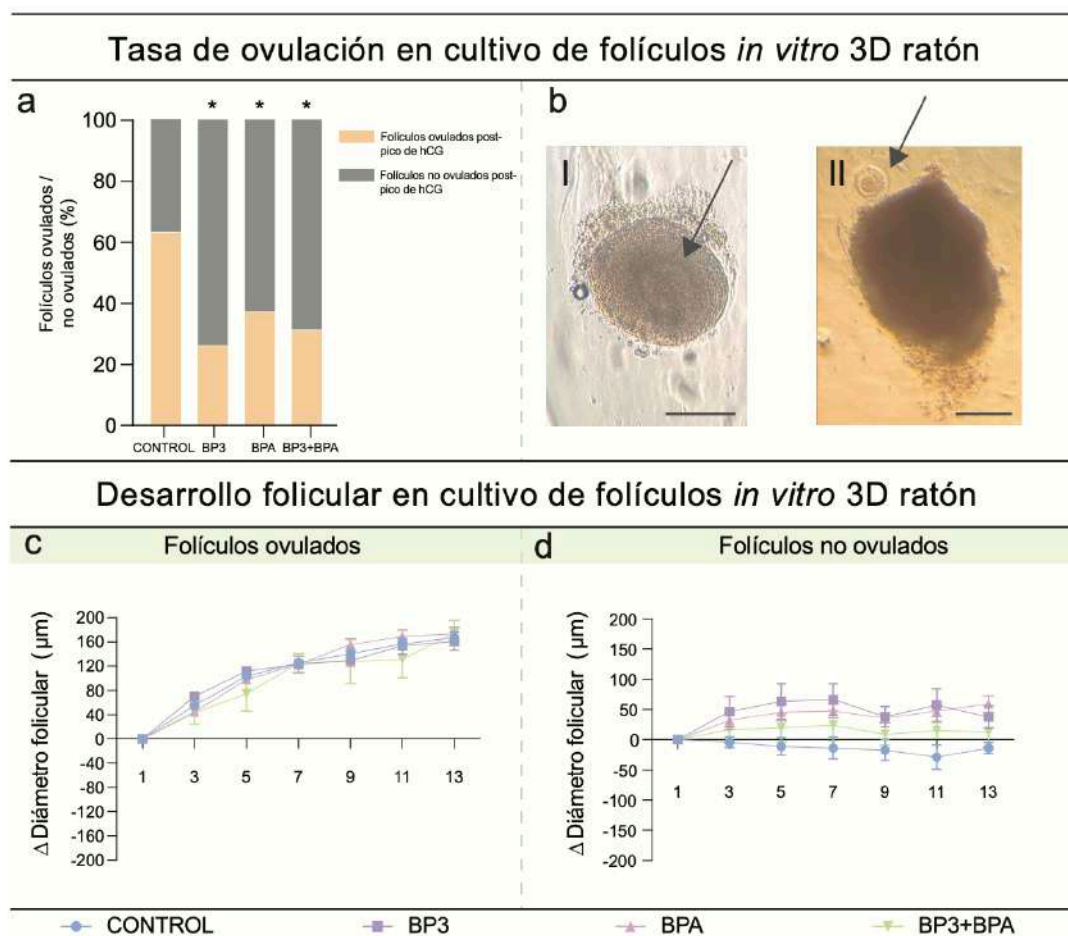


Figura 52: Tasa de Ovulación y Crecimiento de Folículos Ovulados y No Ovulados Después de la Exposición a BP3, BPA y su Mezcla (Cultivo 3D de Ratón). a) Porcentaje de folículos ovulados y no ovulados en el día 14 de cultivo 3D, después del pico de hCG (n=16 CONTROL, n=20 BP3, n=20 BPA, n=14 BP3+BPA). b) I) Imagen representativa de folículos preantrales tardíos del grupo control en el día 1 de cultivo. II) Imagen representativa de un folículo en el día 14 de cultivo, después de la maduración con 0.1 UI/mL de FSH más 0.01 UI/mL de hCG y ovulación inducida con 1.5 UI/mL de hCG. c) Análisis del crecimiento de los folículos ovulados después del pico de hCG (n=12 CONTROL, n=5 BP3, n=7 BPA, n=5 BP3+BPA). d) Análisis del crecimiento de los folículos no ovulados después del pico de hCG (n=4 CONTROL, n=15 BP3, n=13 BPA, n=9 BP3+BPA). La barra de escala (línea) representa 100 μ m. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de dos vías. Los datos se expresan como promedio $\pm$ SEM. Los niveles de significancia se indican como sigue: *: $p < 0.05$ vs. CONTROL. BP3 = benzofenona-3, BPA = bisfenol-A.

En conjunto, estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio de BPA y BP3 sobre la ovulación está asociado a un cambio en el destino folicular hacia un estado de crecimiento detenido o "arrestado", lo que impide que el folículo alcance el estadio de maduración necesario para la liberación del ovocito. Este patrón de respuesta, observado tanto en rata como en ratón, refuerza la robustez del modelo 3D para el estudio de la toxicidad reproductiva.

6.4.3.1. Perfil de producción de hormonas esteroides en cultivo 3D de ratón

Folículos que ovularon exitosamente: los niveles de hormonas de los folículos ovulados expuestos a los DEs no mostraron cambios de E_2 con respecto a su control (**Figura 53, panel a**), mientras que la producción de E_1 aumentó con BPA (**Figura 53, panel a**).

Folículos que no lograron ovular: al ser comparados contra su propio control (folículos no ovulados) (**Figura 53, panel b**), tanto BPA como la mezcla indujeron un aumento de E_1 , sin cambios en E_2 . Al comparar los niveles de hormonas de los folículos no ovulados con los hallados en los folículos que lograron ovular del control (**Figura 53, panel c**), se observó una tendencia a valores bajos de E_2 en todos los grupos (incluido el control), aunque estas diferencias no alcanzaron a ser significativas. E_1 aumentó por acción del BPA y de la mezcla.

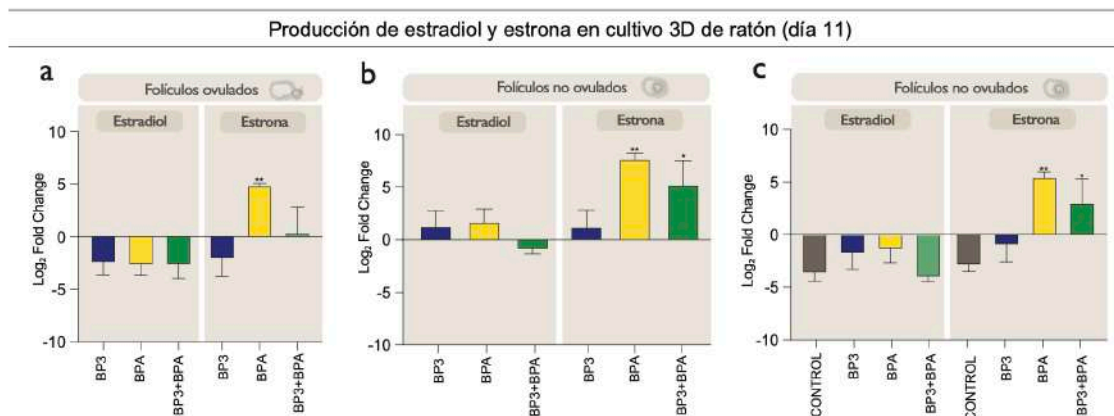


Figura 53: Producción de E_2 y E_1 en cultivo 3D de ratón al día 11. Los niveles hormonales se representan mediante el Log₂ Fold Change. a) Niveles en folículos ovulados expuestos a BP3, BPA y su mezcla respecto al control ovulado. b) Comparación de folículos no ovulados frente a su correspondiente control no ovulado. c) Comparación del perfil hormonal de todos los folículos no ovulados contra el control ovulado para analizar el estado endocrino vinculado al éxito funcional. Las barras indican el promedio $\pm$ SEM y los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles correspondientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Al comparar los perfiles hormonales entre ambas especies, se observó que los folículos de ratón no presentaron el incremento de E_2 inducido por BPA, ni el aumento de E_1 por exposición a BP3 y BP3+BPA que registramos en ratas.

6.5. Discusión

Nuestro estudio demuestra una inhibición significativa de la ovulación *in vitro* inducida por BPA y/o BP3 a concentraciones comparables a las reportadas en FF humano, lo que confiere una mayor relevancia a nuestros hallazgos. Observamos una reducción del número de ovocitos ovulados tras la estimulación con gonadotrofinas, disminuyendo la tasa de ovulación de aproximadamente un 80% en los folículos control a cerca de un 20% en los folículos tratados con BPA, BP3 o BPA+BP3. En conjunto, estos resultados representan un hallazgo novedoso para ambos compuestos. En el caso del BPA, observamos una reducción en el número de ovocitos ovulados a una concentración tan baja como 0,66 μM , que está dentro del rango de niveles detectados en fluido folicular humano (Poormoosavi et al., 2019). La disminución de la tasa de ovulación cuando los folículos fueron expuestos a BP3 también se observó en concentraciones similares a las reportadas en fluido folicular humano (0,00184 μM) (Hoffmann-Dishon et al., 2024). Nuestros trabajos previos sobre BP3 se centraron en los efectos sobre la foliculogénesis temprana utilizando sistemas de cultivo de ovario entero, sin evaluar la ovulación como punto final (Santamaría et al., 2019). Hasta donde sabemos, no hay trabajos similares en la literatura que evalúen la exposición a BP3 o de forma combinada a BPA y BP3 sobre la ovulación.

Los presentes resultados con BPA son consistentes con reportes previos *que* demostraron la inhibición de la ovulación *in vitro* por BPA (Peretz et al., 2011; Zhang et al., 2019); sin embargo, en dichos estudios los efectos inhibitorios se observaron únicamente a concentraciones sustancialmente más elevadas (30 μM a $\geq 100 \mu\text{M}$). Una diferencia metodológica entre el presente trabajo y los estudios anteriores radica en el estadio de desarrollo de los folículos utilizados. Mientras que los trabajos previos emplearon principalmente folículos secundarios o preantrales tempranos, de menor grado de maduración (aproximadamente 100–170 μm de diámetro), en este estudio los cultivos se iniciaron a partir de folículos preantrales tardíos (~220–250 μm), que representan un estadio más avanzado del desarrollo folicular (Adriaens et al., 2004; Cortvrindt & Smits, 2001; McGee & Hsueh, 2000; Pedersen & Peters, 1968) y potencialmente una mayor susceptibilidad a la disrupción endocrina. Además, los efectos observados de BPA a concentraciones comparativamente más bajas son consistentes con el comportamiento dosis-respuesta no monotónica ampliamente documentado para los DEs, en el cual los efectos biológicos pueden manifestarse tanto a bajas como a altas dosis y no necesariamente pueden predecirse a partir de las respuestas observadas a concentraciones elevadas (Vandenberg, 2014;

Vandenberg et al., 2012; Zoeller et al., 2012). En este sentido, se ha demostrado que en complejos cúmulo-ovocito (COC) cultivados y aislados de folículos preovulatorios de ratón, BPA incrementa de manera significativa el porcentaje de ovocitos con ruptura de la vesícula germinal (GVBD), un indicador de la reanudación de la meiosis ovocitaria, a concentraciones muy bajas, en el rango de 0,0022-0,22 μM (Acuña-Hernández et al., 2018).

La concentración nominal de BPA utilizada en nuestros experimentos corresponde al rango superior de los niveles reportados en fluido folicular humano. En particular, Poormoosavi et al. (2019) identificaron grupos de exposición con concentraciones de BPA ≥ 150 ng/mL, que representan los valores más elevados detectados en dicha cohorte. No obstante, las concentraciones nominales empleadas en sistemas *in vitro* no reflejan necesariamente la concentración biológicamente disponible que alcanza el tejido de interés. Se ha demostrado que el BPA se une a la albúmina sérica (BSA) mediante interacciones hidrofóbicas, según estudios espectroscópicos y de modelado molecular, lo que se espera que limite la fracción libre disponible en medios que contienen proteínas (Xie et al., 2010). Asimismo, las limitaciones de difusión y adsorción inherentes a los sistemas de cultivo tridimensionales basados en alginato podrían restringir adicionalmente la biodisponibilidad del BPA dentro del microambiente folicular (Fischer et al., 2017; Groothuis, Heringa, Nicol, Hermens, B. J. Blaauboer, et al., 2015).

En consecuencia, es razonable asumir que los efectos inhibitorios sobre la ovulación observados en este estudio ocurran a una concentración efectiva de BPA o BP3 inferior a la dosis nominal aplicada, lo que respalda la interpretación de que ambos DEs pueden afectar la competencia ovulatoria a niveles de exposición comparables a los reportados en fluido folicular humano. En este sentido, varios trabajos han mostrado que las concentraciones de ciertas moléculas en FF se correlacionan con cuadros clínicos determinados. Por ejemplo, Scotti et al. (2016), demostraron que las concentraciones de S1P (sphingosine-1-phosphate) son significativamente menores en el FF de pacientes con elevado riesgo de desarrollar síndrome de hiperestimulación ovárica (*ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS*) (Scotti et al., 2016). En concordancia con esta interpretación, la presencia de BPA en el FF, particularmente en combinación con otros DEs, se ha asociado con resultados reproductivos adversos, incluyendo una menor tasa de éxito en fertilización *in vitro* y un mayor riesgo de parto prematuro (Li et al., 2024; Trela-Kobędza & Ajduk, 2025; Zhang et al., 2021).

Con respecto a si el tipo de cultivo influye en la detección de los efectos del BPA y/o BP3 sobre la ovulación, encontramos resultados interesantes. En particular, en una primera etapa de experimentos, encontramos que el efecto inhibitorio de la combinación BP3+BPA fue evidente únicamente en los cultivos 3D. Esta diferencia puede explicarse por la preservación, en los sistemas 3D, de características clave del folículo que se pierden en los cultivos 2D. En los folículos cultivados en matrices de alginato (3D), se mantiene en gran medida la arquitectura esférica, la interacción coordinada entre las células de la teca y la granulosa, y la comunicación mediada por uniones gap con el ovocito, evitando el aplanamiento prematuro del folículo y el aislamiento del ovocito (Desai et al., 2010)(Desai et al., 2010). En concordancia, los sistemas 3D presentan una mayor producción de E_2 , formación de antro y una señalización sincronizada entre el ovocito y las células somáticas, en contraste con los cultivos 2D, en los que los niveles de E_2 son mínimos y la formación de antro ocurre de manera poco frecuente (Jalili et al., 2020; Sittadjody et al., 2013). En los sistemas 2D, las células de la granulosa tienden a migrar y a perder contacto con el ovocito, mientras que la actividad esteroidogénica se reduce de manera marcada. Como consecuencia, la cascada ovulatoria puede verse comprometida, lo que dificulta la detección de los efectos inhibitorios de la combinación BP3+BPA. En este contexto, la acción de la mezcla se hizo evidente en el modelo 3D, cuando el microambiente folicular se encuentra mejor preservado. Estos resultados refuerzan la idea de que los sistemas de cultivo avanzados constituyen plataformas más fieles y sensibles para evaluar los efectos de los DEs sobre la ovulación. Si bien los sistemas 2D convencionales son más simples y ampliamente utilizados, pueden subestimar el impacto real de las exposiciones, en particular cuando se evalúan mezclas.

En segundo término, quisimos estudiar el potencial rol de $RE\beta$. Para ello usamos PHTPP, un antagonista selectivo de $RE\beta$ que compite con los ligandos endógenos por la unión al receptor e inhibe la actividad transcripcional y de señalización mediada por $RE\beta$ (Compton et al., 2004). La exposición a PHTPP por sí sola inhibió de manera marcada la ovulación a una concentración muy baja (0,65 pM), lo que indica que incluso una disrupción sutil de la señalización dependiente de $RE\beta$ es suficiente para comprometer la competencia ovulatoria *in vitro*. Esta observación es consistente con trabajos en ratones knock-out deficientes en $RE\beta$ que presentan respuestas ovulatorias alteradas, demostrando un rol crítico de $RE\beta$ en la ovulación (Krege et al., 1998). Cuando los folículos fueron coexpuestos a BPA y PHTPP, la ovulación permaneció fuertemente inhibida. De manera relevante, un fenómeno similar fue reportado por Harvey et al., (2015), quienes demostraron que PHTPP

“mimetizó” el efecto inhibitorio del metoxiclor sobre la producción de AMPc inducida por FSH en células de la granulosa. En este contexto, PHTPP “mimetizó” el efecto inhibitorio del BPA sobre la ovulación, lo que sugiere una convergencia a nivel de las vías de señalización asociadas a $RE\beta$. Sin embargo, dado que PHTPP por sí solo alteró la ovulación a esta baja concentración, los resultados del presente estudio no permiten discriminar de manera concluyente entre mecanismos dependientes de $RE\beta$ e independientes de $RE\beta$ que subyacen al fallo ovulatorio inducido por BPA.

En relación con el crecimiento folicular, solo los folículos que alcanzaron un tamaño adecuado lograron ovular, mientras que los folículos de menor tamaño de manera consistente no lo hicieron. Este patrón de ovulación dependiente del tamaño se observó en todos los grupos experimentales: la exposición a BPA, BP3 o PHTPP produjo un desplazamiento hacia una mayor proporción de estos folículos con menor crecimiento. La capacidad del BPA para alterar el crecimiento folicular ha sido reportada de manera consistente en estudios *in vitro* previos realizados a concentraciones más elevadas (Lenie et al., 2008; Peretz et al., 2011; Zhang et al., 2019). En paralelo, se conoce que la diferenciación y el crecimiento folicular dependen en gran medida de la activación de la vía de señalización del AMPc mediada por FSH. En este sentido, Harvey et al. (2015) demostraron que la inhibición farmacológica de $RE\beta$ mediante PHTPP redujo aproximadamente un 80% la producción de AMPc inducida por FSH en células de la granulosa de rata cultivadas, proporcionando una base mecanística para la respuesta a gonadotrofinas alterada que observamos. En conjunto, estos hallazgos indican que la inhibición del crecimiento folicular constituye un evento temprano y crítico que subyace al fallo ovulatorio inducido por BPA y PHTPP, probablemente mediado por inhibición de la respuesta a FSH a través de $RE\beta$.

Por otro lado, observamos un perfil diferencial de expresión génica entre los folículos que ovularon exitosamente y aquellos que no lo hicieron. Bajo la exposición a BPA o PHTPP, la ovulación quedó restringida a los folículos capaces de incrementar la expresión de genes clave sensibles a gonadotrofinas y asociados a la esteroidogénesis, lo que sugiere la aparición de un proceso de selección funcional dentro de la población folicular. En contraste, los folículos que presentaron una disminución en la expresión de *Fshr* y de otras enzimas esteroidogénicas, no alcanzaron un crecimiento adecuado y permanecieron finalmente en un estado anovulatorio. Esta respuesta transcripcional podría aumentar la sensibilidad funcional a la estimulación gonadotrópica, permitiendo que un subgrupo de folículos ovule aún sin alcanzar el tamaño canónico típicamente asociado con la competencia ovulatoria

(Fabre et al., 2006). Este concepto es consistente con nuestras observaciones previas *in vivo*, en las que la exposición a BPA alteró la distribución de los FA, incrementando el número de FA pequeños sin aumentar el número de FA grandes, lo que se asoció con una mayor expresión de Cyp17a1, Cyp19a1, Fshr y Lhcgr tras la estimulación con PMSG (Santamaría et al., 2017).

Una observación clave es que, independientemente de la exposición a DEs o PHTPP, los folículos no ovulados no lograron generar una respuesta de E₂ comparable a la observada en los folículos ovulados del grupo control. Particularmente en BPA, estos resultados son consistentes con estudios previos que demuestran que el BPA altera la esteroidogénesis ovárica *in vitro*. En particular, Peretz et al. (2011) reportaron que la exposición a BPA a concentraciones micromolares (44 y 440 µM) inhibió de manera marcada la producción de progesterona, dehidroepiandrosterona, androstenediona, E₁, T y E₂ en folículos de ratón cultivados (Peretz et al., 2011). De manera concordante, se ha demostrado que la presencia de BPA se asocia con una respuesta reducida de E₂ durante procedimientos de fertilidad asistida (Bloom et al., 2011).

Una observación adicional relevante de este estudio es que el modelo de cultivo folicular tridimensional (3D) generó respuestas ovulatorias comparables tanto en ratas como en ratones, sin diferencias interespecie significativas en cuanto a la tasa de ovulación y desarrollo folicular. En ambas especies se observó el mismo patrón: los folículos que ovularon alcanzaron diámetros similares entre los grupos control y tratados, mientras que los folículos no ovulados permanecieron más pequeños, y la exposición a BPA o BP3 incrementó la proporción de estos folículos de menor crecimiento. Esta concordancia entre especies respalda la utilidad del formato de cultivo 3D para estudios de toxicología reproductiva y confirma que los efectos inhibitorios del BPA y del BP3 se manifiestan de manera consistente como un desplazamiento del destino folicular, más que como una alteración funcional directa de los mecanismos ovulatorios en la última etapa de maduración folicular. Esta distinción resulta relevante, dado que uno de los posibles mecanismos de acción de los disruptores endocrinos podría ser la interferencia directa con las vías de señalización ovulatorias, como la cascada dependiente del pico de LH, sin afectar el crecimiento folicular. Sin embargo, nuestros datos indican que BPA y BP3 incrementa la proporción de folículos que no logran alcanzar dicho estadio.

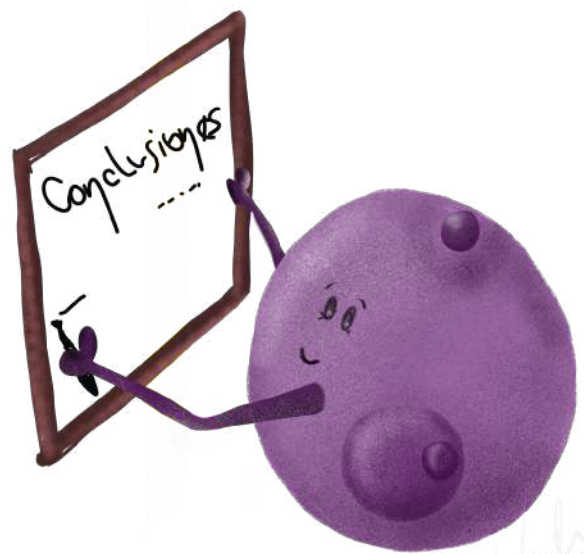
6.6. Conclusiones

En conjunto, estos experimentos aportan evidencia sólida de que BP3 y BPA pueden alterar la ovulación *in vitro* en concentraciones relevantes para la población humana. El sistema 3D detectó de manera consistente la disrupción ovulatoria a través de distintas especies y condiciones de exposición, mientras que el 2D mostró una menor sensibilidad para detectar efectos de exposiciones combinadas. En este sentido, el presente estudio respalda el uso del cultivo folicular 3D tanto en estudios mecanísticos como en evaluaciones preclínicas de compuestos con capacidad de alterar la ovulación.

Los hallazgos presentados en este capítulo se encuentran bajo revisión en la siguiente revista indexada de alto impacto (**Anexo VI**: Galliani et al., 2026):

Galliani, V., Berli, C., Teglia, C., Gutiérrez, F., Abud, J. E. & Rodríguez, H. A. Impaired *in vitro* follicle maturation and ovulation following Bisphenol A exposure. *Toxicological Sciences*. TOXSCI-26-0065.

Conclusiones



Vale

7. Conclusiones

Los distintos resultados obtenidos en este trabajo presentan un diferente grado de evidencia, en función del diseño experimental y del tipo de aproximación metodológica empleada. De esta manera, los hallazgos muestran una fuerza de evidencia variable y aportan niveles de evidencia complementarios sobre las preguntas y objetivos planteados a lo largo de la tesis. A modo de conclusión final, A modo de conclusión final, proponemos el esquema presentado en la **Figura 54** como una integración de los resultados obtenidos y su interpretación, basado en la distinta jerarquía de la evidencia generada, y asimismo como un ejercicio especulativo orientado al planteo de nuevas preguntas de investigación.

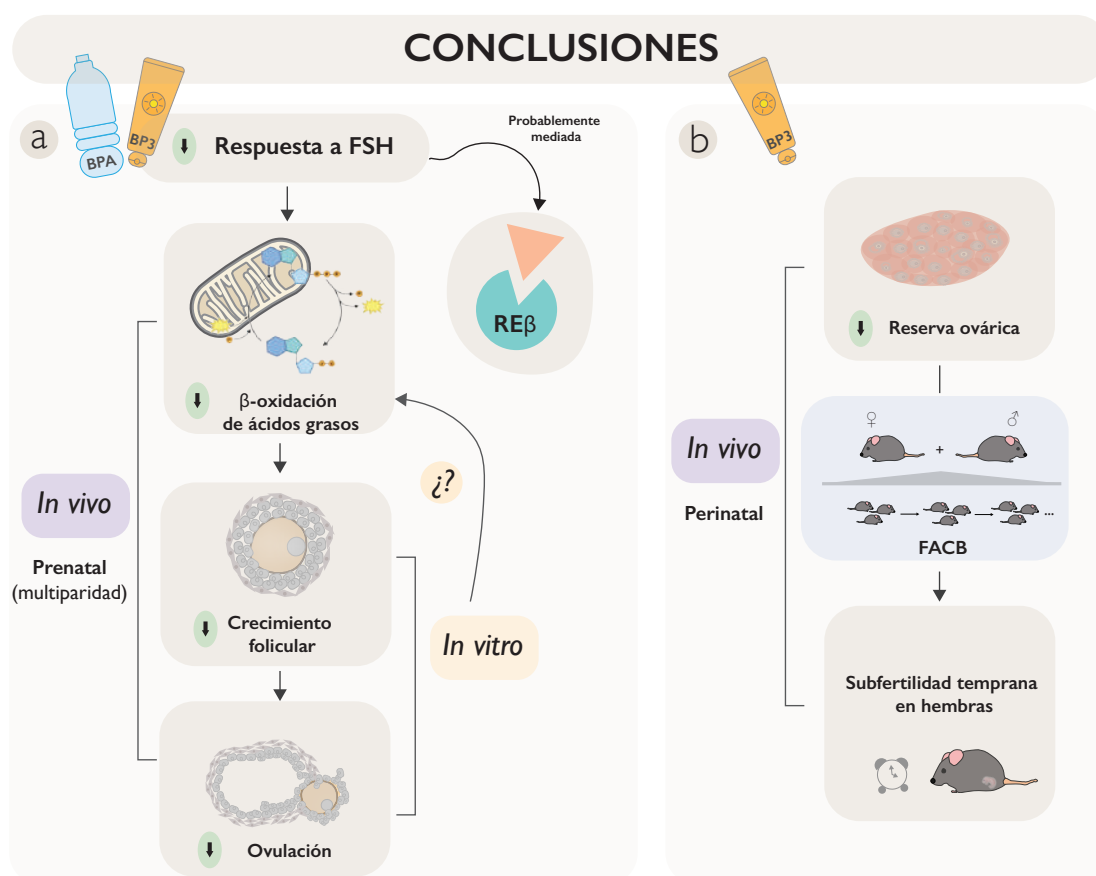


Figura 54: conclusión final.

En la **Figura 54, panel a**, se sintetizan los hallazgos obtenidos al evaluar los efectos del BPA, el BP3 y su mezcla en un esquema de exposición múltiple prenatal y de multiparidad. En este caso, demostramos que BPA, BP3 o su mezcla inhibe la ovulación de las hijas luego de una segunda exposición durante una segunda gestación (multiparidad). A su vez, , sugieren una reprogramación prenatal de las células germinales en la primera gestación que se traduce de la en un menor número de ovocitos ovulados tras el estímulo de superovulación.

Estos resultados se complementan con los ensayos de cultivo folicular 3D *in vitro*, donde se observó que los DEs incrementan el porcentaje de folículos que no crecen en respuesta al estímulo con gonadotrofinas.

En conjunto, los resultados apuntan a inhibición del crecimiento como consecuencia de una menor respuesta a la FSH, probablemente mediada por la interferencia con el receptor de estrógeno beta (RE β). En concordancia, los estudios de proteómica *in vivo* evidencian que los DEs provocan una alteración a nivel energético en la β -oxidación de ácidos grasos. Este hallazgo sugiere que los DEs comprometen el soporte metabólico necesario para que el folículo aumente de tamaño y complete exitosamente el proceso de ovulación.

En la **Figura 54, panel b** se describe el impacto de la exposición perinatal a BP3. Nuestros resultados demostraron que BP3 reduce la reserva ovárica, comprometiendo el pool folicular disponible, y generando la aparición de un cuadro de subfertilidad de forma temprana en las hijas.

Este fenómeno se caracteriza por un agotamiento prematuro de la capacidad reproductiva y una menor producción de descendencia a lo largo del tiempo en comparación con los controles.

8. Bibliografía

- Acuña-Hernández, D. G., Arreola-Mendoza, L., Santacruz-Márquez, R., García-Zepeda, S. P., Parra-Forero, L. Y., Olivares-Reyes, J. A., & Hernández-Ochoa, I. (2018). Bisphenol A alters oocyte maturation by prematurely closing gap junctions in the cumulus cell-oocyte complex. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 344, 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.02.011>
- Adriaens, I., Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2004). Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(2), 398-408. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh074>
- Aghazarian, V., Tchiakpe, L., Reynier, J. P., & Gayte-Sorbier, A. (1999). Release of Benzimidazole and Benzylidene Camphor from Topical Sunscreen Formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(12), 1277-1282. <https://doi.org/10.1081/DDC-100102299>
- Aker, A. M., Ferguson, K. K., Rosario, Z. Y., Mukherjee, B., Alshawabkeh, A. N., Cordero, J. F., & Meeker, J. D. (2019). The associations between prenatal exposure to triclocarban, phenols and parabens with gestational age and birth weight in northern Puerto Rico. *Environmental Research*, 169, 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.10.030>
- Al-Amrani, S., Al-Jabri, Z., Al-Zaabi, A., Alshekaili, J., & Al-Khabori, M. (2021). Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World Journal of Biological Chemistry*, 12(5), 57-69. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v12.i5.57>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Water, P. (2015). *Molecular Biology of The Cell* (Sexta). Garland Science.
- Altamirano, G. A., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E. H., Gómez, A. L., Delconte, M. B., & Kass, L. (2015). Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to bisphenol A. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 411, 258-267. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.007>
- Altamirano, G. A., Ramos, J. G., Gomez, A. L., Luque, E. H., Muñoz-de-Toro, M., & Kass, L. (2017). Perinatal exposure to bisphenol A modifies the transcriptional regulation of the β -Casein gene during secretory activation of the rat mammary gland. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 439, 407-418. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.09.032>
- Arya, S., Dwivedi, A. K., Alvarado, L., & Kupesic-Plavsic, S. (2020). Exposure of U.S. population to endocrine disruptive chemicals (Parabens, Benzophenone-3, Bisphenol-A and Triclosan) and their associations with female infertility. *Environmental Pollution*, 265, 114763. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114763>
- Auersperg, N., Wong, A. S., Choi, K. C., Kang, S. K., & Leung, P. C. (2001). Ovarian surface epithelium: Biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews*, 22(2), 255-288. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0422>

- Aung, M. T., Ferguson, K. K., Cantonwine, D. E., McElrath, T. F., & Meeker, J. D. (2019). Preterm birth in relation to the bisphenol A replacement, bisphenol S, and other phenols and parabens. *Environmental research*, 169, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.10.037>
- Balmer, M. E., Buser, H.-R., Müller, M. D., & Poiger, T. (2005). Occurrence of Some Organic UV Filters in Wastewater, in Surface Waters, and in Fish from Swiss Lakes. *Environmental Science & Technology*, 39(4), 953-962. <https://doi.org/10.1021/es040055r>
- Bar, J., Weiner, E., Levy, M., & Gilboa, Y. (2021). The thrifty phenotype hypothesis: The association between ultrasound and Doppler studies in fetal growth restriction and the development of adult disease. *American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM*, 3(6), 100473. <https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2021.100473>
- Bergman, Å., Heindel, J. J., Jobling, S., Kidd, K., & Zoeller, T. R. (Eds.). (2013). *State of the science of endocrine disrupting chemicals*. World Health Organization.
- Bhattacharjee, N. V., Schumacher, A. E., Aali, A., Abate, Y. H., Abbasgholizadeh, R., Abbasian, M., Abbasi-Kangevari, M., Abbastabar, H., Abd ElHafeez, S., Abd-Elsalam, S., Abdollahi, M., Abdollahifar, M.-A., Abdoun, M., Abdullahi, A., Abebe, M., Abebe, S. S., Abiodun, O., Abolhassani, H., Abolmaali, M., ... Vollset, S. E. (2024). Global fertility in 204 countries and territories, 1950–2021, with forecasts to 2100: A comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet*, 403(10440), 2057-2099. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)00550-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00550-6)
- Bloom, M. S., Kim, D., Vom Saal, F. S., Taylor, J. A., Cheng, G., Lamb, J. D., & Fujimoto, V. Y. (2011). Bisphenol A exposure reduces the estradiol response to gonadotropin stimulation during in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 96(3), 672-677.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.06.063>
- Borgeest, C., Greenfeld, C., Tomic, D., & Flaws, J. A. (2002). The effects of endocrine disrupting chemicals on the ovary. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 7, d1941-1948. <https://doi.org/10.2741/borgeest>
- Bridges, R. S. (2015). Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 36, 178-196. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.007>
- Cabaton, N. J., Wadia, P. R., Rubin, B. S., Zalko, D., Schaeberle, C. M., Askenase, M. H., Gadbois, J. L., Tharp, A. P., Whitt, G. S., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2011). Perinatal Exposure to Environmentally Relevant Levels of Bisphenol A Decreases Fertility and Fecundity in CD-1 Mice. *Environmental Health Perspectives*, 119(4), 547-552. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002559>
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4- tertiary -Octylphenol: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(1), 39-44. <https://doi.org/10.1289/ehp.10753>
- Cantonwine, D., Hu, H., Sánchez, B. N., Lamadrid-Figueroa, H., Smith, D., Ettinger, A. S., Mercado-García, A., Hernández-Avila, M., Wright, R. O., & Téllez-Rojo, M.

- M. (2010). Critical Windows of Fetal Lead Exposure: Adverse Impacts on Length of Gestation and Risk of Premature Delivery. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 52(11), 1106. <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e3181f86fee>
- Carola, V., Frazzetto, G., & Gross, C. (2005). Identifying interactions between genes and early environment in the mouse. *Genes, Brain and Behavior*, 5(2), 189-199. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00152.x>
- Caserta, D., Bordi, G., Ciardo, F., Marci, R., La Rocca, C., Tait, S., Bergamasco, B., Stecca, L., Mantovani, A., Guerranti, C., Fanello, E. L., Perra, G., Borghini, F., Focardi, S. E., & Moscarini, M. (2013). The influence of endocrine disruptors in a selected population of infertile women. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 29(5), 444-447. <https://doi.org/10.3109/09513590.2012.758702>
- Chapin, R. (1997). Reproductive toxicology. 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone. *Environmental Health Perspectives*, 105(suppl 1), 313-314. <https://doi.org/10.1289/ehp.105-1470294>
- Charalambous, F., Elia, A., & Georgiades, P. (2012). Decidual spiral artery remodeling during early post-implantation period in mice: Investigation of associations with decidual uNK cells and invasive trophoblast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(2), 847-852. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.057>
- Compton, D. R., Sheng, S., Carlson, K. E., Rebacz, N. A., Lee, I. Y., Katzenellenbogen, B. S., & Katzenellenbogen, J. A. (2004). Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: Estrogen receptor ligands possessing estrogen receptor beta antagonist activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(24), 5872-5893. <https://doi.org/10.1021/jm049631k>
- Converse, A., Zaniker, E. J., Amargant, F., & Duncan, F. E. (2023). Recapitulating folliculogenesis and oogenesis outside the body: Encapsulated in vitro follicle growth†. *Biology of Reproduction*, 108(1), 5-22. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac176>
- Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2001). In vitro follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 36(1), 3-9. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00261.x>
- Cuderman, P., & Heath, E. (2007). Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1343-1350. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0927-y>
- Dahlen, C. R., Borowicz, P. P., Ward, A. K., Caton, J. S., Czernik, M., Palazzese, L., Loi, P., & Reynolds, L. P. (2021). Programming of Embryonic Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11668. <https://doi.org/10.3390/ijms222111668>
- Dai, X., & Shen, L. (2022). Advances and Trends in Omics Technology Development. *Frontiers in Medicine*, 9, 911861. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.911861>

- Darbre, P. D. (Ed.). (2022). Front Matter. En *Endocrine Disruption and Human Health (Second Edition)*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821985-0.01001-X>
- Desai, N., Alex, A., AbdelHafez, F., Calabro, A., Goldfarb, J., Fleischman, A., & Falcone, T. (2010). Three-dimensional in vitro follicle growth: Overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 1-12.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293-342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- Dinopoulou, V., Partsinevelos, G. A., Mavrogianni, D., Anagnostou, E., Drakakis, P., Makrigiannakis, A., Chrousos, G. P., & Loutradis, D. (2013). The Effect of CRH and Its Inhibitor, Antalarmin, on in Vitro Growth of Preantral Mouse Follicles, Early Embryo Development, and Steroidogenesis. *Endocrinology*, 154(1), 222-231. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1838>
- Doerge, D. R., Twaddle, N. C., Vanlandingham, M., & Fisher, J. W. (2010). Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 247(2), 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.06.008>
- Dunning, K. R., Cashman, K., Russell, D. L., Thompson, J. G., Norman, R. J., & Robker, R. L. (2010). Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biology of Reproduction*, 83(6), 909-918. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084145>
- Dunning, K. R., Russell, D. L., & Robker, R. L. (2014). Lipids and oocyte developmental competence: The role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction*, 148(1), R15-27. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0251>
- Dupree, E. J., Jayathirtha, M., Yorkey, H., Mihasan, M., Petre, B. A., & Darie, C. C. (2020). A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of this Field. *Proteomes*, 8(3), 14. <https://doi.org/10.3390/proteomes8030014>
- EFSA. (2023). Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 21(4), 7908. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7908>
- EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP), Lambré, C., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mengelers, M., Mortensen, A., Rivière, G., Silano Until December, V., Steffensen, I.-L., Tlustos, C., Vernis, L., Zorn, H., Batke, M., ... Van Loveren, H. (2023). Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal. European Food Safety Authority*, 21(4), e06857. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.6857>

- Ehrlich, S., Williams, P. L., Missmer, S. A., Flaws, J. A., Ye, X., Calafat, A. M., Petrozza, J. C., Wright, D., & Hauser, R. (2012). Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(12), 3583-3592. <https://doi.org/10.1093/humrep/des328>
- European Commission. (2024). *Reglamento (UE) 2024/3190 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2024, sobre el uso de bisfenol A (BPA) y otros bisfenoles y derivados de bisfenoles con clasificación armonizada para propiedades peligrosas específicas en determinados materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos, por el que se modifica el Reglamento (UE) n° 10/2011 y se deroga el Reglamento (UE) 2018/213*. <https://data.europa.eu/eli/reg/2024/3190/oj>
- Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., Monget, P., & Monniaux, D. (2006). Regulation of ovulation rate in mammals: Contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 20. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-20>
- Fischer, F., Henneberger, L., König, M., Bittermann, K., Linden, L., & Goss, K.-U. (2017). Modeling Exposure in the Tox21 in Vitro Bioassays | Chemical Research in Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 10(5). <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.7b00023>
- Fortune, J. E. (2003). The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 78(3-4), 135-163. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00088-5)
- Friedman, C., Dabelea, D., Keil, A. P., Adgate, J. L., Glueck, D. H., Calafat, A. M., & Starling, A. P. (2023). Maternal serum per- and polyfluoroalkyl substances during pregnancy and breastfeeding duration. *Environmental Epidemiology*, 7(4), e260. <https://doi.org/10.1097/EE9.0000000000000260>
- Fuchs, E., & Cleveland, D. W. (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*, 279(5350), 514-519. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.514>
- Gachowska, M., Dąbrowska, A., Wilczyński, B., Kuźnicki, J., Sauer, N., Szlasa, W., Kobierzycki, C., Łapińska, Z., Kulbacka, J., Gachowska, M., Dąbrowska, A., Wilczyński, B., Kuźnicki, J., Sauer, N., Szlasa, W., Kobierzycki, C., Łapińska, Z., & Kulbacka, J. (2024). The Influence of Environmental Exposure to Xenoestrogens on the Risk of Cancer Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22). <https://doi.org/10.3390/ijms252212363>
- Galliani, V., Abud, J. E., Zenclussen, M. L., & Rodríguez, H. A. (2024). Female offspring of mice perinatally exposed to benzophenone-3 showed early subfertility linked to a poor oocyte stockpile. *Archives of Toxicology*, 98(6). <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03730-5>
- Galliani, V., Fessia, J., Santamaría, C. G., Abud, J. E., & Rodríguez, H. A. (2025). Benzophenone-3 (BP3), bisphenol A (BPA), and their combination impair ovarian response to gonadotropin stimulation in a multi-exposure multiparity

- model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 119, 104821. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104821>
- Gámez, J. M., Penalba, R., Cardoso, N., Bernasconi, P. S., Carbone, S., Ponzo, O., Pandolfi, M., Scacchi, P., & Reynoso, R. (2015). Exposure to a low dose of bisphenol A impairs pituitary-ovarian axis in prepubertal rats: Effects on early folliculogenesis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(1), 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.10.015>
- Garcia-Ortiz, J. E., Pelosi, E., Omari, S., Nedorezov, T., Piao, Y., Karmazin, J., Uda, M., Cao, A., Cole, S. W., Forabosco, A., Schlessinger, D., & Ottolenghi, C. (2009). Foxl2 functions in sex determination and histogenesis throughout mouse ovary development. *BMC Developmental Biology*, 9(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-9-36>
- Gaylord, E. A., Foecke, M. H., Samuel, R. M., Soygur, B., Detweiler, A. M., McIntyre, T. I., Dorman, L. C., Borja, M., Laird, A. E., Arjyal, R., Du, J., Gardner, J. M., Neff, N., Fattahi, F., & Laird, D. J. (2025). Comparative analysis of human and mouse ovaries across age. *Science*, 390(6778), eadx0659. <https://doi.org/10.1126/science.adx0659>
- Gomez, A. L., Delconte, M. B., Altamirano, G. A., Vigezzi, L., Bosquiazso, V. L., Barbisan, L. F., Ramos, J. G., Luque, E. H., Muñoz-de-Toro, M., & Kass, L. (2017). Perinatal Exposure to Bisphenol A or Diethylstilbestrol Increases the Susceptibility to Develop Mammary Gland Lesions After Estrogen Replacement Therapy in Middle-Aged Rats. *Hormones & Cancer*, 8(2), 78-89. <https://doi.org/10.1007/s12672-016-0282-1>
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J., & Zoeller, R. T. (2015). Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, 36(6), 593-602. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1093>
- Groothuis, F. A., Heringa, M. B., Nicol, B., Hermens, J. L. M., Blaauboer, B. J., & Kramer, N. I. (2015). Dose metric considerations in in vitro assays to improve quantitative in vitro-in vivo dose extrapolations. *Toxicology*, 332, 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.08.012>
- Groothuis, F. A., Heringa, M. B., Nicol, B., Hermens, J. L. M., Blaauboer, Bas. J., & Kramer, N. I. (2015). Dose metric considerations in *in vitro* assays to improve quantitative *in vitro*–*in vivo* dose extrapolations. *Toxicology, Quantitative in vitro to in vivo extrapolation (QIVIVE): An essential element for in vitro-based risk assessment*, 332, 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.08.012>
- Hales, C. N., & Barker, D. J. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin*, 60, 5-20. <https://doi.org/10.1093/bmb/60.1.5>
- Harvey, C. N., Chen, J. C., Bagnell, C. A., & Uzumcu, M. (2015). Methoxychlor and its metabolite HPTE inhibit cAMP production and expression of estrogen receptors α and β in the rat granulosa cell in vitro. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 51, 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.12.001>

- Hayden, C. G., Roberts, M. S., & Benson, H. A. (1997). Systemic absorption of sunscreen after topical application. *The Lancet*, 350(9081), 863-864. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)62032-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)62032-6)
- Heidari, M., Malekshah, A. K., Parivar, K., Khanbabaei, R., & Rafiei, A. (2011). Effect of Fibroblast Co-culture on In Vitro Maturation and Fertilization of Mouse Preantral Follicles. *International Journal of Fertility & Sterility*, 5(1), 1-8.
- Hoare, T. R., & Kohane, D. S. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49(8), 1993-2007. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.01.027>
- Hoffmann-Dishon, N., Barnett-Itzhaki, Z., Zalko, D., Hemi, R., Farzam, N., Hauser, R., Racowsky, C., Baccarelli, A. A., & Machtinger, R. (2024). Endocrine-disrupting chemical concentrations in follicular fluid and follicular reproductive hormone levels. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 41(6), 1637-1642. <https://doi.org/10.1007/s10815-024-03101-0>
- Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y., & Taketani, Y. (2002). Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction*, 17(11), 2839-2841. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2839>
- Ikhlas, S., Usman, A., & Ahmad, M. (2019). Comparative study of the interactions between bisphenol-A and its endocrine disrupting analogues with bovine serum albumin using multi-spectroscopic and molecular docking studies. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 37(6), 1427-1437. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1461136>
- Inman, Z. C., & Flaws, J. A. (2024). Impact of Real-life Environmental Exposures on Reproduction: Endocrine-disrupting chemicals, reproductive aging, and menopause. *Reproduction (Cambridge, England)*, 168(5), e240113. <https://doi.org/10.1530/REP-24-0113>
- Jala, A., Varghese, B., Dutta, R., Adela, R., & Borkar, R. M. (2022). Levels of parabens and bisphenols in personal care products and urinary concentrations in Indian young adult women: Implications for human exposure and health risk assessment. *Chemosphere*, 297, 134028. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134028>
- Jalili, C., Khani Hemmatabadi, F., Mansouri, K., & Bakhtiyari, M. (2020). Effects of sodium alginate capsules as 3D scaffolds on hormones and genes expression in preantral follicles of mice compared to 2D medium: An experimental study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 18(7), 517-530. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v13i7.7369>
- Janjua, N., Kongshoj, B., Andersson, A.-M., & Wulf, H. (2008). Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 22(4), 456-461. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2007.02492.x>
- Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E., & Newbold, R. R. (2006). Studies of the effects of neonatal exposure to genistein on the developing female reproductive system.

- Journal of AOAC International*, 89(4), 1189-1196.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/89.4.1189>
- Kass, L., Altamirano, G. A., Bosquiazzo, V. L., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2012). Perinatal exposure to xenoestrogens impairs mammary gland differentiation and modifies milk composition in Wistar rats. *Reproductive Toxicology*, 33(3), 390-400. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.02.002>
- Kolbe, T., Sheety, S., Walter, I., Palme, R., & Rüllicke, T. (2016). Impact of superovulation and mating on the wellbeing of juvenile and adult C57BL/6N mice. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(7), 969-973. <https://doi.org/10.1071/RD14372>
- Kortenkamp, A. (2007). Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 115(Suppl 1), 98-105. <https://doi.org/10.1289/ehp.9357>
- Krause, M., Klit, A., Blomberg Jensen, M., Søbørg, T., Frederiksen, H., Schlumpf, M., Lichtensteiger, W., Skakkebae, N. E., & Drzewiecki, K. T. (2012). *Sunscreens: Are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters*. 35(3), 424-436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01280.x>
- Krege, J. H., Hodgin, J. B., Couse, J. F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J. F., Sar, M., Korach, K. S., Gustafsson, J. A., & Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15677-15682. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15677>
- La Merrill, M. A., Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., Guyton, K. Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V. J., Woodruff, T. J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K. S., Gore, A. C., Zeise, L., & Zoeller, R. T. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(1), 45-57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- La Rocca, C., Tait, S., Guerranti, C., Busani, L., Ciardo, F., Bergamasco, B., Stecca, L., Perra, G., Mancini, F. R., Marci, R., Bordi, G., Caserta, D., Focardi, S., Moscarini, M., & Mantovani, A. (2014). Exposure to endocrine disrupters and nuclear receptor gene expression in infertile and fertile women from different Italian areas. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(10), 10146-10164. <https://doi.org/10.3390/ijerph111010146>
- Lamb, J. C., Jameson, C. W., Choudhury, H., & Gulati, D. K. (1985). Fertility Assessment by Continuous Breeding: Evaluation of Diethylstilbestrol and a Comparison of Results from Two Laboratories. *Journal of the American College of Toxicology*, 4(2), 173-184. <https://doi.org/10.3109/10915818509014512>
- Land, K. L., Miller, F. G., Fugate, A. C., & Hannon, P. R. (2022). The effects of endocrine-disrupting chemicals on ovarian- and ovulation-related fertility outcomes. *Molecular Reproduction and Development*, 89(12), 608-631. <https://doi.org/10.1002/mrd.23652>

- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Lenie, S., Cortvrindt, R., Eichenlaub-Ritter, U., & Smitz, J. (2008). Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Aneugenic Activity: Its Detection, Assessment and Significance*, 651(1), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.017>
- Leung, P. C. K., & Adashi, E. Y. (2019). *The Ovary* (tercera). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/book/edited-volume/9780128132098/the-ovary>
- Li, H.-M., Gao, Y.-R., Chang, Q., Pei, X.-Y., Sun, J.-H., Lin, Y.-J., Tian, Y.-N., Qiang-Wang, null, Zhao, B., Xie, H. Q., Ma, H.-M., & Xu, H.-M. (2024). BP-3 exposure at environmentally relevant concentrations induced male developmental reproductive toxicity via ER/CCL27/ROS pathway in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 290, 117556. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.117556>
- Loraine, G. A., & Pettigrove, M. E. (2006). Seasonal Variations in Concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water and Reclaimed Wastewater in Southern California. *Environmental Science & Technology*, 40(3), 687-695. <https://doi.org/10.1021/es051380x>
- Matta, M. K., Florian, J., Zusterzeel, R., Pilli, N. R., Patel, V., Volpe, D. A., Yang, Y., Oh, L., Bashaw, E., Zineh, I., Sanabria, C., Kemp, S., Godfrey, A., Adah, S., Coelho, S., Wang, J., Furlong, L.-A., Ganley, C., Michele, T., & Strauss, D. G. (2020). Effect of Sunscreen Application on Plasma Concentration of Sunscreen Active Ingredients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 323(3), 256-267. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.20747>
- Matta, M. K., Zusterzeel, R., Pilli, N. R., Patel, V., Volpe, D. A., Florian, J., Oh, L., Bashaw, E., Zineh, I., Sanabria, C., Kemp, S., Godfrey, A., Adah, S., Coelho, S., Wang, J., Furlong, L.-A., Ganley, C., Michele, T., & Strauss, D. G. (2019). Effect of Sunscreen Application Under Maximal Use Conditions on Plasma Concentration of Sunscreen Active Ingredients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 321(21), 2082-2091. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.5586>
- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200-214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>
- McLachlan, J. A., Newbold, R. R., Shah, H. C., & Dixon, R. L. (1982). *Reduced fertility in female mice exposed transplacentally to diethylstilbestrol (DES)*. 38(3), 364-371. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)46520-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)46520-9)
- Merrill, A. K., Anderson, T., Conrad, K., Marvin, E., James-Todd, T., Cory-Slechta, D. A., & Sobolewski, M. (2021). Protracted Impairment of Maternal Metabolic Health in Mouse Dams Following Pregnancy Exposure to a Mixture of Low Dose Endocrine-Disrupting Chemicals, a Pilot Study. *Toxics*, 9(12), 346. <https://doi.org/10.3390/toxics9120346>

- Meyer, N., Santamaría, C. G., Muller, J. E., Schumacher, A., Rodriguez, H. A., & Zenclussen, A. C. (2019). *Exposure to 17alpha-ethynil estradiol during early pregnancy affects fetal development and survival*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.144>
- Miller, G. E., & Chen, E. (2013). The Biological Residue of Childhood Poverty. *Child Development Perspectives*, 7(2), 67-73. <https://doi.org/10.1111/cdep.12021>
- Miller, G. E., Chen, E., & Parker, K. J. (2011). Psychological stress in childhood and susceptibility to the chronic diseases of aging: Moving toward a model of behavioral and biological mechanisms. *Psychological Bulletin*, 137(6), 959-997. <https://doi.org/10.1037/a0024768>
- Mínguez-Alarcón, L., Gaskins, A. J., Meeker, J. D., Braun, J. M., & Chavarro, J. E. (2023). Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Fertility and Sterility*, 120(6), 1138-1149. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.10.008>
- Mok-Lin, E., Ehrlich, S., Williams, P. L., Petrozza, J., Wright, D. L., Calafat, A. M., Ye, X., & Hauser, R. (2010). Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *International Journal of Andrology*, 33(2), 385-393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01014.x>
- Moon, J. H., Lee, J., Kim, K. H., Kim, H. J., Kim, Hyeongseok, Cha, H.-N., Park, J., Lee, H., Park, S.-Y., Jang, H. C., & Kim, Hail. (2023). Multiparity increases the risk of diabetes by impairing the proliferative capacity of pancreatic β cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(10), 2269-2280. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01100-2>
- Müller, J. E., Meyer, N., Santamaria, C. G., Schumacher, A., Luque, E. H., Zenclussen, M. L., Rodriguez, H. A., & Zenclussen, A. C. (2018). Bisphenol A exposure during early pregnancy impairs uterine spiral artery remodeling and provokes intrauterine growth restriction in mice. *Scientific Reports*, 8(1), 9196. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27575-y>
- Mustieles, V., Balogh, R. K., Axelstad, M., Montazeri, P., Márquez, S., Vrijheid, M., Draskau, M. K., Taxvig, C., Peinado, F. M., Berman, T., Frederiksen, H., Fernández, M. F., Marie Vinggaard, A., & Andersson, A.-M. (2023). Benzophenone-3: Comprehensive review of the toxicological and human evidence with meta-analysis of human biomonitoring studies. *Environment International*, 173, 107739. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107739>
- Nair, A. B., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), 27-31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- Nakamura, N., Inselman, A. L., White, G. A., Chang, C.-W., Trbojevich, R. A., Sephr, E., Voris, K. L., Patton, R. E., Bryant, M. S., Harrouk, W., McIntyre, B. S., Foster, P. M. D., & Hansen, D. K. (2015). Effects of Maternal and Lactational Exposure to 2-Hydroxy-4-Methoxybenzone on Development and Reproductive Organs in Male and Female Rat Offspring: FETAL EXPOSURE TO HMB AND RAT OFFSPRING. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 104(1), 35-51. <https://doi.org/10.1002/bdrb.21137>

- Organización mundial de la Salud. (2012). *State of the science of endocrine disrupting chemicals*. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78101>
- Organización mundial de la Salud. (2023). *Infertility prevalence estimates, 1990–2021*. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240068315>
- Padmanabhan, V., Cardoso, R. C., & Puttabyatappa, M. (2016). Developmental Programming, a Pathway to Disease. *Endocrinology*, 157(4), 1328-1340. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1003>
- Pagotto, R., Santamaría, C. G., Harreguy, M. B., Abud, J., Zenclussen, M. L., Kass, L., Crispo, M., Muñoz-de-Toro, M. M., Rodríguez, H. A., & Bollati-Fogolín, M. (2020). Perinatal exposure to Bisphenol A disturbs the early differentiation of male germ cells. *Reproductive Toxicology*, 98, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.09.004>
- Park, S. Y., Jeon, J. H., Jeong, K., Chung, H. W., Lee, H., Sung, Y.-A., Ye, S., & Ha, E.-H. (2020). The Association of Ovarian Reserve with Exposure to Bisphenol A and Phthalate in Reproductive-aged Women. *Journal of Korean Medical Science*, 36(2). <https://doi.org/10.3346/jkms.2021.36.e1>
- Parra-Forero, L. Y., Richardson, K. A., Rubessa, M., & Nowak, R. A. (2026). Exposure to phthalate mixtures impairs mouse preimplantation embryonic development in an in vitro model†. *Biology of Reproduction*, 114(1), 84-101. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaf199>
- Pedersen, T., & Peters, H. (1968). Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17(3), 555-557. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170555>
- Peña-Fernández, A., Evans, M. D., & Cooke, M. S. (Eds.). (2022). *Toxicology for the health and pharmaceutical sciences*.
- Pepling, M. E. (2012). Follicular assembly: Mechanisms of action. *Reproduction (Cambridge, England)*, 143(2), 139-149. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0299>
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 40(9), 1769-1777. <https://doi.org/10.1177/0271678X20943823>
- Peretz, J., Gupta, R. K., Singh, J., Hernández-Ochoa, I., & Flaws, J. A. (2011). Bisphenol A Impairs Follicle Growth, Inhibits Steroidogenesis, and Downregulates Rate-Limiting Enzymes in the Estradiol Biosynthesis Pathway. *Toxicological Sciences*, 119(1), 209-217. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq319>
- Piprek, R. P., Rams-Pociecha, I., Zdanowski, R., Kloc, M., & Kubiak, J. Z. (2022). Desmoplakin (Dsp) conditional knockout in NR5A1+ somatic cells affects germ cell survival in developing mouse gonads. *Reproduction*, 163(4), 199-207. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0295>

- Pivonello, C., Muscogiuri, G., Nardone, A., Garifalos, F., Provisiero, D. P., Verde, N., de Angelis, C., Conforti, A., Piscopo, M., Auriemma, R. S., Colao, A., & Pivonello, R. (2020). Bisphenol A: An emerging threat to female fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 18(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0558-8>
- Poormoosavi, S. M., Behmanesh, M. A., Janati, S., & Najafzadehvarzi, H. (2019). Level of Bisphenol A in Follicular Fluid and Serum and Oocyte Morphology in Patients Undergoing IVF Treatment. *Journal of Family & Reproductive Health*, 13(3), 154-159. <https://doi.org/10.18502/jfrh.v13i3.2129>
- Portelinha, T. C. G., Jahn, G. A., Hapon, M. B., Verdade, L. M., & Piña, C. I. (2015). Hormone Levels and Ultrasound Evaluation of *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae) Ovulation. *South American Journal of Herpetology*, 10(1), 23-31. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-14-00030.1>
- Ramamoorthy, S., & Blakely, R. D. (1999). Phosphorylation and Sequestration of Serotonin Transporters Differentially Modulated by Psychostimulants. *Science*, 285(5428), 763-766. <https://doi.org/10.1126/science.285.5428.763>
- Rebholz, S. L., Jones, T., Burke, K. T., Jaeschke, A., Tso, P., D'Alessio, D. A., & Woollett, L. A. (2012). Multiparity leads to obesity and inflammation in mothers and obesity in male offspring. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 302(4), E449-457. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00487.2011>
- Reynolds, L. P., & Caton, J. S. (2012). Role of the pre- and post-natal environment in developmental programming of health and productivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 354(1-2), 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.013>
- Richardson, B. E., & Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: Strategies from different organisms. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(1), 37-49. <https://doi.org/10.1038/nrm2815>
- Richter, C. A., Birnbaum, L. S., Farabollini, F., Newbold, R. R., Rubin, B. S., Talsness, C. E., Vandenberg, J. G., Walser-Kuntz, D. R., & vom Saal, F. S. (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 199-224. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.06.004>
- Rider, C. V., Furr, J. R., Wilson, V. S., & Gray, L. E. (2010). Cumulative effects of in utero administration of mixtures of reproductive toxicants that disrupt common target tissues via diverse mechanisms of toxicity. *International Journal of Andrology*, 33(2), 443-462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01049.x>
- Rivera, O. E., Varayoud, J., Rodríguez, H. A., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2011). Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb. *Reproductive Toxicology*, 32(3), 304-312. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.06.118>
- Rivera, O. E., Varayoud, J., Rodríguez, H. A., Santamaría, C. G., Bosquiaz, V. L., Osti, M., Belmonte, N. M., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2015). Neonatal exposure to xenoestrogens impairs the ovarian response to gonadotropin

- treatment in lambs. *REPRODUCTION*, 149(6), 645-655.
<https://doi.org/10.1530/REP-14-0567>
- Rodríguez, H. A., Santambrosio, N., Santamaría, C. G., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2010). Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reproductive Toxicology*, 30(4), 550-557.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.07.008>
- Rusidzé, M., Gargaros, A., Fébrissy, C., Dubucs, C., Weyl, A., Ousselin, J., Aziza, J., Arnal, J.-F., & Lenfant, F. (2023). Estrogen Actions in Placental Vascular Morphogenesis and Spiral Artery Remodeling: A Comparative View between Humans and Mice. *Cells*, 12(4), 620. <https://doi.org/10.3390/cells12040620>
- Saatcioglu, H. D., Cuevas, I., & Castrillon, D. H. (2016). Control of Oocyte Reawakening by Kit. *PLOS Genetics*, 12(8), e1006215.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006215>
- Sadler, T. W. (2023). *Langman. Embriología Médica*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Saitou, M., & Yamaji, M. (2012). Primordial Germ Cells in Mice. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), a008375.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008375>
- Santamaría, C.G., Abud, Julián Elías, Luque, E. H., Kass, L., & Rodríguez, H. A. (2019). Culturing Rat Whole Ovary for UV Filter Benzophenone-3 Treatment. *Current Protocols in Toxicology*, 82(1). <https://doi.org/10.1002/cptx.89>
- Santamaría, C.G., Abud, J.E., Porporato, M. M., Meyer, N., Zenclussen, A. C., Kass, L., & Rodríguez, H. A. (2019). The UV filter benzophenone 3, alters early follicular assembly in rat whole ovary cultures. *Toxicology Letters*, 303, 48-54.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.12.016>
- Santamaría, C. G., Rodriguez, H. A., Abud, J. E., Rivera, O. E., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2017). Impaired ovarian response to exogenous gonadotropins in female rat offspring born to mothers perinatally exposed to Bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, 73, 259-268.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.050>
- Santamaría, C.G., Durando, M., Muñoz de Toro, M., Luque, E. H., & Rodriguez, H. A. (2016). Ovarian dysfunctions in adult female rat offspring born to mothers perinatally exposed to low doses of bisphenol A. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 158, 220-230.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.11.016>
- Santamaria, C.G., Meyer, N., Schumacher, A., Zenclussen, M. L., Teglia, C. M., Culzoni, M. J., Zenclussen, A. C., & Rodriguez, H. A. (2020). Dermal exposure to the UV filter benzophenone-3 during early pregnancy affects fetal growth and sex ratio of the progeny in mice. *Archives of Toxicology*, 94(8), 2847-2859.
<https://doi.org/10.1007/s00204-020-02776-5>
- Santamaría, C.G., Rodriguez, H. A., Abud, J. E., Rivera, O. E., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2017). Impaired ovarian response to exogenous gonadotropins in female rat offspring born to mothers perinatally exposed to Bisphenol A.

- Reproductive Toxicology*, 73, 259-268.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.050>
- Schalbetter, S. M., Mueller, F. S., Scarborough, J., Richetto, J., Weber-Stadlbauer, U., Meyer, U., & Notter, T. (2021). Oral application of clozapine-N-oxide using the micropipette-guided drug administration (MDA) method in mouse DREADD systems. *Lab Animal*, 50(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41684-021-00723-0>
- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., & Lichtensteiger, W. (2001). In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environmental Health Perspectives*, 109(3), 239-244. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109239>
- Schlumpf, M., Durrer, S., Faass, O., Ehnes, C., Fuetsch, M., Gaille, C., Henseler, M., Hofkamp, L., Maerkel, K., Reolon, S., Timms, B., Tresguerres, J. A. F., & Lichtensteiger, W. (2008). Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: A review. *International Journal of Andrology*, 31(2), 144-151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00856.x>
- Scotti, L., Di Pietro, M., Pascuali, N., Irusta, G., I de Zúñiga, null, Gomez Peña, M., Pomilio, C., Saravia, F., Tesone, M., Abramovich, D., & Parborell, F. (2016). Sphingosine-1-phosphate restores endothelial barrier integrity in ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular Human Reproduction*, 22(12), 852-866. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw065>
- Silva, E. L., Mínguez-Alarcón, L., Coull, B., Hart, J. E., James-Todd, T., Calafat, A. M., Ford, J. B., Hauser, R., & Mahalingaiah, S. (2024). Urinary benzophenone-3 concentrations and ovarian reserve in a cohort of subfertile women. *Fertility and Sterility*, 122(3), 494-503. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2024.04.032>
- Silva, M. H. (2020). Effects of low-dose chlorpyrifos on neurobehavior and potential mechanisms: A review of studies in rodents, zebrafish, and *Caenorhabditis elegans*. *Birth Defects Research*, 112(6), 445-479. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1661>
- Silverthorn, D. U. (2019). *Fisiología humana: Un enfoque integrado* (8.^a ed.).
- Simões, A. E. S., Pereira, D. M., Amaral, J. D., Nunes, A. F., Gomes, S. E., Rodrigues, P. M., Lo, A. C., D'Hooge, R., Steer, C. J., Thibodeau, S. N., Borralho, P. M., & Rodrigues, C. M. P. (2013). Efficient recovery of proteins from multiple source samples after TRIzol® or TRIzol®LS RNA extraction and long-term storage. *BMC Genomics*, 14, 181. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-181>
- Sittadjody, S., Saul, J. M., Joo, S., Yoo, J. J., Atala, A., & Opara, E. C. (2013). Engineered multilayer ovarian tissue that secretes sex steroids and peptide hormones in response to gonadotropins. *Biomaterials*, 34(10), 2412-2420. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.059>
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G. M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M. L., Jensen, T. K., Jørgensen, N., Swan, S. H., Sapra, K. J., Ziebe, S., Priskorn, L., & Juul, A. (2016). Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility.

- Physiological Reviews*, 96(1), 55-97.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2015>
- Souter, I., Smith, K. W., Dimitriadis, I., Ehrlich, S., Williams, P. L., Calafat, A. M., & Hauser, R. (2013). The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments. *Reproductive Toxicology*, 42, 224-231.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.09.008>
- Stackelberg, P. E., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Henderson, A. K., & Reissman, D. B. (2004). Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of The Total Environment*, 329(1-3), 99-113.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.03.015>
- Stévant, I., Kühne, F., Greenfield, A., Chaboissier, M.-C., Dermitzakis, E. T., & Nef, S. (2019). Dissecting Cell Lineage Specification and Sex Fate Determination in Gonadal Somatic Cells Using Single-Cell Transcriptomics. *Cell Reports*, 26(12), 3272-3283.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.069>
- Stoker, C., Andreoli, M. F., Kass, L., Bosquiazzo, V. L., Rossetti, M. F., Canesini, G., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2020). Perinatal exposure to bisphenol A (BPA) impairs neuroendocrine mechanisms regulating food intake and kisspetin system in adult male rats. Evidences of metabolic disruptor hypothesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 499, 110614.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110614>
- Stoker, C., Beldoménico, P. M., Bosquiazzo, V. L., Zayas, M. A., Rey, F., Rodríguez, H., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2008). Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*. *General and Comparative Endocrinology*, 156(3), 603-612.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.02.011>
- Stoker, C., Rey, F., Rodríguez, H., Ramos, J. G., Sirosky, P., Larriera, A., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2003). Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *General and Comparative Endocrinology*, 133(3), 287-296.
[https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00199-0)
- Stouffer, R. L., & Hennebold, J. D. (2015). Structure, Function, and Regulation of the Corpus Luteum. En *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Vol. 1, pp. 1023-1076). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00023-5>
- Sun, F., Betzendahl, I., Shen, Y., Cortvrindt, R., Smits, J., & Eichenlaub-Ritter, U. (2004). Preantral follicle culture as a novel in vitro assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes. *Mutagenesis*, 19(1), 13-25.
<https://doi.org/10.1093/mutage/geg040>
- Sutton, E. F., Gilmore, L. A., Dunger, D. B., Heijmans, B. T., Hivert, M., Ling, C., Martinez, J. A., Ozanne, S. E., Simmons, R. A., Szyf, M., Waterland, R. A., Redman, L. M., & Ravussin, E. (2016). Developmental programming: State-of-

- the-science and future directions—Summary from a Pennington Biomedical symposium. *Obesity*, 24(5), 1018-1026. <https://doi.org/10.1002/oby.21487>
- Teeguarden, J. G., Waechter, J. M., Clewell, H. J., Covington, T. R., & Et., A. (2005). Evaluation of Oral and Intravenous Route Pharmacokinetics, Plasma Protein Binding, and Uterine Tissue Dose Metrics of Bisphenol A: A Physiologically Based Pharmacokinetic Approach. *Toxicological Sciences*. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi135>
- Teiri, H., Samaei, M. R., Dehghani, M., Azhdarpoor, A., Mohammadi, F., Kelishadi, R., & Hajizadeh, Y. (2023). *Maternal exposure to benzophenone derivatives and their impacts on offspring's birth outcomes in a Middle Eastern population*. 13(1), 9484. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35380-5>
- Tingen, C., Kim, A., & Woodruff, T. K. (2009). The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Molecular Human Reproduction*, 15(12), 795-803. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap073>
- Trela-Kobędza, E., & Ajduk, A. (2025). The impact of bisphenol A and its analogs on female reproductive health. *Reproductive Biology*, 25(3), 101028. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2025.101028>
- Tzouma, Z., Dourou, P., Diamanti, A., Harizopoulou, V., Papalexis, P., Karampas, G., Liepinaitienė, A., Dédelė, A., & Sarantaki, A. (2025). Associations Between Endocrine-Disrupting Chemical Exposure and Fertility Outcomes: A Decade of Human Epidemiological Evidence. *Life (Basel, Switzerland)*, 15(7), 993. <https://doi.org/10.3390/life15070993>
- Valsangkar, D., & Downs, S. M. (2013). A requirement for fatty acid oxidation in the hormone-induced meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, 89(2), 43. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.109058>
- Van der Auwera, I., & D'Hooghe, T. (2001). Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Human Reproduction*, 16(6), 1237-1243. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.6.1237>
- Vandenberg, L. N. (2014). Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. *Vitamins and Hormones*, 94, 129-165. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00005-5>
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2009). Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocrine Reviews*, 30(1), 75-95. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0021>
- Varayoud, J., Ramos, J. G., Bosquiazzo, V. L., Lower, M., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2011). Neonatal Exposure to Bisphenol A Alters Rat Uterine Implantation-Associated Gene Expression and Reduces the Number of

- Implantation Sites. *Endocrinology*, 152(3), 1101-1111. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1037>
- Vicente, J. S., Marco-Jiménez, F., Pérez-García, M., Naturil-Alfonso, C., Peñaranda, D. S., & Viudes-de-Castro, M. P. (2022). Oocyte quality and in vivo embryo survival after ovarian stimulation in nulliparous and multiparous rabbit does. *Theriogenology*, 189, 53-58. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.003>
- Vigizzi, L., Ramos, J. G., Kass, L., Tschopp, M. V., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E. H., & Bosquiazzi, V. L. (2016). A deregulated expression of estrogen-target genes is associated with an altered response to estradiol in aged rats perinatally exposed to bisphenol A. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 426, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.02.010>
- Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G. A., Filser, J. G., & Dekant, W. (2002). Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration. *Chemical Research in Toxicology*, 15(10), 1281-1287. <https://doi.org/10.1021/tx025548t>
- Wadhwa, P. D., Buss, C., Entringer, S., & Swanson, J. M. (2009). Developmental origins of health and disease: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(5), 358-368. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1237424>
- Wang, J., & Ganley, C. J. (2019). Safety Threshold Considerations for Sunscreen Systemic Exposure: A Simulation Study. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 105(1), 161-167. <https://doi.org/10.1002/cpt.1178>
- Weinberger, B., Anna M. Vetrano, Faith E. Archer, Stephen W. Marcella, Brian Buckley, Daniel Wartenberg, Mark G. Robson, Jammie Klim, Sana Azhar, Sarah Cavin, Lu Wang, & David Q. Rich. (2013). Effects of maternal exposure to phthalates and bisphenol A during pregnancy on gestational age. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 27(4). <https://doi.org/10.3109/14767058.2013.815718>
- Wnuk, W., Michalska, K., Krupa, A., & Pawlak, K. (2022). Benzophenone-3, a chemical UV-filter in cosmetics: Is it really safe for children and pregnant women? *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 39(1), 26-33. <https://doi.org/10.5114/ada.2022.113617>
- Yao, S., Lopez-Tello, J., & Sferruzzi-Perri, A. N. (2021). Developmental programming of the female reproductive system-a review. *Biology of Reproduction*, 104(4), 745-770. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa232>
- Yesildemir, O., & Celik, M. N. (2024). The Effect of Various Environmental Pollutants on the Reproductive Health in Children: A Brief Review of the Literature. *Current Nutrition Reports*, 13(3), 382-392. <https://doi.org/10.1007/s13668-024-00557-5>
- Zeliger, H. I. (2011). 35-Children. *Human Toxicology of Chemical Mixtures. Segunda edición, Oxford, William Andrew Publishing*, 487-498.

- Zhang, S., Wan, Z., & Kamm, R. D. (2021). Vascularized organoids on a chip: Strategies for engineering organoids with functional vasculature. *Lab on a Chip*, 21(3), 473-488.
- Zhang, X., Jiang, L., Tian, Y., Xia, Y., Yan, L., Wu, C., Zhang, T., & Zhu, J. (2019). Establishment of in-vitro three dimensional rat follicle culture system and validation of the applicability as an in vitro female reproductive toxicity testing system. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 58, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.03.019>
- Zoeller, R. T., Brown, T. R., Doan, L. L., Gore, A. C., Skakkebaek, N. E., Soto, A. M., Woodruff, T. J., & Vom Saal, F. S. (2012). Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, 153(9), 4097-4110. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1422>

Anexo I: Análisis proteómico en ovarios de crías expuestas a BP3 prenatalmente (primera gestación)**Primera gestación (F1.P1): proteínas subreguladas**

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
E9Q0F0	Krt78	intermediate filament organization [GO:0045109]; keratinization [GO:0031424]
P04104	Krt1 Krt2-1	complement activation, lectin pathway [GO:0001867]; establishment of skin barrier [GO:0061436]; negative regulation of inflammatory response [GO:0050728]; protein heterotetramerization [GO:0051290]
Q3UV17	Krt76	epidermis development [GO:0008544]; pigmentation [GO:0043473]; sebaceous gland development [GO:0048733]
F6T4M4	Srrm1	mRNA processing [GO:0006397]; RNA splicing [GO:0008380]
Q62419	Sh3gl1 Sh3d2b	endocytosis [GO:0006897]
Q6IFX2	Krt42 Ka22	
Q01320	Top2a Top-2 Top2	apoptotic chromosome condensation [GO:0030263]; chromatin organization [GO:0006325]; chromosome condensation [GO:0030261]; chromosome segregation [GO:0007059]; DNA damage response [GO:0006974]; DNA topological change [GO:0006265]; embryonic cleavage [GO:0040016]; female meiosis chromosome separation [GO:0051309]; female meiotic nuclear division [GO:0007143]; hematopoietic progenitor cell differentiation [GO:0002244]; positive regulation of apoptotic process [GO:0043065]; positive regulation of single stranded viral RNA replication via double stranded DNA intermediate [GO:0045870]; positive regulation of transcription by RNA polymerase II [GO:0045944]; regulation of circadian rhythm [GO:0042752]; rhythmic process [GO:0048511]
E9Q557	Dsp	adherens junction organization [GO:0034332]; bundle of His cell-Purkinje myocyte adhesion involved in cell communication [GO:0086073]; cell-cell adhesion [GO:0098609]; desmosome organization [GO:0002934]; epithelial cell-cell adhesion [GO:0090136]; intermediate filament cytoskeleton organization [GO:0045104]; intermediate filament organization [GO:0045109]; keratinocyte differentiation [GO:0030216]; protein localization to cell-cell junction [GO:0150105]; regulation of heart rate by cardiac conduction [GO:0086091]; regulation of ventricular cardiac muscle cell action potential [GO:0098911]; skin development [GO:0043588]; ventricular compact myocardium morphogenesis [GO:0003223]

Primera gestación (F1.P1): Proteínas sobrerreguladas

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
P02088	Hbb-b1	carbon dioxide transport [GO:0015670]; erythrocyte development [GO:0048821]; hemopoiesis [GO:0030097]; nitric oxide transport [GO:0030185]; oxygen transport [GO:0015671]
P62849	Rps24	cytoplasmic translation [GO:0002181]; ribosomal small subunit biogenesis [GO:0042274]; translation [GO:0006412]; translation at postsynapse [GO:0140242]; translation at presynapse [GO:0140236]
Q8VCT3	Rnpep	proteolysis [GO:0006508]
Q8BWM0	Ptges2 Gbf1 Pges2	positive regulation of DNA-templated transcription [GO:0045893]; prostaglandin biosynthetic process [GO:0001516]; secretion [GO:0046903]
P21279	Gnaq	action potential [GO:0001508]; adenylate cyclase-activating G protein-coupled receptor signaling pathway [GO:0007189]; cranial skeletal system development [GO:1904888]; developmental pigmentation [GO:0048066]; embryonic digit morphogenesis [GO:0042733]; endothelin receptor signaling pathway [GO:0086100]; forebrain neuron development [GO:0021884]; G protein-coupled receptor signaling pathway [GO:0007186]; glutamate receptor signaling pathway [GO:0007215]; heart development [GO:0007507]; ligand-gated ion channel signaling pathway [GO:1990806]; maternal behavior [GO:0042711]; neuron remodeling [GO:0016322]; phospholipase C-activating dopamine receptor signaling pathway [GO:0060158]; phospholipase C-activating G protein-coupled acetylcholine receptor signaling pathway [GO:0007207]; phospholipase C-activating G protein-coupled receptor signaling pathway [GO:0007200]; positive regulation of insulin secretion [GO:0032024]; post-embryonic development [GO:0009791]; regulation of blood pressure [GO:0008217]; regulation of melanocyte differentiation [GO:0045634]; regulation of platelet activation [GO:0010543]; skeletal system development [GO:0001501]
Q61216	Mre11 Mre11a	cell population proliferation [GO:0008283]; chromosome organization [GO:0051276]; DNA damage response [GO:0006974]; DNA double-strand break processing [GO:0000729]; DNA strand resection involved in replication fork processing [GO:0110025]; double-strand break repair [GO:0006302]; double-strand break repair via homologous recombination [GO:0000724]; double-strand break repair via nonhomologous end joining [GO:0006303]; homologous chromosome pairing at meiosis [GO:0007129]; homologous recombination [GO:0035825]; mitotic G2 DNA damage checkpoint signaling [GO:0007095]; mitotic G2/M transition checkpoint [GO:0044818]; mitotic intra-S DNA damage checkpoint signaling [GO:0031573]; negative regulation of apoptotic process [GO:0043066]; negative regulation of

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
		double-strand break repair via nonhomologous end joining [GO:2001033]; positive regulation of double-strand break repair [GO:2000781]; positive regulation of telomere maintenance [GO:0032206]; R-loop processing [GO:0062176]; sister chromatid cohesion [GO:0007062]; telomeric 3' overhang formation [GO:0031860]
Q3UMU9	Hdgfl2 Hdgfrp2	DNA recombination [GO:0006310]; DNA repair [GO:0006281]; DNA repair-dependent chromatin remodeling [GO:0140861]; muscle cell differentiation [GO:0042692]; muscle organ development [GO:0007517]; positive regulation of cell growth [GO:0030307]; positive regulation of double-strand break repair via homologous recombination [GO:1905168]; skeletal muscle tissue regeneration [GO:0043403]
Q08093	Cnn2	actomyosin structure organization [GO:0031032]; cellular response to mechanical stimulus [GO:0071260]; establishment of localization in cell [GO:0051649]; hemopoiesis [GO:0030097]; macrophage migration [GO:1905517]; negative regulation of macrophage migration [GO:1905522]; negative regulation of phagocytosis [GO:0050765]; phagocytosis [GO:0006909]; positive regulation of gene expression [GO:0010628]; regulation of actin filament-based process [GO:0032970]; regulation of leukocyte proliferation [GO:0070663]; regulation of mononuclear cell proliferation [GO:0032944]; wound healing [GO:0042060]
A0A0R4J0H7	Ncapd2	cell division [GO:0051301]; mitotic chromosome condensation [GO:0007076]; positive regulation of chromosome condensation [GO:1905821]
P43135	Nr2f2 Aporp1 Arp-1 Arp1 Tfcp2l1	anterior/posterior pattern specification [GO:0009952]; blood vessel morphogenesis [GO:0048514]; female gonad development [GO:0008585]; fertilization [GO:0009566]; forebrain development [GO:0030900]; in utero embryonic development [GO:0001701]; interneuron migration [GO:1904936]; lymph vessel development [GO:0001945]; lymphatic endothelial cell fate commitment [GO:0060838]; maternal placenta development [GO:0001893]; negative regulation of endothelial cell migration [GO:0010596]; negative regulation of endothelial cell proliferation [GO:0001937]; negative regulation of transcription by RNA polymerase II [GO:0000122]; neuron migration [GO:0001764]; placenta blood vessel development [GO:0060674]; positive regulation of DNA-templated transcription [GO:0045893]; positive regulation of systemic arterial blood pressure [GO:0003084]; positive regulation of transcription by RNA polymerase II [GO:0045944]; radial pattern formation [GO:0009956]; regulation of transcription by RNA polymerase II [GO:0006357]; response to estradiol [GO:0032355]; skeletal muscle tissue development [GO:0007519]; trophoblast giant cell differentiation [GO:0060707]
Q3URQ0	Tex10	

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
B1AZI6	Thoc2	blastocyst development [GO:0001824]; cell morphogenesis [GO:0000902]; generation of neurons [GO:0048699]; mRNA processing [GO:0006397]; negative regulation of neuron projection development [GO:0010977]; neuron development [GO:0048666]; poly(A)+ mRNA export from nucleus [GO:0016973]; regulation of gene expression [GO:0010468]; regulation of mRNA export from nucleus [GO:0010793]; RNA splicing [GO:0008380]; stem cell division [GO:0017145]
O35465	Fkbp8 Fkbp38 Sam11	apoptotic process [GO:0006915]; BMP signaling pathway [GO:0030509]; camera-type eye development [GO:0043010]; cell fate specification [GO:0001708]; dorsal/ventral neural tube patterning [GO:0021904]; dorsal/ventral pattern formation [GO:0009953]; multicellular organism growth [GO:0035264]; negative regulation of apoptotic process [GO:0043066]; neural tube development [GO:0021915]; neuron fate specification [GO:0048665]; positive regulation of BMP signaling pathway [GO:0030513]; protein folding [GO:0006457]; protein localization to mitochondrion [GO:0070585]; regulation of BMP signaling pathway [GO:0030510]; regulation of gene expression [GO:0010468]; regulation of mitophagy [GO:1901524]; smoothened signaling pathway [GO:0007224]
Q80WQ2	Vac14 D8Wsu151e	phosphatidylinositol biosynthetic process [GO:0006661]; regulation of postsynaptic neurotransmitter receptor internalization [GO:0099149]; response to osmotic stress [GO:0006970]
Q8K2V6	Ipo11 Ranbp11	ribosomal protein import into nucleus [GO:0006610]
Q8JZK9	Hmgcs1	acetyl-CoA metabolic process [GO:0006084]; cholesterol biosynthetic process [GO:0006695]; farnesyl diphosphate biosynthetic process, mevalonate pathway [GO:0010142]
Q19LI2	A1bg	growth hormone receptor signaling pathway [GO:0060396]

Anexo II: Análisis proteómico en ovarios de crías expuestas a BP3 prenatalmente (segunda gestación)**Segunda gestación (F1.P2): proteínas subreguladas**

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
Q03265	Atp5f1a Atp5a1	cellular response to dexamethasone stimulus [GO:0071549]; cellular response to nitric oxide [GO:0071732]; lipid metabolic process [GO:0006629]; negative regulation of endothelial cell proliferation [GO:0001937]; positive regulation of blood vessel endothelial cell migration [GO:0043536]; proton motive force-driven ATP synthesis [GO:0015986]; proton motive force-driven mitochondrial ATP synthesis [GO:0042776]; response to ethanol [GO:0045471]; response to muscle activity [GO:0014850]
P01942	Hba Hba-a1	carbon dioxide transport [GO:0015670]; erythrocyte development [GO:0048821]; in utero embryonic development [GO:0001701]; nitric oxide transport [GO:0030185]; oxygen transport [GO:0015671]; response to bacterium [GO:0009617]; response to stilbenoid [GO:0035634]
P80314	Cct2 Cctb	binding of sperm to zona pellucida [GO:0007339]; chaperone mediated protein folding independent of cofactor [GO:0051086]; chaperone-mediated protein complex assembly [GO:0051131]; positive regulation of telomerase RNA localization to Cajal body [GO:1904874]; positive regulation of telomere maintenance via telomerase [GO:0032212]; protein stabilization [GO:0050821]; scaRNA localization to Cajal body [GO:0090666]
P45376	Akr1b1 Akr1b3 Aldor1 Aldr1 Alr2	cellular hyperosmotic salinity response [GO:0071475]; daunorubicin metabolic process [GO:0044597]; doxorubicin metabolic process [GO:0044598]; epithelial cell maturation [GO:0002070]; fructose biosynthetic process [GO:0046370]; L-ascorbic acid biosynthetic process [GO:0019853]; metanephric collecting duct development [GO:0072205]; negative regulation of apoptotic process [GO:0043066]; regulation of urine volume [GO:0035809]; renal water homeostasis [GO:0003091]; retinoid metabolic process [GO:0001523]
F8WIV2	Serpib6a	
P80313	Cct7 Ccth	binding of sperm to zona pellucida [GO:0007339]; chaperone mediated protein folding independent of cofactor [GO:0051086]; positive regulation of telomere maintenance via telomerase [GO:0032212]; protein stabilization [GO:0050821]

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
Q9D154	Serpinb1a Serpinb1	cellular homeostasis [GO:0019725]; inflammatory response [GO:0006954]; negative regulation of interleukin-1 beta production [GO:0032691]; regulation of innate immune response [GO:0045088]; regulation of protein catabolic process [GO:0042176]; type B pancreatic cell proliferation [GO:0044342]
Q99LC5	Etfp	amino acid catabolic process [GO:0009063]; fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA dehydrogenase [GO:0033539]; respiratory electron transport chain [GO:0022904]
Q9DB77	Uqcrc2	cellular respiration [GO:0045333]; mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c [GO:0006122]; proteolysis [GO:0006508]; response to xenobiotic stimulus [GO:0009410]
Q07417	Acads	fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA dehydrogenase [GO:0033539]
Q8BJY1	Psmd5 Kiaa0072	proteasome regulatory particle assembly [GO:0070682]
P10107	Anxa1 Anx1 Lpc-1 Lpc1	actin cytoskeleton organization [GO:0030036]; adaptive immune response [GO:0002250]; alpha-beta T cell differentiation [GO:0046632]; arachidonate secretion [GO:0050482]; cellular response to glucocorticoid stimulus [GO:0071385]; cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus [GO:0035924]; G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger [GO:0007187]; granulocyte chemotaxis [GO:0071621]; inflammatory response [GO:0006954]; innate immune response [GO:0045087]; keratinocyte differentiation [GO:0030216]; monocyte chemotaxis [GO:0002548]; myoblast migration involved in skeletal muscle regeneration [GO:0014839]; negative regulation of exocytosis [GO:0045920]; negative regulation of interleukin-8 production [GO:0032717]; negative regulation of T-helper 2 cell differentiation [GO:0045629]; neutrophil activation [GO:0042119]; neutrophil clearance [GO:0097350]; neutrophil homeostasis [GO:0001780]; phagocytosis [GO:0006909]; positive regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis [GO:0090050]; positive regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle [GO:1900087]; positive regulation of interleukin-2 production [GO:0032743]; positive regulation of neutrophil apoptotic process [GO:0033031]; positive regulation of T cell proliferation [GO:0042102]; positive regulation of T-helper 1 cell differentiation [GO:0045627]; positive regulation of vesicle fusion [GO:0031340]; positive regulation of wound healing [GO:0090303]; regulation of cell population proliferation [GO:0042127]; regulation of cell shape [GO:0008360]; regulation of hormone secretion [GO:0046883]; regulation of inflammatory response [GO:0050727]; regulation of interleukin-1 production [GO:0032652]; regulation of leukocyte migration [GO:0002685]; signal transduction [GO:0007165]

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
Q9CQ62	Decr1	fatty acid beta-oxidation [GO:0006635]; positive regulation of cold-induced thermogenesis [GO:0120162]
Q91VB8	Hba-a1 Glnc1 haemoglobin alpha 1 haemoglobin alpha 2 Hba-a2	erythrocyte development [GO:0048821]; in utero embryonic development [GO:0001701]; response to bacterium [GO:0009617]
Q9WVJ2	Psmd13	meiosis I [GO:0007127]
Q61183	Papola Pap Plap	co-transcriptional mRNA 3'-end processing, cleavage and polyadenylation pathway [GO:0180010]; cytosolic mRNA polyadenylation [GO:0180011]
Q9CX56	Psmd8	proteolysis [GO:0006508]
Q8CFI7	Polr2b	transcription by RNA polymerase II [GO:0006366]
Q62465	Vat1 Vat-1	negative regulation of mitochondrial fusion [GO:0010637]
P61290	Psme3	apoptotic process [GO:0006915]; negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway [GO:2001237]; regulation of proteasomal protein catabolic process [GO:0061136]
P48774	Gstm5 Fsc2 Gstm3	cellular detoxification of nitrogen compound [GO:0070458]; glutathione metabolic process [GO:0006749]; nitrobenzene metabolic process [GO:0018916]; response to estrogen [GO:0043627]; xenobiotic catabolic process [GO:0042178]
Q99L13	Hibadh	valine catabolic process [GO:0006574]
P42125	Eci1 Dci	fatty acid beta-oxidation [GO:0006635]
A0A0G2JEC4	Sh3glb1	apoptotic process [GO:0006915]
Q61263	Soat1 Acact	cholesterol efflux [GO:0033344]; cholesterol homeostasis [GO:0042632]; cholesterol metabolic process [GO:0008203]; cholesterol storage [GO:0010878]; macrophage derived foam cell differentiation [GO:0010742];

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
		positive regulation of amyloid precursor protein biosynthetic process [GO:0042986]; very-low-density lipoprotein particle assembly [GO:0034379]
P13439	Umps	'de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic process [GO:0006207]; 'de novo' UMP biosynthetic process [GO:0044205]; UDP biosynthetic process [GO:0006225]
O89112	Lancl1 Gpr69a	carbohydrate metabolic process [GO:0005975]; cellular detoxification [GO:1990748]; peptide modification [GO:0031179]
B1AT82	Prpsap1	nucleotide biosynthetic process [GO:0009165]
Q6ZPR5	Smpd4 Kiaa1418	cellular response to tumor necrosis factor [GO:0071356]; ceramide biosynthetic process [GO:0046513]; in utero embryonic development [GO:0001701]; sphingomyelin catabolic process [GO:0006685]
O08917	Flot1	axon guidance [GO:0007411]; axonogenesis [GO:0007409]; cellular response to exogenous dsRNA [GO:0071360]; dsRNA transport [GO:0033227]; endocytosis [GO:0006897]; extracellular matrix disassembly [GO:0022617]; intracellular signal transduction [GO:0035556]; plasma membrane raft assembly [GO:0044854]; positive regulation of canonical NF-kappaB signal transduction [GO:0043123]; positive regulation of cell junction assembly [GO:1901890]; positive regulation of cell-cell adhesion mediated by cadherin [GO:2000049]; positive regulation of endocytosis [GO:0045807]; positive regulation of heterotypic cell-cell adhesion [GO:0034116]; positive regulation of interferon-beta production [GO:0032728]; positive regulation of myoblast fusion [GO:1901741]; positive regulation of protein binding [GO:0032092]; positive regulation of skeletal muscle tissue development [GO:0048643]; positive regulation of synaptic transmission, dopaminergic [GO:0032226]; positive regulation of toll-like receptor 3 signaling pathway [GO:0034141]; protein localization to plasma membrane [GO:0072659]; protein stabilization [GO:0050821]; regulation of neurotransmitter uptake [GO:0051580]; regulation of receptor internalization [GO:0002090]; regulation of Rho protein signal transduction [GO:0035023]; response to endoplasmic reticulum stress [GO:0034976]
Q08857	Cd36	amyloid fibril formation [GO:1990000]; amyloid-beta clearance by cellular catabolic process [GO:0150094]; apoptotic cell clearance [GO:0043277]; cell adhesion [GO:0007155]; cell surface receptor signaling pathway [GO:0007166]; cellular response to amyloid-beta [GO:1904646]; cellular response to bacterial lipopeptide [GO:0071221]; cellular response to diacyl bacterial lipopeptide [GO:0071726]; cellular response to hydroperoxide [GO:0071447]; cellular response to lipopolysaccharide [GO:0071222]; cellular response to lipoteichoic acid [GO:0071223]; cellular response

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
		to low-density lipoprotein particle stimulus [GO:0071404]; cellular response to oxidative stress [GO:0034599]; cellular response to oxidised low-density lipoprotein particle stimulus [GO:0140052]; cholesterol import [GO:0070508]; cholesterol transport [GO:0030301]; defense response to Gram-positive bacterium [GO:0050830]; energy homeostasis [GO:0097009]; intestinal absorption [GO:0050892]; intestinal cholesterol absorption [GO:0030299]; lipid storage [GO:0019915]; lipid transport across blood-brain barrier [GO:1990379]; lipoprotein transport [GO:0042953]; long-chain fatty acid import across plasma membrane [GO:0015911]; long-chain fatty acid import into cell [GO:0044539]; low-density lipoprotein particle clearance [GO:0034383]; low-density lipoprotein particle mediated signaling [GO:0055096]; MAPK cascade [GO:0000165]; negative regulation of angiogenesis [GO:0016525]; negative regulation of gene expression [GO:0010629]; negative regulation of protein import into nucleus [GO:0042308]; negative regulation of transcription by RNA polymerase II [GO:0000122]; nitric oxide-cGMP-mediated signaling [GO:0038060]; oxidised low-density lipoprotein particle clearance [GO:0150024]; phagocytosis, recognition [GO:0006910]; plasma lipoprotein particle clearance [GO:0034381]; positive regulation of blood coagulation [GO:0030194]; positive regulation of blood microparticle formation [GO:2000334]; positive regulation of canonical NF-kappaB signal transduction [GO:0043123]; positive regulation of cell-matrix adhesion [GO:0001954]; positive regulation of cholesterol storage [GO:0010886]; positive regulation of cold-induced thermogenesis [GO:0120162]; positive regulation of cytosolic calcium ion concentration [GO:0007204]; positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade [GO:0070374]; positive regulation of gene expression [GO:0010628]; positive regulation of interleukin-1 beta production [GO:0032731]; positive regulation of interleukin-12 production [GO:0032735]; positive regulation of interleukin-6 production [GO:0032755]; positive regulation of macrophage cytokine production [GO:0060907]; positive regulation of macrophage derived foam cell differentiation [GO:0010744]; positive regulation of MAPK cascade [GO:0043410]; positive regulation of nitric oxide biosynthetic process [GO:0045429]; positive regulation of NLRP3 inflammasome complex assembly [GO:1900227]; positive regulation of phagocytosis, engulfment [GO:0060100]; positive regulation of reactive oxygen species biosynthetic process [GO:1903428]; positive regulation of reactive oxygen species metabolic process [GO:2000379]; positive regulation of tumor necrosis factor production [GO:0032760]; receptor internalization [GO:0031623]; regulation of action potential [GO:0098900]; regulation of removal of superoxide radicals [GO:2000121]; regulation of toll-like receptor signaling pathway [GO:0034121]; response to bacterium [GO:0009617]; response to fatty acid [GO:0070542]; response to linoleic acid [GO:0070543]; response to lipid [GO:0033993]; response to stilbenoid [GO:0035634]; sensory perception of taste [GO:0050909]; triglyceride transport [GO:0034197]

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
Q8CGA0	Ppm1f	apoptotic process [GO:0006915]; cellular response to xenobiotic stimulus [GO:0071466]; intracellular signal transduction [GO:0035556]; negative regulation of cell-cell adhesion mediated by cadherin [GO:2000048]; negative regulation of DNA-templated transcription [GO:0045892]; negative regulation of protein transport [GO:0051224]; positive regulation of cell-substrate adhesion [GO:0010811]; positive regulation of chemotaxis [GO:0050921]; positive regulation of epithelial cell migration [GO:0010634]; positive regulation of focal adhesion assembly [GO:0051894]; positive regulation of gene expression [GO:0010628]; positive regulation of growth [GO:0045927]; positive regulation of stress fiber assembly [GO:0051496]

Segunda gestación (F1.P2): Proteínas sobrerreguladas

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
P43274	H1-4 H1f4 Hist1h1e	chromatin organization [GO:0006325]; negative regulation of transcription by RNA polymerase II [GO:0000122]; nucleosome assembly [GO:0006334]; regulation of transcription by RNA polymerase II [GO:0006357]
A0A0A6YX26	Rpl31	translation [GO:0006412]
Q6ZWV7	Rpl35	cytoplasmic translation [GO:0002181]; maturation of LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA) [GO:0000463]; translation at postsynapse [GO:0140242]; translation at presynapse [GO:0140236]
Q8BG13	Rbm3	
Q8R349	Cdc16 Anapc6	anaphase-promoting complex-dependent catabolic process [GO:0031145]; cell division [GO:0051301]; protein branched polyubiquitination [GO:0141198]; protein K11-linked ubiquitination [GO:0070979]; protein K48-linked ubiquitination [GO:0070936]
Q9D7S7	Rpl22l1	translation [GO:0006412]
P54227	Stmn1 Lag Lap18 Pr22	axonogenesis [GO:0007409]; establishment of skin barrier [GO:0061436]; hepatocyte growth factor receptor signaling pathway [GO:0048012]; microtubule depolymerization [GO:0007019]; mitotic cytokinesis [GO:0000281];

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
		mitotic spindle organization [GO:0007052]; negative regulation of microtubule polymerization [GO:0031115]; negative regulation of Rho protein signal transduction [GO:0035024]; negative regulation of stress fiber assembly [GO:0051497]; negative regulation of thrombin-activated receptor signaling pathway [GO:0070495]; regulation of cell migration [GO:0030334]; response to virus [GO:0009615]
A0A087WPM0	Selenoh 2700094K13Rik	
E9QAS5	Chd4	double-strand break repair via homologous recombination [GO:0000724]; negative regulation of gene expression [GO:0010629]; negative regulation of transcription by RNA polymerase II [GO:0000122]; regulation of synapse assembly [GO:0051963]; terminal button organization [GO:0072553]
Q3URD3	Slmap Kiaa1601 Slap	negative regulation of hippo signaling [GO:0035331]
Q5EG47	Prkaa1	autophagy [GO:0006914]; CAMKK-AMPK signaling cascade [GO:0061762]; cellular response to calcium ion [GO:0071277]; cellular response to ethanol [GO:0071361]; cellular response to glucose starvation [GO:0042149]; cellular response to glucose stimulus [GO:0071333]; cellular response to hydrogen peroxide [GO:0070301]; cellular response to hypoxia [GO:0071456]; cellular response to nutrient levels [GO:0031669]; cellular response to oxidative stress [GO:0034599]; cellular response to prostaglandin E stimulus [GO:0071380]; cellular response to xenobiotic stimulus [GO:0071466]; cholesterol biosynthetic process [GO:0006695]; cold acclimation [GO:0009631]; energy homeostasis [GO:0097009]; fatty acid biosynthetic process [GO:0006633]; fatty acid homeostasis [GO:0055089]; fatty acid oxidation [GO:0019395]; glucose homeostasis [GO:0042593]; glucose metabolic process [GO:0006006]; lipid biosynthetic process [GO:0008610]; lipid droplet disassembly [GO:1905691]; motor behavior [GO:0061744]; negative regulation of apoptotic process [GO:0043066]; negative regulation of gene expression [GO:0010629]; negative regulation of hepatocyte apoptotic process [GO:1903944]; negative regulation of insulin receptor signaling pathway [GO:0046627]; negative regulation of lipid catabolic process [GO:0050995]; negative regulation of TOR signaling [GO:0032007]; negative regulation of TORC1 signaling [GO:1904262]; negative regulation of tubulin deacetylation [GO:1904428]; neuron cellular homeostasis [GO:0070050]; positive regulation of adipose tissue development [GO:1904179]; positive regulation of autophagy [GO:0010508]; positive regulation of cell population proliferation [GO:0008284]; positive regulation of DNA-templated transcription [GO:0045893]; positive regulation of

Código Uniprot	Gen	Ontología del gen (proceso biológico)
		gene expression [GO:0010628]; positive regulation of glycolytic process [GO:0045821]; positive regulation of mitochondrial transcription [GO:1903109]; positive regulation of protein localization [GO:1903829]; positive regulation of protein targeting to mitochondrion [GO:1903955]; positive regulation of skeletal muscle tissue development [GO:0048643]; positive regulation of T cell activation [GO:0050870]; positive regulation of T cell mediated immune response to tumor cell [GO:0002842]; protein localization to lipid droplet [GO:1990044]; regulation of circadian rhythm [GO:0042752]; regulation of microtubule cytoskeleton organization [GO:0070507]; regulation of stress granule assembly [GO:0062028]; regulation of vesicle-mediated transport [GO:0060627]; response to activity [GO:0014823]; response to caffeine [GO:0031000]; response to estrogen [GO:0043627]; response to gamma radiation [GO:0010332]; response to hydrogen peroxide [GO:0042542]; response to UV [GO:0009411]; rhythmic process [GO:0048511]; Wnt signaling pathway [GO:0016055]
A0A494BB95	Eif1a	
Q9CR86	Carhsp1	regulation of mRNA stability [GO:0043488]
A0A0R4J170	Smarca4	aortic smooth muscle cell differentiation [GO:0035887]; negative regulation of androgen receptor signaling pathway [GO:0060766]; negative regulation of cell growth [GO:0030308]; nervous system development [GO:0007399]; neural retina development [GO:0003407]; nucleosome assembly [GO:0006334]; nucleosome disassembly [GO:0006337]; positive regulation by host of viral transcription [GO:0043923]; positive regulation of glucose mediated signaling pathway [GO:1902661]; positive regulation of miRNA transcription [GO:1902895]; positive regulation of signal transduction by p53 class mediator [GO:1901798]; positive regulation of transcription by RNA polymerase II [GO:0045944]; positive regulation of transcription of nucleolar large rRNA by RNA polymerase I [GO:1901838]; positive regulation of Wnt signaling pathway [GO:0030177]
A6H644	Ppp1r12b	signal transduction [GO:0007165]

Anexo III: Galliani et al., 2024

Archives of Toxicology
https://doi.org/10.1007/s00204-024-03730-5

REPRODUCTIVE TOXICOLOGY



Female offspring of mice perinatally exposed to benzophenone-3 showed early subfertility linked to a poor oocyte stockpile

Valentina Galliani¹ · Julián Elías Abud^{1,2} · María Laura Zenclussen^{1,2} · Horacio Adolfo Rodríguez^{1,2,3}

Received: 15 January 2024 / Accepted: 7 March 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2024

Abstract

Previously, we found that the ultraviolet filter benzophenone-3 (BP3) causes fetal growth restriction in mice when is applied when implantation occurs (first week of gestation). However, whether BP3 can affect gestation and fertility after implantation period is unknown. We aimed to study the effects on reproductive physiology of the offspring caused by perinatal exposure to BP3. C57BL/6 pregnant mice were dermally exposed to 50 mg BP3/kg bw.day or olive oil (vehicle) from gestation day 9 (gd9) to postnatal day 21 (pnd1). We observed no differences in mother's weights, duration of gestation, number of pups per mother, onset of puberty or sex ratio. The weights of the pups exposed to benzophenone-3 were transiently lower than those of the control. Estrous cycle was not affected by perinatal exposure to BP3. Besides, we performed a fertility assessment by continuous breeding protocol: at 10 weeks of age, one F1 female and one F1 male mouse from each group was randomly chosen from each litter and housed together for a period of 6 months. We noticed a reduction in the number of deliveries per mother among dams exposed to BP3 during the perinatal period. To see if this decreased fertility could be associated to an early onset of oocytes depletion, we estimated the ovarian reserve of germ cells. We found reduced number of oocytes and primordial follicles in BP3. In conclusion, perinatal exposure to BP3 leads to a decline in the reproductive capacity of female mice in a continuous breeding protocol linked to oocyte depletion.

Keywords UV filter · Personal care products · Benzophenone · Ovary · Fertility

Introduction

Endocrine-disrupting chemicals (EDC) represent a vast number of substances present in the environment characterized by interfering with the activity of hormonally regulated events and altering the homeostasis of the endocrine system of organisms (Ramamoorthy and Blakely 1999; Bergman et al. 2012). Driven hypothesis linked to EDCs is

“developmental programming,” often termed developmental origins of health and disease (DOHaD), which is the concept that “insults” during embryonic, fetal, and postnatal life can have long-lasting effects on the offspring (Doerge et al. 2010; Dahlen et al. 2021). The concept is that something that happens while in uterus or during infancy can have long-term effects on the health and well-being of that individual (Reynolds and Caton 2012). Particularly, there is a critical need for understanding the mechanisms of developmental programming, intergenerational consequences, and particularly effects at various developmental stages, identifying the periods when an EDC can elicit long-term detrimental effects caused by exposure to it (i.e., pre- as well as postnatally) (Reynolds and Caton 2012).

Benzophenone-3 (BP3) or oxybenzone is one of the main substances used as an active ingredient in sunscreens and cosmetics, due to its well-established UV-blocking efficacy (Doerge et al. 2010; Dahlen et al. 2021), and is also a well-known EDC (Schlumpf et al. 2001; Schreurs et al. 2002, 2005). Previously, we identified early prenatal period as sensitive to BP3. In pregnant mice exposed to BP3 by

✉ Horacio Adolfo Rodríguez
harodrig@fbcb.unl.edu.ar

¹ Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), Universidad Nacional del Litoral (UNL) – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Santa Fe, Argentina

² Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina

³ Cátedra de Fisiología Humana, FBCB, Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL, UNL-CONICET), UNL, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, Casilla de Correo 242, 3000 Santa Fe, Argentina

dermal route in an early prenatal period [from gestation day (gd) 0 to gd6]), we found that BP3 persisted in amniotic fluid longer than in serum, staying in direct contact with developing fetuses and leading to fetal growth restriction (FGR) (Santamaria et al. 2020). These results showed that the first week of gestation, when implantation occurs, is a period vulnerable to the action of BP3 applied to the skin. However, whether BP3 is able to affect gestation and fertility when administered during pre- and postnatal development (perinatal) period is unknown. Accumulating evidence suggests that insults occurring during the perinatal period alter the developmental trajectory of the offspring leading to long-term detrimental outcomes that often culminate in adult pathologies (Reynolds and Caton 2012; Padmanabhan et al. 2016). Perinatal exposure allows to assess toxicity in pregnant females, as well as altered growth and functional deficits in offspring (Peña-Fernández et al. 2022). Thus, the aim of this work was to evaluate whether BP3 administered from gd9 until weaning [(postnatal day (pnd) 21] to pregnant mice can affect reproductive parameters of F0 mothers and F1 offspring. Examinations in the offspring included sexual maturation (puberty) and reproductive capacity at maturity. In particular, we studied the long-term effects of BP3 on the fertility of F1 mice by applying a continuous breeding protocol (McLachlan et al. 1982; Cabaton et al. 2011).

Materials and methods

Animals

For our study, 19 female and 7 male C57BL/6 mice (weighing between 14 and 17 g and aged 6 weeks) were obtained from the Centro de Medicina Comparada—ICIVET Litoral (UNL, CONICET, Santa Fe, Argentina). These mice were subsequently housed and maintained within our research facilities. Health assessments provided by the vendor confirmed the absence of known viral, bacterial, and parasitic pathogens among the mice. The mice had ad libitum access to both water and food and were housed in a controlled environment with a constant temperature of 22 ± 2 °C and a 14-h light cycle, spanning from 06:00 to 20:00 h. We ensured the welfare of the animals by conducting daily assessments, monitoring their appearance, behavior, and the cage environment. This ongoing vigilance enabled us to promptly attend to any indications of distress or health issues. Following a 2-week acclimatization period, during which the mice adjusted to their new environment, the experiments commenced. All experiments are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al. 2020). The protocols employed in this study adhered to the guidelines outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals

provided by the U.S. National Academy of Sciences. Additionally, they received approval from the Advisory Committee on Ethics and Safety Research at the Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-UNL, Santa Fe, Argentina (CE permit number: CE2018-61-C).

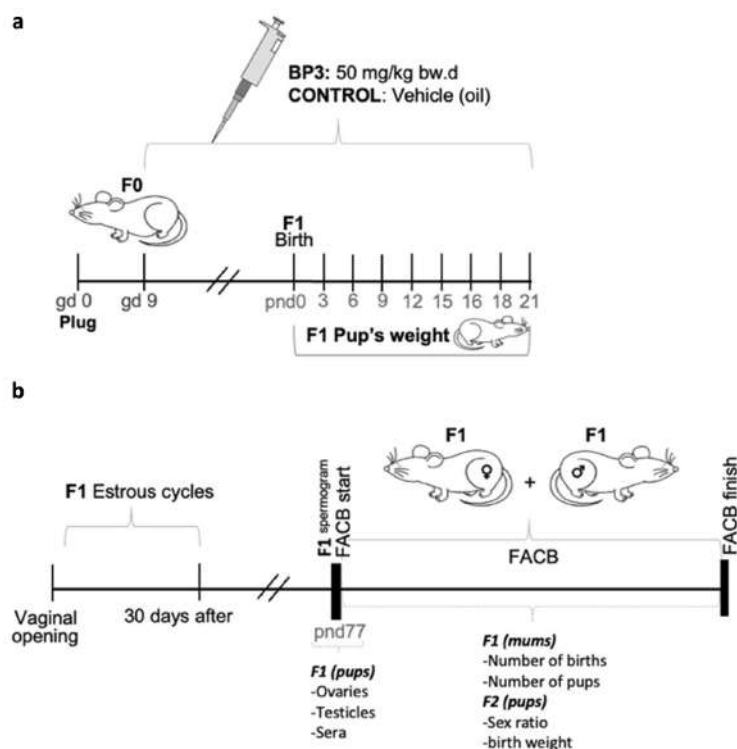
Experimental design and sample collection

One C57BL/6 male and one C57BL/6 female were paired and housed together in individual cages. The day on which the presence of a vaginal plug was observed was designated as gd0 (Fig. 1a). Pregnant mice were distributed in two groups and treated following our previous protocols (Santamaria et al. 2020): C57BL/6 pregnant mice were shaved on the back and topical applications of 50 mg BP-3 per kg of body weight (bw) per day (d) or olive oil (vehicle, Extra virgin olive oil Tres Marías, San Juan, Argentina) were given daily (BP3-treated mice: $n=10$, olive oil-treated mice: $n=9$). Starting from gd9, BP3 or olive oil was applied to the shaved skin on the back of the mice until weaning at postnatal day 21 (pnd21). Mother's weights were daily recorded. On the day of each delivery, number, sex, and weight of F1 pups were recorded. During the lactation period, the weights of the offspring were also recorded.

Selection of the dose

We selected the dose of 50 mg/kg bw/day because it represents the calculated dose after controlled whole-body dermal application in humans, according to Janjua et al., (2008). In that study, 2 mg of cream formulation at 10% (w/w) of BP-3 per cm² of body surface was applied. Females displayed an average body area of 1.73 m², resulting in a total average amount of 34,600 mg of cream each (see Table 1 in Janjua et al. 2008). Thus, with an average body weight of 68 kg, the BP-3 dose of Janjua's study was 50.88 mg/kg bw in females. This approach was further validated in (Wang and Ganley 2019), where the authors developed a pharmacokinetic model describing the concentration–time profile for oxybenzone on the basis of the observed data from the study by Janjua et al (2008). Given that allometric scaling is not recommended for drugs administered by topical, nasal, subcutaneous, or intramuscular routes (Nair and Jacob 2016), we directly adapted and validated this dose of 50 mg/kg bw/day for mice in a recent publication by our group (Santamaria et al. 2020). The serum concentrations observed in our mouse model were consistent with plasma concentrations observed after a single application, according to values reported by a recent randomized clinical trial in humans (Matta et al. 2020).

Fig. 1 Experimental design: **a** *Treatment of pregnant females (F0)*: Pregnant females were treated with topical applications of 50 mg BP3/kg bw/day or olive oil (vehicle) from gd9 to pnd21. The weight of F1 pups was recorded from pnd0 to pnd21 at 3-day intervals. **b** *Fertility assessment through Continuous Breeding (FABC) of F1*: Vaginal opening was checked since pnd21 onwards, followed by daily collection of vaginal exudates for 30 days. On pnd77, sperm counts were conducted for male offspring. One male and one female of F1 from each litter were selected and subjected to a 6-month period of FABC. Samples of ovaries, testicles, and sera were collected for subsequent analysis from the F1 animals that were not selected for the FABC. The number of births per dam and offspring per dam were recorded, while birth weight and sex ratio were recorded for the F2 generation



Topical application

BP3 was applied on the skin of the animals, following protocols previously described (Santamaria et al. 2020). A working solution of BP3 was prepared at a concentration of 10 mg/ml, using olive oil as the vehicle. To enhance dermal absorption, the dorsal fur of the mice was carefully shaved prior to applications. The working solution was then applied directly to the mice's skin using a micropipette, with the volume adjusted based on each animal's individual body weight to ensure precise dosing. During the application process, mice were placed in a clean cage without any bedding or materials that could absorb the solution, ensuring the compound had sufficient time for complete absorption into the skin. The mice were observed continuously until it was confirmed that there was no residual solution on their skin, at which point they were returned to their home cages. This procedure was performed without occlusion, as the absorption of the solution occurred very rapidly, typically within 10 to 30 s.

Fertility assessment by continuous breeding (FABC) of F1 offspring

After weaning, F1 females and males were kept separately. Females were checked daily until the appearance of vaginal opening. 7–10 days after vaginal opening, vaginal smears were performed daily for 30 days to evaluate the regularity of the estrous cycles (Fig. 1b). At pnd77 (11-week-old), one F1 female and one F1 male mouse from each group was randomly chosen from each litter and housed together for a period of 6 months. These breeding pairs were subjected to a continuous breeding protocol (Fig. 1b), (Fertility Assessment by Continuous Breeding" or FABC) that was adapted from previous reports (Lamb et al. 1985; Cabaton et al. 2011). All the breeding cages were examined daily. On the day of each delivery, F2 pups were separated from the mother, and their number, sex, and weight were recorded. The pups were euthanized, and the F1 dam was immediately returned to the breeding cage. The time to first litter, number of deliveries (fertility) per dam/breeding pair, number of

neonates per litter (fecundity), and number of mice having litters were recorded. The number, sex and weight of F2 live pups delivered were also recorded.

Offspring that were not selected to the FACB protocol were euthanized and samples of ovaries, testicles and sera were collected for further analysis (see below). In male mice sacrificed at pnd77, sperm count was also performed (Fig. 1b).

Sperm count

F1 males were selected at pnd77 to perform a sperm count analysis based on previous protocols (Pagotto et al. 2020). Briefly, spermatozoa were collected from the cauda epididymis. Small incisions were made in the cauda epididymis, which was then placed in 1 ml of HTF medium (IrvineScientific) at 37 °C for 10 min. Then, a 1/20 dilution was used to perform the sperm count using a Neubauer chamber. The total and motile spermatozoa were calculated by multiplying the number of observed spermatozoa by the reciprocal of the dilution factor, and then was multiplied by 10,000 to obtain the spermatozoa per milliliter.

Oocyte count in the ovaries of F1 females

Follicular dynamics were assessed prior to the onset of FACB following protocols previously described (Rodríguez et al. 2010; Santamaría et al. 2016). Briefly, ovaries were fixed in 10% buffered formalin overnight at room temperature and embedded in paraffin. The whole ovary was serially sectioned (5 µm thick), and 1 every 10 sections were stained with picosirius-hematoxylin (P/H) (Santamaría et al. 2019). Oocytes were counted using the Olympus BH2 microscope at 400X magnification. The following parameters were analyzed: (a) Total oocytes per square micrometer. (b) Total oocytes per section. (c) Total primordial follicles per square micrometer. (d) Total primordial follicles per section. (e) Percentage of primordial follicles. In order to refer to the oocyte count per area, the areas of each section were obtained and measured as square micrometer using the Image-pro plus 5.0 program.

Primordial follicle diameters

The primordial follicles were counted in the same sections used for the total oocyte count. With the Image-pro plus 5.0 program, the longest diameter (µm) of the oocytes for which nuclei were in the plane of section was determined. The data were analyzed according to previous protocols (Saaticioglu et al. 2016).

Measurement of estradiol, progesterone and testosterone

Prior to the measurement of hormones, an organic extraction was performed using serum pools (200 µl). The pools were made with serum from the F1 female offspring euthanized before the onset of FACB. The pools ($n=7$ control; $n=10$ BP3) were generated from 16 control and 24 BP3 F1 females. The extraction was performed with sulphuric ether and the resulting extracts were reconstituted with 0.5 ml of 0.1% gelatin in PBS-EDTA (Portelinha et al. 2015). The following hormones were measured using the ECLIA-Roche method: a) Estradiol: Estradiol levels were expressed in pg/ml, with a detection limit of 5 pg/ml. (b) Progesterone: Progesterone levels were expressed in ng/ml, with a detection limit of 0.05 ng/ml. (c) Testosterone: Testosterone levels were expressed in ng/ml, with a detection limit of 0.03 ng/ml. All hormone measurements were performed at the Alkemy laboratory in Santa Fe, Argentina, following standardized protocols and quality control procedures.

Statistics

Data were presented as means $\pm$ S.E.M or median. The normal distribution of the data for the FACB calving/ mother and offspring/mother analysis was assessed with the Anderson–Darling test and analyzed with an unpaired t test. With the data of the individual weights, the average of the litter was calculated. Average litter weights were used for the comparison between groups. Weights were analyzed with unpaired t test at each time. For other analyses, where a normal distribution was not obtained, the Mann–Whitney test was used. The software used was GraphPad Prism 9.0.1 and MEDCALC® was used to evaluate proportions (<https://www.medcalc.org/>).

Results

The exposure to BP3 did not alter maternal weight nor the length of gestation

Pregnant female mice treated with BP3 from gd9 to pnd21 exhibited unaltered weight gain during both pregnancy and lactation (Fig. S1). Furthermore, the duration of gestation in BP3-exposed mothers closely resembled that of the control group (Fig. S2), indicating an unaltered gestational time to first litter.

BP3 exposure had no effect on the number of delivered pups or sex ratio of the progeny

The number of pups per litter per dam of BP3-exposed females was very similar to control animals (CONTROL:

7.5 ± 1.26 , BP3: 7.6 ± 1.26). The sex ratio (%females/total) in control F1 offspring was 40%, while in the BP3-exposed group was 50% ($n=73$ CONTROL; $n=76$ BP3). No significant alterations were observed in BP3-exposed offspring regarding to their sex ratios, as analyzed by the N-1 Chi-squared test from the online software MEDCALC®.

The weight gain of the F1 progeny during lactation was transiently altered by the exposure to BP3

We observed a transient decrease in weights during the lactation period of F1 pups born to mothers exposed to BP3. This decrease lasted longer in males than in females: the decrease of F1 females' weight was observed only on pnd15 and pnd18 (Fig. 2a). Males showed a significant diminution in their weight from pnd3 until pnd18 (Fig. 2b). At pnd21, both F1 females and males of BP3 group displayed similar weights to the control F1 offspring.

BP3 exposure did not alter the onset of puberty nor the estrous cycle in F1 females

Ovarian (CONTROL: 6.8 ± 0.8 mg, $n=15$; BP3: 5.6 ± 0.4 mg, $n=20$) and testicular (CONTROL: 104.0 ± 2.4 mg, $n=33$; BP3: 110.5 ± 1.8 mg, $n=25$) weights were not changed by BP3 in F1 offspring. Besides, the day of vaginal opening nor the estrous cycle were modified in BP3-exposed offspring (Table S1): no variations were observed in the number of cycles nor in the time spent in estrus when compared to the control group. These findings suggested that BP3 exposure from gd9 until pnd21 does not have a discernible impact on puberty onset or the regularity of the estrous cycle of F1 females.

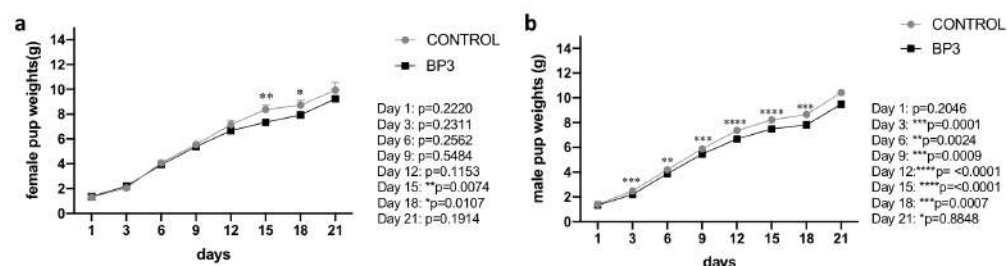


Fig. 2 Weights of F1 offspring born to F0 BP3- and vehicle-exposed dams during lactation: **a** Weight (g) of female offspring ($n=8$ CONTROL; $n=10$ BP3) **b** Weight (g) of male offspring ($n=12$ CONTROL; $n=19$ BP3). With the data of the individual weights, the average of the litter was calculated. Average litter weights were used for

BP3 provoked a diminution in the percentage of primordial follicles in the ovaries of F1 females but no changes in sperm number

The analysis of germ cells populations in the ovaries (Fig. 3) revealed significant differences between BP3 and the control group. At pnd77, previously to the beginning of FACB, total oocytes (Fig. 3a) as well the number (Fig. 3b) and percentage (Fig. 3d) of primordial follicles were decreased in ovaries of F1 female offspring born to mothers exposed to BP3 (Fig. 3b; d). On the contrary, no significant changes were observed in the number (Fig. 3c) and percentage of antral follicles (Fig. 3e). Besides, the oocyte diameter of primordial follicles (Fig. 3f) showed a significant decrease in BP3 when compared to the control group. On the other hand, the motile sperm (CONTROL: $3.5 \times 10^6 \pm 0.6 \times 10^6$; BP3: $3.8 \times 10^6 \pm 0.3 \times 10^6$) and total sperm counts (CONTROL: $6.8 \times 10^6 \pm 0.9 \times 10^6$; BP3: $7.0 \times 10^6 \pm 0.4 \times 10^6$) were similar between the BP3 and control groups ($n=15$ CONTROL, $n=17$ BP3). These findings indicate that, at the time of starting the FACB protocol, the females of the F1 couples exposed to BP3 had a lower oocyte reserve while the males had a normal sperm supply.

Hormone levels were similar between F1 females from both groups

Serum hormone levels were measured in F1 females in the estrous phase of the estrous cycle. Estradiol (Fig. S3a), progesterone (Fig. S3b), and testosterone (Fig. S3c) levels were not altered in mice perinatally exposed to BP3 when compared to the control group. This indicated that BP3 exposure had no noticeable impact on estradiol, testosterone, and progesterone levels at the onset of FACB.

the comparison between groups. Statistical analysis was performed using the Unpaired *t* test, data expressed as mean $\pm$ SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$ vs. control. BP3 benzo-phenone-3

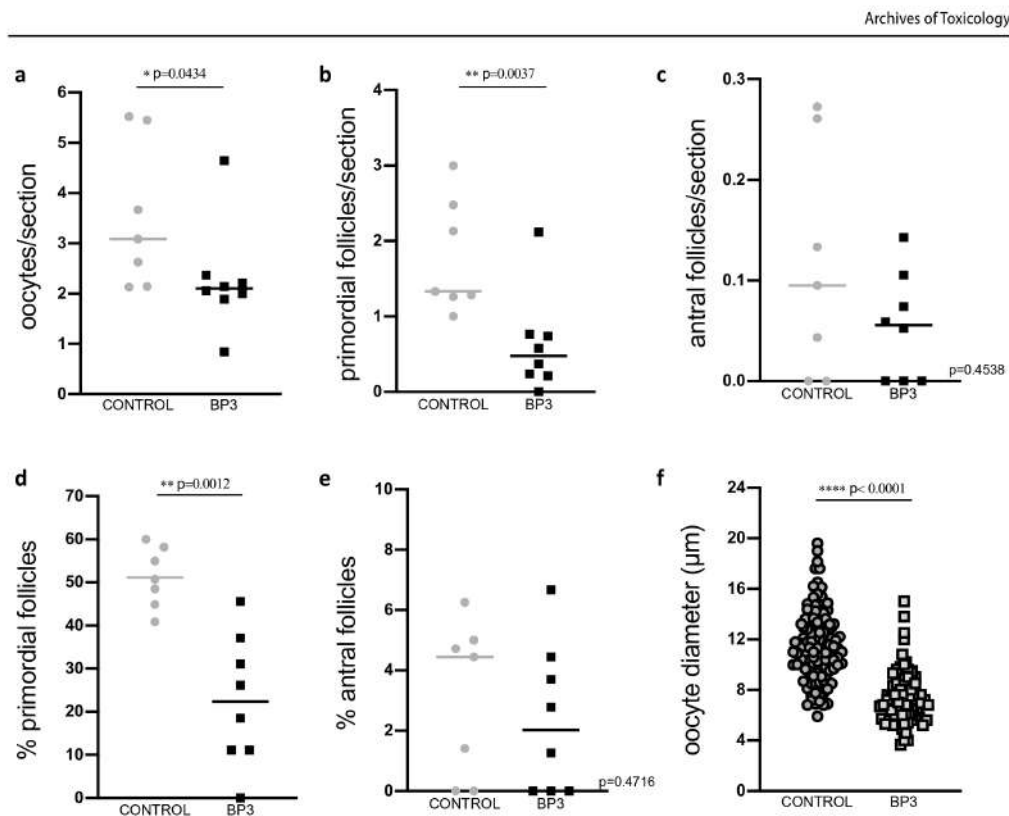


Fig. 3 Analysis of ovarian follicles in BP3-exposed mice before FACB: **a** number of oocytes per section. **b** number of primordial follicles by section. **c** number of antral follicle per section. **d** percentages of primordial follicles. **e** percentages of antral follicles **f** Measurement of primordial follicle diameters. In graphs a, b, and c, the

number of animals evaluated was $n=7$ CONTROL and $n=8$ BP3, while in graphs f, it shows the number of oocytes ($n=113$ CONTROL and $n=75$ BP3). Statistical analysis was performed using the Mann Whitney test, data expressed as median, *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.0001$ vs control. BP3 benzophenone-3

BP3 exposure resulted in a decline of the reproductive capacity of the F1 submitted to a FACB protocol

The implementation of the FACB protocol allowed us to assess the reproductive parameters and outcomes of the mice exposed to the compound of interest over an extended period. This comprehensive evaluation provides valuable insights into the potential effects of the compound on fertility, birth rates, pup characteristics, and overall reproductive health. The FACB study spanned a duration of 6 months, which was divided into 4 periods (P) for analysis. P1 encompassed days 0–46, P2 covered days 47–74, P3 spanned days 77–105, and P4 extended from day 106 to 180. During each period, we analyzed the number of births per mother (Fig. 4a) and the number of offspring

per mother (Fig. 4b). We also analyzed the weights of the delivered F2 pups ($n=47$ CONTROL; $n=39$ BP3) and the sex ratio (%females/total) ($n=174$ CONTROL; $n=224$ BP3). We observed that weights were similar between both groups (CONTROL: 1.38 ± 0.02 mg; BP3: 1.39 ± 0.01 mg) and the sex ratio in control F2 offspring was 48.8%, while in the BP3-exposed group was 53.0%, showing that sex ratio was not altered by BP3. A trend to a decrease in the number of births per mother was observed in the period P3 in the BP3 group. This trend became significant in P4, when F1 born to BP3-exposed moms showed a significant decrease in the number of births, indicating a decline in fertility. Regarding the number of pups per mother, a decrease in P4 was recorded, although it did not reach statistical significance. Notably, in P4, only one out of the ten

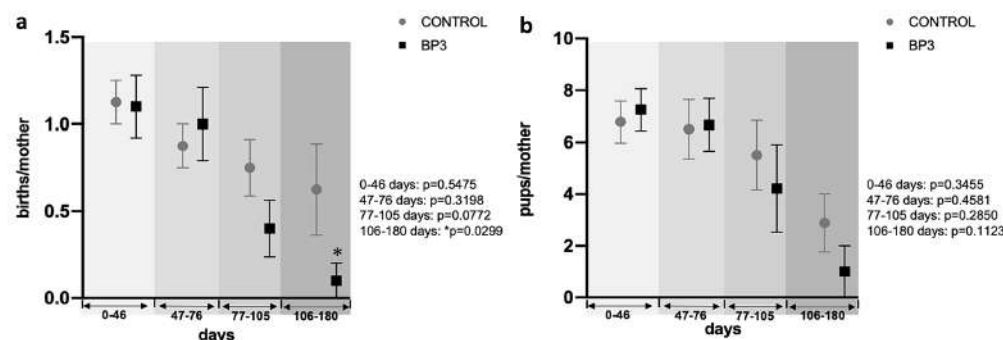


Fig. 4 Number of births and number of offspring born during FACB from F1 mice exposed perinatally to BP3 and controls: **a** Number of offspring per dam ($n=8$ CONTROL, $n=10$ BP3) in FACB with a duration of 6 months analyzed in different periods (P): P1 day 0–46, P2 day 47–76, day P3 77–105 and P4 day 106–180. **b** Number of offspring per dam ($n=8$ CONTROL; $n=10$ BP3) per calving in FACB

with a total duration of 6 months analyzed in different periods: P1 day 0–46, P2 day 47–76, day P3 77–105 and P4 day 106–180. Statistical analysis was performed using the Unpaired t test, data expressed as mean $\pm$ SEM. * $p=0.005$ vs. control. Normal distribution of the data was assessed with the Anderson–Darling test. BP3 benzophenone-3

females of BP3 gave birth (ten pups), while in the control group, four out of eight mothers gave birth.

Discussion

We are continuously exposed to chemicals included in personal care products (PCP) that may affect our health. BP3 is commonly used in sunscreens and other PCP due to its UV blocking efficacy. Several studies have evidenced that BP3 can act as an EDC (Krause et al. 2012; Santamaría et al. 2020; Mustieles et al. 2023). Previously, we have observed that dermal exposure to BP3 during early phases of pregnancy (gd0–gd6) provoked FGR in the mice progeny, showing that first week of gestation is a period sensitive to BP3 applied to the skin. However, increasing evidence added evidenced supporting perinatal period as also a developmental window sensitive to EDCs action (Reynolds and Caton 2012; Padmanabhan et al. 2016). Thus, in the present study, our aim was to identify the effects on reproductive parameters caused by exposure to 50 mg BP-3/kg bw.day of BP-3 or olive oil (vehicle) applied on skin from gd9 to pnd21 (perinatal).

We observed no differences in mother's weights, duration of gestation, number of pups per mother, onset of puberty or sex ratio. The weights of the F1 pups were transiently lower than those of the control during lactation, and estrous cycle was not affected by BP-3. However, F1 females born to BP3-exposed dams submitted to a FACB protocol showed a significant decrease in number of pregnancies. This result demonstrates that BP3 applied on the mother's skin during middle and late gestation plus breastfeeding resulted in a

decline in the fertility of their F1 offspring. Only one of ten females of the F1 female born to-BP3 exposed dams became pregnant in the last period of FACB, in contrast to four of eight in the control group. We also observed a trend to a progressive decline in the number of pups per mother, indicating an accelerated reproductive decline. Our present results contrasts with those previously reported by a study conducted to assess the toxicity of BP3 in Swiss CD-1 mice examining reproductive assessment by continuous breeding (RACB) (Chapin 1997). In this study, mice given up to 9 g/kg.bw of BP3 showed an unaltered fertility index in couples comprised by exposed F1 females and nonexposed young male of proven fertility. This discrepancy with our present results can be explained by some differences in the experimental design. First, we applied a continuous breeding protocol to couples comprised of both male and female from F1 offspring born to BP3-exposed moms (see M&M). We have chosen this scheme to mimics more genuinely the real-world scenario, where practically 97% percent of the population has measurable levels of BP3 in their bodies (Janjua et al. 2008; Santamaría et al. 2019; Matta et al. 2019). Secondly, we used a much lower dose than the lowest one in Chapin's study: 50 mg/kg.bw vs 1800 mg/kg.bw. As usual in the endocrine disruption field, reporting of deleterious effects at the lowest dose and no effect at the highest ones is a frequent finding. Lastly, it allowed us to look for alterations in both female and male reproductive tissues as potential causes of the altered fertility, in concordance with Task 2 of FACB protocol (Lamb et al. 1985). A similar pattern was reported for other estrogenic EDCs such as bisphenol A (BPA) and DES, for which have also been described a decline of fertility in F1 offspring

submitted to forced breeding protocols (McLachlan et al. 1982; Cabaton et al. 2011). Altogether, these studies highlight the need to pinpoint potential causes leading to compromised reproduction of F1 offspring born to mothers perinatally exposed to EDCs.

Our present findings are suggestive of an accelerated reproductive decline. We asked whether germ cell populations could be a target of BP3 in the period before the start of the continuous reproduction protocol. In F1 males born to BP3-exposed moms, we observed values of sperm parameters similar to control F1 males. We also observed that levels of estradiol, progesterone and testosterone were comparable between control and BP3 offspring before the onset of FACB. This result is consistent with previously reported results arising from a study conducted to determine the effects of maternal and lactational exposure to BP3 on organs of offspring, where the authors showed an impaired spermatocyte development in the testes of male offspring in the highest dose group (50,000 ppm equivalent to 50 g/kg.bw) but not in the lowest (1000 ppm equivalent to 1 g/kg.bw) (Nakamura et al. 2015). Regarding ovaries, we found an impoverished stockpile of follicles in the ovaries of F1 females born to BP3-exposed moms, evidenced by a low number of total oocytes as well as a reduced number and percentage of primordial follicles population before the beginning of FACB. Additionally, the oocytes of primordial follicles from F1 females exposed to BP3 had significant smaller size compared to the control F1 females. Based on these findings, the earlier appearance of subfertility in F1 females born to BP3-exposed mothers seemed to be linked to an accelerated decline of the stockpile of oocytes, mainly the primordial follicles population. Beyond the present results, we and others described several effects of BP3 on the ovary. In the same study, Nakamura and colleagues reported that follicular development was delayed by perinatal exposure to the highest dose group of BP3 (50,000 ppm), mainly due to a significantly lower number of antral follicles (Nakamura et al. 2015). Besides, we previously demonstrated that in vitro exposure to BP3 disrupted the establishment of rat's germ cells reservoir, depending on the dose. Using whole ovary cultures, we found that the lowest concentration (the predicted no effect concentration or PNEC, equal to 1.32 µg/L or 5.8 nM) decreased the population of total oocytes together with a lower number of nests per ovary, fewer early primary follicles, and a trend towards a decrease in the amount of primordial and primary follicles (Santamaría et al. 2019). As with other estrogenic EDCs (Jefferson et al. 2006; Rodríguez et al. 2010; Santamaría 2016; Santamaría et al. 2017; Santamaría et al. 2020), our present study supports the ovary as a target of BP3 action.

In the context of DOHaD hypothesis, the analysis of similarities and differences between different exposure schemes to identify vulnerable periods to EDCs becomes

highly relevant. Some developmental repeated-dose toxicity studies reported changes in estrous cyclicity of the F1 offspring only when BP3 was administered in the feed at doses higher than 700 mg/kg bw/day (Chapin 1997). In agreement with these earlier findings showing that only high doses of BP3 may adversely affect estrous cyclicity (Mustieles et al. 2023), we observed no changes in the estrous cyclicity in F1 females born to dermally BP3-exposed moms to a lower dose (50 mg/kg.bw). On the other hand, oral administration of BP3 was associated with a decrease in the body weights of pups only at the highest doses (25,000 and 50,000 ppm) (Nakamura et al. 2015). In the present study, we observed a transient decrease of F1 male and female offspring weights during lactation. We observed a similar pattern of transient decrease when BP3 was administered in early prenatal period (Santamaría et al. 2020). Interesting to note is that BP3 was able to alter milk protein synthesis and expression in a mammary gland in vitro differentiation model, suggesting that poor nutrition during lactation could contribute to transient decreases of pups' weights (Altamirano et al. 2015).

Because of the widely use of BP3 as UV filter in sunscreens and cosmetics, human population is highly exposed to BP3 (Janjua et al. 2008; Matta et al. 2019; Darbre 2022). In this context, the decline of fertility in F1 offspring we observed in the present study becomes relevant because we applied BP3 on skin in levels similar to the quantities applied with a regular use of sunscreens. Furthermore, we previously showed that this dermal dose, after its adsorption, generated serum levels similar or lower to those reported as absorbed to human serum after a whole-body topical application (Janjua et al. 2008; Matta et al. 2019). Interestingly, it was recently published a study addressing whether urinary parabens, BP3, TCS, and BPA were associated with self-reported infertility in US population. They did not find any association when BP-3, TCS and BPA if these chemicals were analyzed individually but, instead, their combined exposures was positively associated with infertility (Arya et al. 2020). However, the knowledge about the impact of BP3 on fetal and neonatal development in humans are still negligible and controversial (Wnuk et al. 2022; Teiri et al. 2023), reinforcing the need for more studies addressing the potential influence of BP3 or mixtures with other compounds on fertility and neonate growth.

Our findings highlight a significant association between dermal exposure to BP3 in perinatal period and early subfertility in F1 offspring submitted to a FACB protocol. The link between subfertility and decreased stockpile of oocytes and primordial follicles together with normal sperm counts in F1 pups alludes that BP3 would be causing an accelerated follicles depletion in the female F1 offspring. In accordance with others, we think that additional studies are needed to improve our understanding of the critical periods

of development during which exposures to UV filters are most detrimental (Bergman et al. 2012; Sutton et al. 2016; Arya et al. 2020; Wnuk et al. 2022). In the meantime, pregnant women and children should look alternative photoprotection strategies such as sunscreens with mineral/inorganic UV filters, protective clothing and avoidance of sun exposure during midday hours.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03730-5>.

Acknowledgements We are very thankful to Mr. Juan Grant and Mr. Agustín García, who oversaw the mouse colonies. We also thank Dr. Stella Vaira from Mathematics Center of FBCB, who critically revised the statistics approach of data. We are very grateful to Dr. Paula Cardona, who critically revised part of the manuscript.

Authors contributions V.G. performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. J.E.A. performed experiments and analyzed data. M.L.Z. critically revised the manuscript and designed the project together with H.A.R. H.A.R. conceived and designed the study, analyzed data, and wrote the manuscript. All authors revised the manuscript in its present form.

Funding This work was funded by grants from ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) Projects PICT 2018-03617 and PICT 2020-08917. VG is a doctoral fellow from ANPCyT. JEA, MLZ and HAR are career Investigators of CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Availability of data and materials All relevant data in this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no actual or potential competing financial interests.

Ethical approval The manuscript does not contain clinical studies or patient data. The experimental protocols were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals issued by the U.S. National Academy of Sciences and approved by the Ethical Committee of the Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Ethics Committee Approval Number: CE2018-61-C).

References

- Altamirano GA, Muñoz-de-Toro M, Luque EH et al (2015) Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to bisphenol A. *Mol Cell Endocrinol* 411:258–267. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.007>
- Arya S, Dwivedi AK, Alvarado L, Kupesic-Plavsic S (2020) Exposure of U.S. population to endocrine disruptive chemicals (parabens, benzophenone-3, bisphenol-A and triclosan) and their associations with female infertility. *Environ Pollut* 265:114763. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114763>
- Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, et al (eds) (2012) State of the science of endocrine disrupting chemicals. World Health Organization
- Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS et al (2011) Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 119:547–552. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002559>
- Chapin R (1997) Reproductive toxicology. 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone. *Environ Health Perspect* 105:313–314. <https://doi.org/10.1289/ehp.105-1470294>
- Dahlen CR, Borowicz PP, Ward AK et al (2021) Programming of embryonic development. *Int J Mol Sci* 22:11668. <https://doi.org/10.3390/ijms222111668>
- Darbre PD (ed) (2022) Front matter. In: *Endocrine disruption and human health* (Second Edition). Academic Press
- Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Fisher JW (2010) Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 247:158–165. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.06.008>
- Janjua N, Kongshoj B, Andersson A-M, Wulf H (2008) Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 22:456–461. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2007.02492.x>
- Jefferson WN, Padilla-Banks E, Newbold RR (2006) Studies of the effects of neonatal exposure to genistein on the developing female reproductive system. *J AOAC Int* 89:1189–1196. <https://doi.org/10.1093/jaoac/89.4.1189>
- Krause M, Klitt A, Blomberg Jensen M et al (2012) Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. *Int J Androl* 35:424–436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01280.x>
- Lamb JC, Jameson CW, Choudhury H, Gulati DK (1985) Fertility assessment by continuous breeding: evaluation of diethylstilbestrol and a comparison of results from two laboratories. *J Am Coll Toxicol* 4:173–184. <https://doi.org/10.3109/10915818509014512>
- Matta MK, Zusterzeel R, Pilli NR et al (2019) Effect of sunscreen application under maximal use conditions on plasma concentration of sunscreen active ingredients: a randomized clinical trial. *JAMA* 321:2082–2091. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.5586>
- Matta MK, Florian J, Zusterzeel R et al (2020) Effect of sunscreen application on plasma concentration of sunscreen active ingredients: a randomized clinical trial. *JAMA* 323:256–267. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.20747>
- McLachlan JA, Newbold RR, Shah HC, Dixon RL (1982) Reduced fertility in female mice exposed transplacentally to diethylstilbestrol (DES). *Fertil Steril* 38:364–371. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)46520-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)46520-9)
- Mustieles V, Balogh RK, Axelstad M et al (2023) Benzophenone-3: Comprehensive review of the toxicological and human evidence with meta-analysis of human biomonitoring studies. *Environ Int* 173:107739. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107739>
- Nair AB, Jacob S (2016) A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 7:27–31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- Nakamura N, Inselman AL, White GA et al (2015) Effects of maternal and lactational exposure to 2-hydroxy-4-methoxybenzone on development and reproductive organs in male and female rat offspring: FETAL EXPOSURE TO HMB AND RAT OFFSPRING. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 104:35–51. <https://doi.org/10.1002/bdrb.21137>
- Padmanabhan V, Cardoso RC, Puttabyatappa M (2016) Developmental programming, a pathway to disease. *Endocrinology* 157:1328–1340. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1003>
- Pagotto R, Santamaria CG, Harreguy MB et al (2020) Perinatal exposure to bisphenol A disturbs the early differentiation of male germ cells. *Reprod Toxicol* 98:117–124. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.09.004>
- Peña-Fernández A, Evans MD, Cooke MS (Eds) (2022) *Toxicology for the health and pharmaceutical sciences*
- Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A et al (2020) The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *J*

- Cereb Blood Flow Metab 40:1769–1777. <https://doi.org/10.1177/0271678X20943823>
- Portelinha TCG, Jahn GA, Hapon MB et al (2015) Hormone Levels and ultrasound evaluation of *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae) ovulation. South Am J Herpetol 10:23–31. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-14-00030.1>
- Ramamoorthy S, Blakely RD (1999) Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. Science 285:763–766. <https://doi.org/10.1126/science.285.5428.763>
- Reynolds LP, Caton JS (2012) Role of the pre- and post-natal environment in developmental programming of health and productivity. Mol Cell Endocrinol 354:54–59. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.013>
- Rodríguez HA, Santambrosio N, Santamaría CG et al (2010) Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. Reprod Toxicol 30:550–557. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.07.008>
- Saatcioglu HD, Cuevas I, Castrillon DH (2016) Control of oocyte reawakening by Kit. PLOS Genet 12:e1006215. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006215>
- Santamaría CG (2016) Efectos de la exposición perinatal a perturbadores endocrinos sobre el desarrollo ovárico y la fertilidad de la hembra [dissertation]. Universidad Nacional del Litoral
- Santamaría C, Durando M, Muñoz de Toro M et al (2016) Ovarian dysfunctions in adult female rat offspring born to mothers perinatally exposed to low doses of bisphenol A. J Steroid Biochem Mol Biol 158:220–230. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.11.016>
- Santamaría CG, Rodríguez HA, Abud JE et al (2017) Impaired ovarian response to exogenous gonadotropins in female rat offspring born to mothers perinatally exposed to bisphenol A. Reprod Toxicol 73:259–268. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.050>
- Santamaría CG, Abud JE, Porporato MM et al (2019) The UV filter benzophenone 3, alters early follicular assembly in rat whole ovary cultures. Toxicol Lett 303:48–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.12.016>
- Santamaría CG, Meyer N, Schumacher A et al (2020) Dermal exposure to the UV filter benzophenone-3 during early pregnancy affects fetal growth and sex ratio of the progeny in mice. Arch Toxicol 94:2847–2859. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02776-5>
- Schlumpf M, Cotton B, Conscience M et al (2001) In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. Environ Health Perspect 109:239–244. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109239>
- Schreurs R, Lanser P, Seinen W, van der Burg B (2002) Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. Arch Toxicol 76:257–261. <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0348-4>
- Schreurs RHMM, Sonneveld E, Jansen JHJ, Seinen W (2005) Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. Toxicol Sci 83:264–272. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi035>
- Sutton EF, Gilmore LA, Dunger DB et al (2016) Developmental programming: State-of-the-science and future directions—summary from a pennington biomedical symposium. Obesity 24:1018–1026. <https://doi.org/10.1002/oby.21487>
- Teiri H, Samaei MR, Dehghani M et al (2023) Maternal exposure to benzophenone derivatives and their impacts on offspring's birth outcomes in a Middle Eastern population. Sci Rep 13:9484. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35380-5>
- Wang J, Ganley CJ (2019) Safety threshold considerations for sunscreen systemic exposure: a simulation study. Clin Pharmacol Ther 105:161–167. <https://doi.org/10.1002/cpt.1178>
- Wnuk W, Michalska K, Krupa A, Pawlak K (2022) Benzophenone-3, a chemical UV-filter in cosmetics: is it really safe for children and pregnant women? Adv Dermatol Allergol Dermatol Allergol 39:26–33. <https://doi.org/10.5114/ada.2022.113617>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Anexo IV: Abud et al., 2024



J.E. Abud et al.

Environmental Pollution 349 (2024) 123840

Abbreviations

BP3	Benzophenone-3
PCPs	Personal care products
EDC	Endocrine-disrupting chemical
AR	Androgen receptor
ER	Estrogen receptor
gd	Gestation day
UECs	Uterine epithelial cells
ICM	Inner cells mass

gland has been indicated also as a target of BP3 adverse effects (Altamirano et al., 2020; LaPlante et al., 2018; Matouskova et al., 2020). Humans are highly exposed to BP3 mainly through the dermal application of sunscreen products that contain it (Matta et al., 2019; Mustieles et al., 2023). BP3 and its metabolite, 2,4-dihydroxybenzophenone, are detectable in plasma and urine between 1 and 4 h after the topical application of different sunscreen creams on the skin (Janjua et al., 2008). Accordingly, BP3 and/or its derivatives were detected in 96.8% of the United States population studied in the period 2003–2004 (Calafat et al., 2008). On the other hand, the US Food and Drug Administration (FDA) recently conducted comprehensive surveys to assess the impact of various UV filters. The results revealed that BP3, administered through different sunscreen formulations, was systemically absorbed, with plasma concentrations exceeding the FDA threshold for potentially waiving some of the additional safety studies for sunscreens (Matta et al., 2020; Matta et al., 2019). Furthermore, these studies provided evidence supporting specific concentrations as relevant thresholds for human population exposure (see M&M). In addition, because BP3 is a moderately lipophilic compound, it can accumulate and remain in the sediments and floating particulate matter of different aquatic ecosystems: rivers, drinking water, and aquatic effluents (Balmer et al., 2005; Cuderman and Heath, 2007; Loraine and Pettigrove, 2006; Stackelberg et al., 2004), as well as bioaccumulates in living organisms affecting both plants, animals and human (Molins-Delgado et al., 2018; Diaz-Cruz et al., 2019; Song et al., 2020; Klancic et al., 2022; Mao et al., 2022).

Recently, we have shown that BP3 alters follicular assembly *in vitro* (Santamaria et al., 2019). More importantly, we found that BP3 causes fetal growth retardation (FGR) in mice when it is dermally administered in the first days of gestation, demonstrating that early exposure to BP3 has detrimental effects on fetal development. We also confirmed that BP3 can cross the placental barrier and persists in amniotic fluid longer than in circulating blood, remaining in direct contact with fetuses in a critical developmental period (Santamaria et al., 2020). However, the underlying mechanisms of action were not established. Thus, we hypothesized that BP3 can exert an adverse action on early critical aspects of embryo development and placentation that could contribute to the FGR phenotype. In the present work, we have tested the action of BP3 using a modified version of a previously developed *in vitro* model of anchoring and implantation of murine blastocysts (Zenclussen et al., 2011) as well as by analyzing the migration ability of the human trophoblast cell line Swan 71 (Kisanga et al., 2019), a critical property of extravillous trophoblasts for remodeling maternal spiral arteries and establishing uteroplacental circulation to support fetal growth (Kisanga et al., 2019). We selected three environmentally relevant concentrations of BP3 to explore its potential effects on embryo morphology, expansion, hatching, and *in vitro* implantation. Additionally, we assessed its impact on trophoblast migration using a scratch wound migration assay.

2. Materials & methods

2.1. Implantation assay of murine blastocysts

2.1.1. Treatment conditions

The stock solution of BP3 (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) 2 mg/mL was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). BP3 concentrations used in our experiments were: a) 2 µg/L (BP3(2)), based in the predicted no effect concentration (PNEC) for aquatic environments (Kim and Choi, 2014), and similar to residual levels of BP3 reported in blood 17 days after the last sunscreen application (Matta et al., 2020); b) 20 µg/L (BP3(20)), similar to the levels of BP3 detected in serum and in amniotic fluid of pregnant mice exposed to BP3 from gestation day (gd) 0 to gd 6 by dermal exposure (Santamaria et al., 2020), and also to the residual levels in skin 10 days after the last UV filter application (Matta et al., 2020); and c) 200 µg/L (BP3(200)), based in plasma concentrations reached by BP3 after a whole body topical application of sunscreens in humans (Janjua et al., 2008), and after 4 days of topical application of BP3-containing sunscreen (Matta et al., 2020). Before each assay, BP3 dilutions were performed in medium A: Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM/F12, Gibco, Buenos Aires, Argentina) containing 15 mM HEPES (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Natocor, Córdoba, Argentina) as well as antibiotic-antimycotic (Gibco). Blastocysts of the control group (Con.) were exposed to the vehicle: medium A with DMSO at 0.01% (0.1 µM).

2.1.2. Animals

For our study ten female and five male C57BL/6J mice (weight range 14–17 g and 7–8 weeks old) were procured from the Centro de Medicina Comparada - ICIVET Litoral (UNL, CONICET, Santa Fe, Argentina). These mice were subsequently housed and maintained within our research facilities. Health assessments were provided by the vendor confirmed the absence of known viral, bacterial, and parasitic pathogens among the mice. The mice had *ad libitum* access to both water and food and were housed in a controlled environment with a constant temperature of 22 ± 2 °C, humidity maintained between 40% and 60% and a 14-h light cycle, spanning from 06:00 to 20:00 h. Animal welfare was assessed throughout by daily monitoring of appearance, behavior, and cage environment. This continuous vigilance allowed us to promptly address any signs of distress or health issues. Experiments commenced after a two-week acclimatization period, during which the mice adapted to their new surroundings. All experiments are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al., 2020). All protocols in this study were designed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals issued by the U.S. National Academy of Sciences and were approved by the Advisory Committee on Ethics and Safety Research of the Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-UNL, Santa Fe, Argentina (CE permit number: 2018-62).

2.1.3. Collection and co-culture of mouse blastocysts and uterine epithelial cells

Blastocysts were cultured for assessment of *in vitro* implantation based on a previously established *in vitro* model of blastocyst hatching, attachment and trophoblast expansion (Zenclussen et al., 2011), where the blastocysts are co-cultured with a monolayer of uterine epithelial cells (UECs) obtained from the same pregnant animal. Briefly, C57BL/6 females were mated with C57BL/6 males and on 3.5-day post coitum (dpc), female mice were euthanized (n = 10). Uterine horns were removed, trimmed from the ovaries and other excess tissues, and placed on sterile Petri dishes with 15 mL of HBSS (Hank's Balanced Salt Solution without Ca^{2+} and Mg^{2+} containing penicillin, streptomycin and Fungizone®) (Gibco). Next, the blastocysts were flushed with medium A in a 24-well plate (Greiner Bio-One, Argentina). The presence of blastocysts was verified under an inverted microscope and immediately placed on an incubator at 37 °C, 5% CO_2 until co-culture with the UECs at the next day. The media used for collection and culture of blastocysts

J.E. Abud et al.

Environmental Pollution 349 (2024) 123840

was medium A, as defined above. Five independent trials (10 female mice) were performed; blastocysts obtained from each pregnant animal were randomly assigned to different treatment groups in each trial.

For obtaining the UECs, after flushing the blastocysts, every uterine horn was cut in sections and incubated with digestion buffer [1 mL of 2.5% trypsin (Sigma-Aldrich) and 1.5 mL of HBSS] during 60 min at 4 °C followed by 60 min at 37 °C, both under agitation. After incubation, 5 mL of medium A was added to stop the digestion and the digested tissue was transferred to a Petri dish. Then, we gently swept the uterine horns with scrapers to detach the UECs. The suspension containing the UECs and tissue debris was recovered and filtered (pore size 70 µm). The resulting suspension with UECs was centrifuged at 300×g for 10 min at room temperature (RT) and the pellet was washed with medium A. After the final washing step, cells were cultured at a density of 50,000 cells/well in 96-well for 24 h until co-culture with blastocysts. The use of animals was kept to an absolute minimum required to achieve statistical significance for validation purposes; a total of 15 mice (10 female and 5 male) were used for the experiments described in this paper.

2.1.4. Exposure of blastocysts to BP3

After 24 h of blastocysts collection, UECs medium A was replaced with 200 µL/well of BP3(2), BP3(20), BP3(200) or vehicle (Con.), prepared as detailed above. Then, the blastocysts randomly assigned to vehicle or BP3 groups, were placed individually into each 96-well plate containing the attached UECs. Blastocysts and UECs were co-cultured for 6 days at 37 °C and CO₂ atmosphere (5%). After 48 h, fresh medium was renewed once.

2.1.5. Assessment of blastocysts morphology

Blastocyst morphology was analyzed microscopically and recorded every 12 h using an inverted phase-contrast microscope (Olympus, magnification: 10 and 20X) and a Nikon Coolpix L20 camera. Pictures were analyzed using the Image-Pro Plus 5.0 program after calibration with Neubauer chamber. Embryo morphology was classified according to the following criteria: blastocyst (embryos with an intact zona pellucida), hatched blastocyst (embryos that protruded partially or completely from the zona pellucida); expanded blastocyst (hatched blastocysts with an increase in diameter compared to the blastocyst or hatched blastocyst stages). The expansion of blastocysts was quantified as the quotient of the blastocysts area at 24 h and the area at time 0 ($A_{T=24h}/A_{T=0h}$), where T:0h correspond to the beginning of the co-culture of the blastocysts and the UECs. Some blastocysts showed a space of variable size between the trophoblast and the zona pellucida or cell fragmentation, and those were referred as degenerated blastocyst, i.e., either unexpanded embryos with a space between the trophoblast and the zona pellucida or embryos with cell fragmentation. At the beginning of the experiment, all blastocysts were surrounded by the zona pellucida, showed a single layer of trophoblast enclosing the cells of inner cells mass (ICM) and a blastocoele cavity. For each blastocyst, the following parameters were established: blastocyst total area (mm²), hatching and implantation time (h), and the implantation area (mm²) at 6th day of culture (144 h).

2.2. Migration ability of human trophoblasts

2.2.1. Trophoblast cell line

Swan 71, an immortalized first trimester human trophoblast cell line, was used throughout this study. The cell line Swan.71 was kindly provided by Dr. Gil Mor, Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, Yale University School of Medicine, USA. The Swan 71 cells were maintained in medium B: DMEM (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (HyClone, Thermo-Fisher, Montevideo, Uruguay), and maintained in 75 cm² culture flasks at 5% CO₂ and 37 °C. For the migration assays, mitotically inactivated Swan 71 cells were used. Mitotic inactivation was induced by incubating cells with 10 µg/mL mitomycin C (Sigma-Aldrich,

Montevideo, Uruguay) in medium B at 5% CO₂ and 37 °C for 2–3 h. After incubation, cells were washed (2–3 times) with Phosphate Buffered Saline (PBS), harvested using 0.05% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) and seeded in 12-well plates at density of 100,000 cells/well in medium C: DMEM without phenol red (Sigma-Aldrich), supplemented with 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 5% charcoal stripped FBS (Sigma-Aldrich) and incubated at 5% CO₂ (37 °C) for 24 h until experimental exposition.

2.2.2. Scratch wound migration assay

The scratch assay is a simple and effective tool used to determine how different conditions affect cell migration (Abbas et al., 2020; Kisanga et al., 2019). A uniform wound was created in a 90% confluent Swan 71 cell monolayer using a sterile 200 µL micropipette tip and washed with PBS twice to remove the detached cells. The medium C of 12-well plates was replaced for 1 mL/well of medium C plus BP3(2), BP3(20) or BP3(200), with and without 1 µM of AR inhibitor Flutamide (Thermo Scientific). Thus, the control group (Con.) was Swan 71 cells exposed to the vehicle (medium C plus 0.1 µM DMSO). The stock solution of Flutamide (Inh.) 276 mg/mL (1 M) was diluted in ethanol (Merck, Buenos Aires, Argentina). The control group (Con.) in the assays with Inh. was Swan 71 cells exposed to the vehicle (medium C plus 0.1 µM DMSO and 0.1 µM ethanol). Cell migration ability was evaluated by measuring the percentage of wound closure area at 0, 6, 18 and 24 h after scratching. The results were expressed as percentage of uncovered area (% UA, uncovered area at 6, 18 or 24 h/uncovered area at 0 h) × 100) after 6, 18 and 24 h. The uncovered areas were determined using Image J software.

2.2.3. RNA isolation, reverse transcription and quantitative real time PCR (RT-qPCR)

The Swan 71 cells were seeded in 6-well plates (density 200,000 cells/well) in medium C with vehicle or different BP3 concentrations with/without addition of Flutamide (1 µM) for 48 h. Total RNA from cultured cells was isolated after treatment using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. To determine whether BP3 may have an effect on gene expression involved in trophoblast survival, migration and invasion capacity, we measured the expression of the following genes: Survivin as an anti-apoptotic marker (Fest et al., 2006); matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and tissue-specific inhibitor of MMP2 (TIMP2), both related to embryo implantation and trophoblast invasion (Wang et al., 2015); DNA methyltransferase 1 (DNMT1), involved in the transcriptional regulation of E-cadherin during the implantation process, as a marker of migration and invasion (Liu et al., 2016; Wang et al., 2015) and Laminin α-4 (LAMA4) that promotes trophoblast cell invasion, migration, and angiogenesis (Shan et al., 2015). An optimized reverse-transcription qRT-PCR protocol (Santamaria et al., 2019) was used to analyze the mRNA relative expression levels of AR and the molecules previously described. Briefly, RNA (1 µg) was reverse transcribed to cDNA using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT) primers (Invitrogen). Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) assays were performed using HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; Bio-Scientifica) and a Step One thermocycler (Applied Biosystem). We selected Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) as the normalization gene for the qRT-PCR assays (Fig. 1 of Supplementary Data). After initial denaturation at 95 °C for 15 min, the reaction mixture was subjected to successive cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 55–60 °C for 15 s, and extension at 72 °C for 15 s. Product purity was confirmed by dissociation curves and random samples were subjected to agarose gel electrophoresis. Controls containing no template DNA were included in all assays, yielding no consistent amplification. All PCR reactions were conducted from three independent cell culture experiments. Significant differences in gene expression ($p < 0.05$) were assessed through the Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test©35 performed by using the Relative Expression

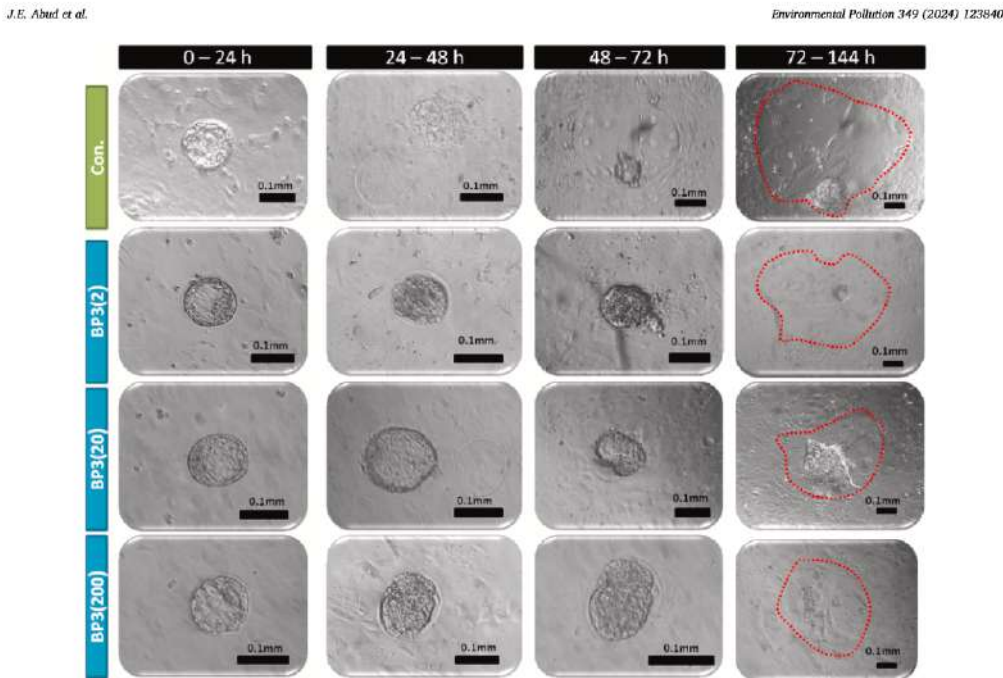


Fig. 1. Representative images of blastocysts (Con. n = 15, BP3(2) n = 14, BP3(20) n = 13 and BP3(200) (n = 15) obtained from 3.5 days-pregnant females and, after 24 h, transferred to the UECs monolayer. Blastocysts morphology, hatching, attachment, trophoblast outgrowth and implantation area (at 6th day) were analyzed microscopically and recorded.

Software Tool REST© 2009 v. 2 (Pfaffl et al., 2002).

2.3. Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM) or mean. The corresponding figure legends indicate the number of samples or experiments performed as well as the statistical test used, and the corresponding p values obtained. $p \leq 0.05$ was considered significant. GraphPad Prism 5.0 was used to perform the statistical analyses.

Hatching and implantation were analyzed using two statistical approaches: at a specific time and during the entire experimental time. For the first analysis, we identified the time at which all the control blastocysts were categorized as hatched or implanted. We then used this time to compare the percentages of hatched or implanted blastocysts in BP3 groups and analyze the differences using Chi-square and Fisher's exact test. For the entire experimental time, a Boltzmann analysis was carried out to model the data (Aguiar et al., 2003) using the following equation:

$$y=A_2+\frac{A_1-A_2}{1+e^{\frac{x-x_0}{\sigma}}}$$

(1)

where x is the independent variable, A_1 and A_2 are the upper and lower limits of the sigmoid, respectively, x_0 is the center of the sigmoid, and σ is directly related to the independent variable range where the abrupt change of the dependent variable occurs. The relation $x+2\sigma$ is a descriptor of the time in which an effect occurs. To analyze the possible difference between the samples, the σ parameter was the estimator used in the test t . The Boltzmann analysis was performed using Origin®

6.

3. Results

3.1. BP3 showed a non-monotonic effect on percentages of degenerated blastocysts

At the beginning of the experiment, all blastocysts were surrounded by the zona pellucida, showed a single layer of trophoblast enclosing the cells of ICM and a blastocoele cavity (Fig. 1). After 24 h of culture, some blastocysts showed a space between the trophoblast and the zona pellucida or cell fragmentation, and those were referred as degenerating blastocysts. Whereas none of the blastocysts of the control group (Con.) showed signs of degeneration, a higher percentage of degenerated blastocysts were observed in groups BP3(2) ($56\% \pm 16$) and BP3(200) ($40\% \pm 12$) from 24 h to 72 h onwards, respectively (see Table 1).

Table 1
Degenerating blastocysts. Percentage of *in vitro* degenerating blastocysts obtained, BP3(2) (n = 14), BP3(20) (n = 13) and BP3(200) (n = 15) groups. Data represents Percentage (%) ± SEM and statistical analysis was performed using Chi-square and Fisher's exact test. * $P < 0.05$.

Degenerating blastocysts	
BP3(2)	56.4% ± 16.3*
BP3(20)	0.0
BP3(200)	39.6% ± 12.3*

J.E. Abud et al.

Environmental Pollution 349 (2024) 123840

3.2. BP3 decreased blastocysts expansion in a non-monotonic way

Blastocysts expansion was observed in all blastocysts of the control group during the first day of culture (Fig. 2). The quotients of the BP3(2) (1.2 ± 0.3) and BP3(200) (1.1 ± 0.3) groups were smaller than the vehicle group (1.7 ± 0.6), indicating a diminished expansion of the blastocysts exposed to the lowest and highest dose of BP3 (Fig. 2). No difference was observed in BP3(20) (1.5 ± 0.3) compared to control group (Con.), demonstrating a non-monotonic effect of BP3 on blastocysts expansion.

3.3. BP3(2) and BP3(200) impaired blastocysts hatching

As was explained in M&M, we performed two statistic approaches to analyze these temporal data. First, we determined that all the control blastocysts were hatched at 36 h and that percentage of hatched blastocysts at 36 h of culture was lower in BP3(2) (46.6 ± 16.6), and BP3(200) (39.9 ± 12.5), with no difference in BP3(20) (91.6 ± 8.3) (Fig. 3 A). Then, we analyzed the entire temporal variation between the groups (Fig. 3 B). The results of the *t*-test on the Boltzmann parameters comparing the BP3 groups with control group showed similar results to the analysis at 36 h, i.e., *p*-values lower than 0.05 for Veh. vs. BP3(2) and 200 and 0.430 for Con. vs. BP3(20). Based on both analyses, we can conclude that hatching was negatively affected by BP3 in a non-monotonic way.

3.4. Effect of BP3 on blastocysts implantation

All blastocysts of the control group ($n = 15$) were attached to the UECs monolayer at 60 h. We observed that the percentage of attached blastocysts at 60 h was significantly lower in BP3(2) (67 ± 14 ; $p < 0.05$), and BP3(200) (47 ± 13 ; $p < 0.05$), with no difference in BP3(20) (79 ± 13). On the other hand, we observed that all blastocysts of BP3(20) ($n = 13$) completed the attachment/implantation to UEC at 72 h, whereas a percentage of blastocysts were not able to complete the implantation even after 120 h in both BP3(2) ($n = 14$) and BP3(200) ($n = 15$), (Fig. 4 A). The evaluation of these temporal patterns by Boltzmann analysis showed that the attachment to the UECs monolayer was significantly delayed ($p < 0.05$) in the three BP3 groups (Fig. 4 B).

Moreover, at the end of the experiment (144 h), the implantation

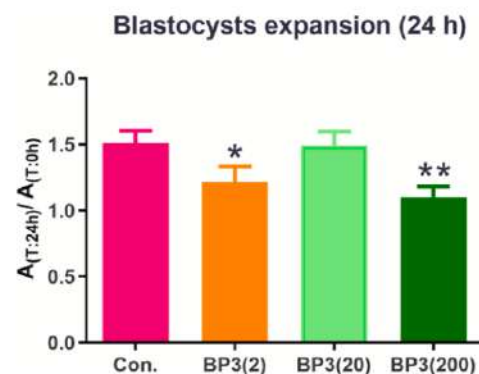


Fig. 2. The effect of BP3 on the expansion of the blastocysts at 24 h of culture. (Con.: $N = 15$, BP3(2): $N = 14$, BP3(20) = 13 and BP3(200) = 15). Data represents mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. * $P < 0.05$. ** $P < 0.005$.

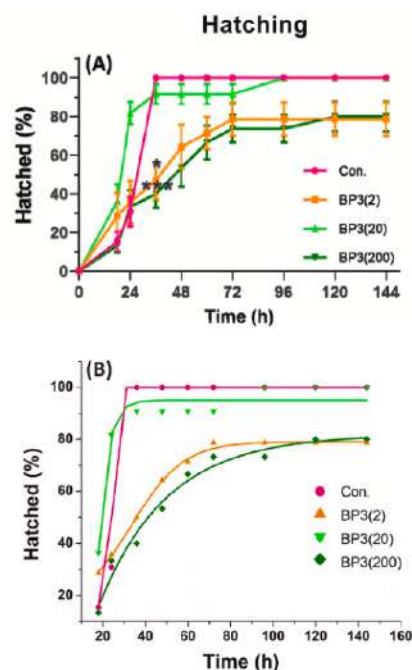


Fig. 3. (A) Percentage of *in vitro* hatched blastocysts obtained for Con. ($n = 15$), BP3(2) ($n = 14$), BP3(20) ($n = 13$) and BP3(200) ($n = 15$) groups, which were analyzed every 12 h. Data represents mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed using Chi-square and Fisher's exact test. * $P < 0.01$. *** $P < 0.001$. (B) Fitting of the percentage of *in vitro* hatched blastocysts obtained for Con. ($n = 15$), BP3(2) ($n = 14$), BP3(20) ($n = 13$) and BP3(200) ($n = 15$) groups, which were analyzed every 12 h using the Boltzmann model.

area was smaller in BP3(2) ($0.32 \pm 0.07 \text{ mm}^2$); BP3(20) ($0.30 \pm 0.08 \text{ mm}^2$) and BP3(200) ($0.25 \pm 0.06 \text{ mm}^2$) in comparison to the control ($0.42 \pm 0.07 \text{ mm}^2$), (Fig. 5).

3.5. Effect of BP3 on migration of the trophoblast cells

We next evaluated the BP3 effect on trophoblast cell line migration using a scratch assay. Interestingly, the lowest dose of BP3 displayed a higher uncovered area (UA) at 6 h when compared to the control, whereas a higher UA of the wound was observed for the three BP3 concentrations at 18 and 24 h of exposure (Fig. 6, and Fig. 2 in Supplementary Data). These results support the conclusion that BP3 is able to reduce the migration of Swan 71 cells. Besides, we observed that BP3 augmented the expression of AR mRNA levels in all assayed concentrations, whereas *TIMP2* and *LAMA4* were increased only in the BP3(2) group (Fig. 3 in Supplementary Data). ER mRNA was undetectable (results not shown). In order to confirm whether BP3 acts via an AR-dependent pathway, we analyzed if BP3 effects persisted or were reversed in the presence of flutamide, an AR inhibitor (Inh.). Our results showed that the UA of wound was similar between the BP3 groups and the control group, when in the presence of flutamide. This clearly indicates that BP3 exerted its effect on the migration of Swan 71 cells through an AR-dependent pathway (Fig. 6). The mRNA expression of

J.E. Abud et al.

Environmental Pollution 349 (2024) 123840

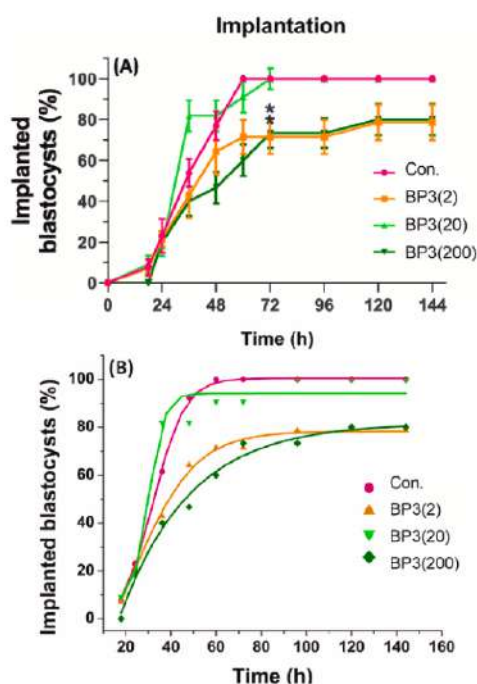


Fig. 4. (A) The percentage of *in vitro* attached blastocysts obtained for Con. (n = 15), BP3(2) (n = 14), BP3(20) (n = 13) and BP3(200) (n = 15), which were analyzed every 12 h. Data represents mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed using Chi-square and Fisher's exact test. *P < 0.05. (B): Fitting of the percentage of *in vitro* attached blastocysts obtained for Con. (n = 15), BP3(2) (n = 14), BP3(20) (n = 13) and BP3(200) (n = 15), which were analyzed every 12 h using the Boltzmann model.

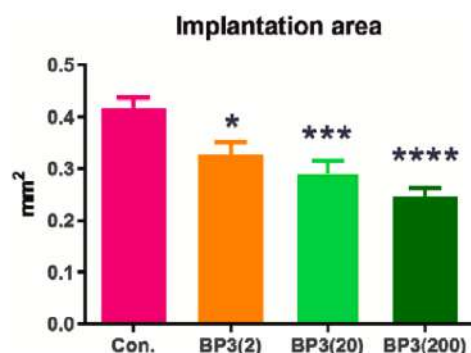


Fig. 5. The effect of BP3 on the implantation area of the blastocysts at 144 h of culture. Blastocysts examined per treatment: Con. = 15, BP3(2) = 14, BP3(20) = 13 and BP3(200) = 15. Data represents mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Tukey's multiple comparisons test. *P < 0.05; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

AR, TIMP2 and LAMA4 were also restored when flutamide was added to the culture medium (Fig. 3 in Supplementary Data). Altogether, these results demonstrate that relevant doses of BP3 are able to disrupt the migration ability of the trophoblast cell line Swan 71 via an AR-dependent pathway.

4. Discussion

The *in vitro* model of blastocyst attachment, as described by Zenciusen et al. (2011), serves as a valuable tool to assess alterations in the timing of anchorage, implantation, and variations in the implantation area induced by different substances. We observed a noteworthy non-monotonic dose-response (NMDR) to BP3 in blastocyst expansion and the percentage of degenerating embryos, particularly evident with BP3(2) and BP3(200) concentrations. Furthermore, all three concentrations of BP3 (BP3(2), BP3(20), and BP3(200)) resulted in delayed hatching and embryo implantation with a subsequent lower implantation area with all BP3-treated blastocysts. These findings collectively offer compelling *in vitro* evidence that BP3 significantly impacts early developmental stages, aligning with previous reports (Jin et al., 2020). Importantly, our *in vitro* results underscore the broad-reaching impact of BP3, indicating that *in vitro* embryo development and the subsequent implantation potential of the blastocyst stage are sensitive to BP3 across a wide range of concentrations. This toxicity across a broad range of concentrations becomes even more relevant when considering recent findings indicating that the human population is exposed to such a spectrum of concentrations. Recently, Matta and colleagues conducted sequential surveys to assess various UV filters, including BP3 (Matta et al., 2020; Matta et al., 2019), following FDA guidance. The FDA recommends that sunscreen active ingredients demonstrating systemic absorption greater than 0.5 ng/mL should undergo nonclinical toxicology assessments, including additional developmental and reproductive studies. The initial study represented maximal usage, with applications at least every 2 h (Matta et al., 2019), while the subsequent follow-up study provided further insights into systemic exposure (Matta et al., 2020). This encompassed residual skin amounts during the wash-out phase and plasma concentrations up to 17 days post-application. Systemic exposure of all tested ingredients surpassed 0.5 ng/mL after a single application, persisting above this threshold for up to 23 h. Notably, BP3 exhibited the highest blood levels post-application, reaching a maximum plasma concentration of 94.2 ng/mL for lotion on day 1. Throughout the study, BP3 levels peaked at 258.1 ng/mL. Additionally, BP3 remained above 0.5 ng/mL in more than 50% of participants for up to 21 days, with values of 5.1 ng/mL at day 14 and 1.3 ng/mL at day 21 (10 and 17 days after the last sunscreen lotion application). Remarkably, very high levels of BP3 persisted in the skin at days 7 and 14. The findings from Matta and colleagues underscore that human exposure to BP3 spans a broad spectrum of concentrations, akin to those utilized in our present study, where we established their potential to adversely affect embryonic development. This correlation emphasizes the relevance of present findings to real-world scenarios and underscores the need for further research to comprehend the impact of systemic exposure to BP3-containing products.

As we stated above, our previous findings about the negative impact of BP3 in fetal growth prompted the question about the mechanisms leading to this phenotype. Because uterine spiral artery (uSA) remodeling is a milestone in pregnancy, as it conditions the blood flow from the mother to the fetus, FGR is thought to be a consequence of impaired uSA remodeling (Lyall et al., 2013). One cell type highly relevant for uSA remodeling is trophoblasts. Trophoblasts need to migrate and replace endothelial cells of the uSAs (Whitley and Cartwright, 2010). Trophoblasts are possible targets of BP3 as they express hormone receptors and are sensitive to hormones as many *in vitro* studies confirmed (Jensen et al., 2010). Therefore, we proceeded to evaluate if BP3 can affect the migration capacity of trophoblasts performing scratch assay

J.E. Abud et al.

Environmental Pollution 349 (2024) 123840

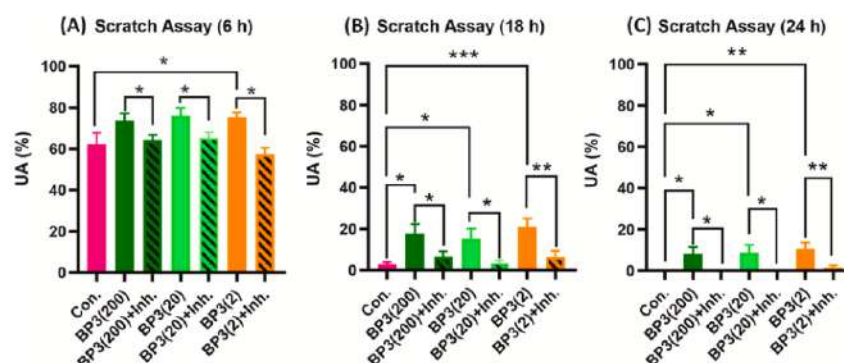


Fig. 6. BP3 effects with and without an AR inhibitor (Flutamide, 1 μ M) on the migration ability of Swan 71 trophoblasts after 6 h (A), 18 h (B) and 24 h (C). The results are presented as percentage of uncovered area (% UA) at the analyzed time. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis were performed using the Kruskal-Wallis test followed by Mann Whitney U test. *P < 0.05, **P < 0.01.

with Swan 71 cells. In this assay, a gap is created by 'scratching' a monolayer of cells, and the migration rate is determined (Abbas et al., 2020; Kisanga et al., 2019; Liang et al., 2007). We found that BP3 impaired the ability of trophoblasts to cover the injured area in the scratch assay (Fig. 6). On the other hand, we found that AR mRNA levels were increased by the three concentrations of BP3 assayed. When flutamide, an inhibitor of AR, was added to the media, the migration capacity of the trophoblast cells was restored. We have thus demonstrated that trophoblasts are targets of BP3 action through the AR pathway, resulting in a diminished migration capacity upon exposure to BP3. On the other hand, it has been recently reported that human trophoblast organoids exposed to DHT (dihydrotestosterone) exhibited a reduction in trophoblast differentiation and invasion capacity, an effect that was also mitigated by flutamide (Haojiang et al., 2023). Consequently, it appears that BP3 exerts a comparable effect to DHT, at least in terms of trophoblast migration ability. Intriguingly, the same report indicated that embryos from pregnant mice exposed to DHT were smaller, and notably, when mothers were co-exposed to DHT and flutamide, embryo size resembled that of controls (Haojiang et al., 2023). In a prior study, we demonstrated BP3-induced FGR in pregnant mice exposed to BP3 via the dermal route during early prenatal stages (Santamaria et al., 2020). Considering these results in combination with the gene expression analysis showing altered expression of *TIMP2* and *LAMA4* when exposed to BP3, we consider that BP3 may have an impact on the invasion capacity of trophoblasts. However, additional experiments should be performed to confirm this hypothesis.

5. Conclusions

In summary, our investigation revealed that blastocysts exposed to BP3 exhibited a temporary delay of in the attachment reaction, resulting in discernible differences in subsequent postimplantation development in an *in vitro* implantation assay. We also found that BP3 reduced the migration ability of trophoblasts acting through an AR-dependent pathway. The potential of BP3 to act as an androgen agonist in certain instances, in addition to its well-established antiandrogenic effects, raises an intriguing question that warrants further experimentation. Our study not only provides insights into the toxic effects of BP3, a UV filter of worldwide use, but also identifies potential mechanisms underlying BP3-induced anomalies in critical events of implantation, early embryo development, and placentation, providing insights into the potential mechanisms causing the toxic effects of BP3 on fetal growth. These findings contribute valuable evidence for future considerations of safety

threshold associated with BP3.

Ethical approval

The experimental protocols were designed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals issued by the U.S. National Academy of Sciences and approved by the Ethical Committee of the Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB-UNL, Santa Fe, Argentina; code CE, 2018-62).

Ethical funding

This work was funded by grants from ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) Projects PICT 2018-03617 and PICT 2020-08917. VG is a doctoral fellow from ANPCyT. JEA, MLZ, CT, MJC and HAR are career Investigators of CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

CRediT authorship contribution statement

Julian Elias Abud: Writing – original draft, Methodology, Investigation. Romina Pagotto: Validation, Supervision, Methodology. Valentina Galliani: Methodology, Data curation. Carla Teglia: Methodology, Formal analysis. Julia Culzoni: Methodology, Formal analysis. Mariela Bollati-Fogolin: Writing – original draft, Supervision, Formal analysis. Maria Laura Zenclussen: Writing – original draft, Supervision, Conceptualization. Horacio Adolfo Rodriguez: Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

J.E. Abud et al.

Environmental Pollution 349 (2024) 123840

Acknowledgements

We are very thankful to Mr. Juan Grant and Mr. Agustín García, who oversaw the mouse colonies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123840>.

References

- Abbas, Y., Turco, M.Y., Burton, G.J., Moffett, A., 2020. Investigation of human trophoblast invasion in vitro. *Hum. Reprod. Update* 26, 501–513.
- Aguiar, J., C. P., Molina-Salvador, J.A., Carrero Ruiz, C., 2003. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *J. Colloid Interface Sci.* 258, 116–122.
- Altamirano, G.A., Gomez, A.L., Schlerano-Marutti, G., Munoz-de-Toro, M., Rodriguez, H. A., Kass, L., 2020. Bisphenol A and benzophenone-3 exposure alters milk protein expression and its transcriptional regulation during functional differentiation of the mammary gland in vitro. *Environ. Res.* 191, 110185.
- Balmer, M.E., Buser, H.R., Muller, M.D., Polger, T., 2005. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 39, 953–962.
- Calafat, A.M., Wong, L.Y., Ye, X., Reidy, J.A., Needham, L.L., 2008. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination survey 2003–2004. *Environ. Health Perspect.* 116, 893–897.
- Cudemán, P., Heath, E., 2007. Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1343–1350.
- Díaz-Cruz, M.S., Molins-Delgado, D., Serra-Roig, M.P., Kalogianni, E., Skoulidakis, N.T., Barceló, D., 2019. Personal care products reconnaissance in EVROTAS river (Greece): water-sediment partition and bioaccumulation in fish. *Sci. Total Environ.* 651 (Pt 2), 3079–3089, 2019.
- Emonet, S., Pasche-Koo, F., Petit-Minissini, M.J., Hauser, C., 2001. Anaphylaxis to oxybenzone, a frequent constituent of sunscreens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 556–557.
- Fediuk, D.J., Wang, T., Chen, Y., Parkinson, F.E., Namaka, M.P., Simons, K.J., Burczynski, F.J., Gu, X., 2012. Metabolic disposition of the insect repellent DEET and the sunscreen oxybenzone following intravenous and skin administration in rats. *Int. J. Toxicol.* 31, 467–476.
- Fest, S., Brachwitz, N., Schumacher, A., Zenciusen, M.L., Khan, F., Wafu, P.O., Casalis, P.A., Pill, S., Costa, S.D., Mor, G., Volk, H.D., Lode, H.N., Zenciusen, A.C., 2008. Supporting the hypothesis of pregnancy as a tumor survivor is upregulated in normal pregnant mice and participates in human trophoblast proliferation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59, 75–83.
- Hanjiang, L., Hong, J., Congru, L., Emilie, D., Allen, Z., Gustaw, E., Eva, L., Han-Pin, P., Sanjiv, R., Yu, P., Theresa, M., Claes, O., Anna, B., Sandra, H., Elisabet, S.V., Qianlin, D., 2023. Dissecting the impact of maternal androgen exposure on offspring health through targeting the androgen receptor in developmental Programming. *bioRxiv Preprint server For Biology*.
- Janjua, N.R., Kongsjot, B., Andersson, A.M., Wulf, H.C., 2008. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* 22, 456–461.
- Jensen, F., Wondolowski, M., Teles, A., Woldacki, K., Tazan, F., Costa, S., Malfertheiner, S.F., Zenciusen, A.C., 2010. Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degradation. *PLoS One* 5, e14409.
- Jin, L., Zhu, H.Y., Kang, X.J., Lin, L.P., Zhang, P.Y., Tan, T., Yu, Y., Fan, Y., 2020. Melatonin protects against oxybenzone-induced deterioration of mouse oocytes during maturation. *Aging* 13, 2727–2749.
- Kariagina, A., Morozova, E., Hoshyar, R., Aupperlee, M.D., Borin, M.A., Haslam, S.Z., Schwartz, R.C., 2020. Benzophenone-3 promotion of mammary tumorigenesis is diet dependent. *Oncotarget* 11, 4465–4478.
- Kim, S., Choi, K., 2014. Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review. *Environ. Int.* 70, 143–157.
- Kitsanga, E.P., Tang, Z., Guiler, S., Whirledge, S., 2019. In vitro assays to evaluate the migration, invasion, and proliferation of immortalized human first-trimester trophoblast cell lines. *J. Vit. Exp.*
- Klancic, V., Gobec, M., Jakopin, Z., 2022. Environmental contamination status with common ingredients of household and personal care products exhibiting endocrine-disrupting potential. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 29, 73648–73674.
- Krzyżanowski, W., Ponierzy, B., Starek-Szuchowicz, B., Bronkowska, Z., Strach, B., Budziszewska, B., 2018. The effects of benzophenone-3 on apoptosis and the expression of sex hormone receptors in the frontal cortex and hippocampus of rats. *Toxicol. Lett.* 256, 63–72.
- LaPlante, C.D., Bansal, R., Dunphy, K.A., Jerry, D.J., Vandenberg, L.N., 2018. Oxybenzone alters mammary gland morphology in mice exposed during pregnancy and lactation. *Journal of the Endocrine Society* 2, 903–921.
- Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L., 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* 2, 329–333.
- Liu, L., Wang, Y., Shen, C., He, J., Liu, X., Ding, Y., Gao, R., Chen, X., 2016. Benzo(a) pyrene inhibits migration and invasion of extravillous trophoblast HTR-8/SVneo cells via activation of the ERK and JNK pathway. *J. Appl. Toxicol. : J. Anal. Toxicol.* 36, 946–955.
- Loraine, G.A., Pettigrove, M.E., 2006. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. *Environ. Sci. Technol.* 40, 687–695.
- Lyall, F., Robson, S.C., Bulmer, J.N., 2013. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. *Hypertension* 62, 1046–1054.
- Majhi, P.D., Sharma, A., Roberts, A.L., Daniele, E., Mojewski, A.H., Chuong, L.M., Black, A.L., Vandenberg, L.N., Schneider, S.S., Dunphy, K.A., Jerry, D.J., 2020. Effects of benzophenone-3 and Propylparaben on estrogen receptor-dependent R-loops and DNA Damage in breast epithelial cells and mice. *Environ. Health Perspect.* 128, 17002.
- Mao, J.F., Li, W., Ong, C.N., He, Y., Jong, M.C., Gin, K.Y.M., 2022. Assessment of human exposure to benzophenone-type UV filters: a review. *Environ. Int.* 167, 107405, 2022.
- Matousova, K., Jerry, D.J., Vandenberg, L.N., 2020. Exposure to low doses of oxybenzone during perinatal development alters mammary gland morphology in male and female mice. *Reprod. Toxicol.* 92, 66–77.
- Matta, M.K., Zusterzeel, R., Pill, N.R., Patel, V., Volpe, D.A., Florian, J., Oh, L., Bashaw, E., Zineh, I., Sanabria, C., Kemp, S., Godfrey, A., Adah, S., Coelho, S., Wang, J., Furlong, L.A., Ganley, C., Michele, T., Strauss, D.G., 2019. Effect of sunscreen application under maximal use conditions on plasma concentration of sunscreen active ingredients: a randomized clinical trial. *JAMA* 321, 2082–2091.
- Matta, M.K., Florian, J., Zusterzeel, R., Pill, N.R., Patel, V., Volpe, D.A., Yang, Y., Oh, L., Bashaw, E., Zineh, I., Sanabria, C., Kemp, S., Godfrey, A., Adah, S., Coelho, S., Wang, J., Furlong, L.A., Ganley, C., Michele, T., Strauss, D.G., 2020. Effect of sunscreen application on plasma concentration of sunscreen active ingredients: a randomized clinical trial. *JAMA* 323, 256–267.
- Molins-Delgado, D., Olmo-Campos, M.D.M., Valeta-Juan, G., Pleguez-Hernández, V., Barceló, D., Díaz-Cruz, M.S., 2018. Determination of UV filters in human breast milk using turbulent flow chromatography and babies' daily intake estimation. *Environ. Res.* 161, 532–539, 2018.
- Mustieles, V., Balogh, R.K., Axelstad, M., Montazeri, P., Marquardt, S., Vrijheid, M., Draskou, M.K., Taxvig, C., Peinado, F.M., Berman, T., Frederiksen, H., Fernandez, M. F., Marie Vinggaard, A., Andersson, A.M., 2023. Benzophenone-3: comprehensive review of the toxicological and human evidence with meta-analysis of human biomonitoring studies. *Environ. Int.* 173, 107739.
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holtgate, S.T., Howells, D.W., Karp, N.A., Laric, S.E., Lüscher, K., MacCallum, C.J., Macleod, M., Peart, E.J., Petersen, O.H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E.S., Silberberg, S.D., Steckler, T., Wurbel, H., 2020. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 18, e3000410.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36.
- Sanmaria, C.G., Abud, J.E., Porporato, M.M., Meyer, N., Zenciusen, A.C., Kass, L., Rodriguez, H.A., 2019. The UV filter benzophenone-3 alters early follicular assembly in rat whole ovary cultures. *Toxicol. Lett.* 303, 48–54.
- Sanmaria, C.G., Meyer, N., Schumacher, A., Zenciusen, M.L., Teglia, C.M., Culzoni, M. J., Zenciusen, A.C., Rodriguez, H.A., 2020. Dermal exposure to the UV filter benzophenone-3 during early pregnancy affects fetal growth and sex ratio of the progeny in mice. *Arch. Toxicol.* 94, 2847–2859.
- Schlecht, C., Klammer, H., Jarry, H., Wuttke, W., 2004. Effects of estradiol, benzophenone-2 and benzophenone-3 on the expression pattern of the estrogen receptors (ER) alpha and beta, the estrogen receptor-related receptor 1 (ERR1) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult ovariectomized rats. *Toxicology* 205, 123–130.
- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W., 2001. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ. Health Perspect.* 109, 239–244.
- Shan, X., Zhang, X., Xiao, X., Zhang, H., Tong, C., Luo, X., Chen, Y., Liu, X., Yin, N., Deng, Q., Qi, H., 2015. Laminin alpha4 (LAMA4) expression promotes trophoblast cell invasion, migration, and angiogenesis, and is lowered in preeclamptic placentas. *Placenta* 36, 809–820.
- Song, S., He, Y., Huang, Y., et al., 2020. Occurrence and transfer of benzophenone-type ultraviolet filters from the pregnant women to fetuses. *Sci. Total Environ.* 726, 138503, 2020.
- Stackelberg, P.E., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Henderson, A.K., Reissman, D. B., 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Sci. Total Environ.* 329, 99–113.
- Wang, Z.Y., Lai, J., Zhang, Y.Z., Zhang, M., Lin, T., Qu, X.L., 2015. Effect of Bisphenol A on invasion ability of human trophoblastic cell line BeWo. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 14355–14364.
- Whitley, G.S., Cartwright, J.E., 2010. Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta* 31, 465–474.
- Zenciusen, M.L., Casalis, P.A., El-Moussleh, T., Rebelo, S., Langwich, S., Linke, N., Volk, H.D., Fest, S., Soares, M.P., Zenciusen, A.C., 2011. Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *J. Pathol.* 225, 293–304.

Anexo V: Galliani et al., 2025



Benzophenone-3 (BP3), bisphenol A (BPA), and their combination impair ovarian response to gonadotropin stimulation in a multi-exposure multiparity model.

Valentina Galliani^{a,b}, Joana Fessia^a, Clarisa Guillermina Santamaría^a, Julián Elías Abud^{a,b}, Horacio Adolfo Rodríguez^{a,b,*}

^a Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), Universidad Nacional del Litoral (UNL) – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Santa Fe, Argentina

^b Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Benzophenone-3
Bisphenol A
Endocrine-disrupting chemicals
Ovarian response
Gonadotropin stimulation
Multiparity model

ABSTRACT

Despite prevailing evidence that endocrine-disrupting chemicals (EDCs) may exert effects across multiple pregnancies, most studies focus on the first pregnancy. Using a multiparity murine model, we evaluated the effects of benzophenone-3 (BP3), bisphenol-A (BPA) or the combination (BP3 + BPA) exposure over two gestational periods (P1 and P2) on pregnancy outcomes and the gonadal function in female offspring from each pregnancy. While maternal weight, litter size, and sex ratio were unaffected, gestation length was altered in BPA and BP3 + BPA groups both in P1 and P2. Ovulation was affected in P2 offspring in all EDC exposed groups. Notably, antral follicle numbers were reduced in all exposed groups, while BPA and BP3 + BPA exposure diminished the primordial follicle reserve in P2 offspring. Estradiol levels were elevated in P2 offspring in the BP3 + BPA group with hCG stimulation. These findings highlight the importance of considering cumulative exposure and exposure to combinations of BP3 and BPA when assessing the long-term reproductive effects of EDCs.

1. Introduction

Endocrine disruptors are chemical compounds that interfere with the normal functioning of the hormonal system, potentially leading to a variety of diseases. These disruptions can have significant impacts on human and animal health, including adverse effects on the reproductive system, increased risk of cancer and hypothyroidism, metabolic disorders such as obesity, and even neurological problems (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Gore et al., 2015; Ullah et al., 2023). Notably, recent studies have identified personal care products (PCPs) as a source of several endocrine disruptor chemicals (EDCs), particularly those designed for dermal application, which often stay in prolonged contact with the skin (Matta et al., 2020; Darbre, 2021).

Two EDCs commonly present in PCPs are benzophenone-3 (BP3) and bisphenol-A (BPA). BP3 is a UV filter widely used for sunburn and skin cancer prevention (Mustieles et al., 2023; Wnuk et al., 2022). BPA, is a ubiquitous chemical widely used in the production of plastics and resins, commonly found in everyday products such as cosmetic packaging and the inner lining of cans (Hoekstra and Simonene, 2013; Michalowicz, 2014). This widespread exposure makes understanding the potential health risks of BP3 and BPA a key research priority.

Our group has previously evidenced that the gonads are sensitive targets of BP3 and BPA action. Perinatal exposure to BPA (50 µg/kg per day) has been shown to alter ovarian physiology in offspring, altering their response to exogenous gonadotropin treatment later in life (Santamaría et al., 2017). Additionally, we found that BP3 can affect

Abbreviations: ACTB, β -actin; AFC, antral follicle count; BP3, benzophenone-3; BPA, bisphenol-A; Cyp11a, cytochrome P450sc; Cyp17a, 17 α -hydroxylase; Cyp19, P450aromatase; E, estradiol; EDCs, endocrine disruptor chemicals; F1, first generation; FSHr, follicle stimulating hormone receptor; Gd, gestational day; HCG, human chorionic gonadotropin; HK, housekeeping; IVF, in vitro fertilization; Kg.bw.d, kg of body weight per day; L19, ribosomal Protein L19; LHR, luteinizing hormone receptor; MDA, micropipette-guided drug administration; OR, ovarian reserve; P/H, picrosirius-hematoxylin; P1, first pregnancy; P2, second pregnancy; Pg, progesterone; PMSG, pregnant mare serum gonadotropin; Pnd, postnatal day; RT-qPCR, quantitative real-time PCR; T, testosterone; TDI, tolerable daily intake.

* Corresponding author at: Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL, UNL-CONICET), Cátedra de Fisiología Humana, FBCB, UNL, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, Casilla de Correo 242, (3000), Santa Fe, Argentina.

E-mail address: harodrig@fbcb.unl.edu.ar (H.A. Rodríguez).

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104821>

Received 18 January 2025; Received in revised form 8 September 2025; Accepted 14 September 2025

Available online 15 September 2025

1382-6689/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

V. Galliani et al.

Environmental Toxicology and Pharmacology 119 (2025) 104821

follicular development in vitro during early stages (Santamaría et al., 2019) and reduces the oocyte pool in female offspring, at a dose of 50 mg/kg per day, leading to subfertility in adulthood (Galliani et al., 2024). However, despite these findings, key questions remain unanswered. It is unclear whether exposure to a lower, more environmentally relevant dose of BPA, may still impact ovarian physiology. The European Food Safety Authority (EFSA) established a temporary tolerable daily intake (t-TDI) of 4 µg/kg body weight/day in 2015. In 2023, based on new immunotoxicological evidence, EFSA recommended a drastic reduction of this threshold to 0.2 ng/kg bw/day, which was formally adopted in Regulation (EU) 2024/3190 (EFSA Panel on Food Contact Materials et al., 2023) and came into force in January 2025 (European Commission, 2024). Importantly, transitional periods defined in the regulation allow continued BPA exposure from previously approved materials until 2026–2028, depending on the product type. Similarly, BP3's potential to alter ovarian response to gonadotropin treatment and the effects of combined BP3 and BPA are yet to be explored. Furthermore, most research has focused on the outcomes of a single pregnancy, even though growing evidence suggests that reproductive and endocrine parameters may be modulated not only by exposure to EDCs but also by the number of pregnancies itself. Repeated pregnancies can alter the organism's physiological response to subsequent exposures (Bridges, 2015), potentially modifying susceptibility to EDCs. This differential sensitivity may arise from physiological adaptations induced by multiparity, including changes in ovarian reserve, metabolic state, and hypothalamic-pituitary-gonadal axis sensitivity (Merrill et al., 2021; Moon et al., 2023; Rebholz et al., 2012; Vicente et al., 2022). Therefore, assessing the effects across two pregnancies provides a more integrative perspective on cumulative risks associated with parity, a biologically relevant context often overlooked in endocrine disruption studies. In this context, it is important to consider in women with multiple pregnancies the cumulative impact of such exposures.

This study investigates the effects of prenatal exposure to BP3, BPA, and their mixture (BP3+BPA) on gestational parameters and ovarian response to exogenous gonadotropin administration in offspring from two successive pregnancies. Using environmentally relevant doses of BPA and BP3, this research aims to better understand the risks associated with low-dose exposure. By examining these effects across multiple gestations, the study provides novel insights into how cumulative exposure and multiparity influence the reproductive impacts of BP3 and BPA.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Forty-nine female C57BL/6 mice, weighing 14–17 g and aged 6 weeks, were obtained from the Centro de Medicina Comparada - ICIVET Litoral (UNL, CONICET, Santa Fe, Argentina). Upon arrival at our research facility, the animals were housed for two weeks to acclimate and adapt to their new environment. Health evaluations confirmed the absence of known viral, bacterial and parasitic pathogens in the mice provided by the supplier. The animals had ad libitum access to both water and food and were housed in a controlled environment maintained at a constant temperature of 22 ± 2 °C, with a 14-hour light cycle from 06:00–20:00 h. Their welfare was ensured through daily assessments, including monitoring of their appearance, behavior and cage conditions. This continuous monitoring allowed the prompt detection and management of any signs of distress or health issues. Following the two-week acclimatization period, the experiments commenced.

All experimental procedures adhered to the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al., 2020) and complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the US National Academy of Sciences. In addition, the protocols used in this study were approved by the Advisory Committee on Research Ethics and Safety of the Faculty of Biochemistry and Biological Sciences-UNL, Santa Fe, Argentina (permit

number CE: CE2018–61-C).

2.2. Dosing solution

The BPA solution (99 % purity, Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) was administered orally by micropipette-guided drug administration (MDA) following established protocols (Schalbetter et al., 2021) at a dose of 4 µg/kg bw/day, adjusted to the animal's weight. The MDA technique consists of delivering the solution directly into the animal's oral cavity using a calibrated micropipette. Administration is considered complete once full volume has been voluntarily consumed. The solution is dispensed only while the animal is actively licking the pipette tip, and does not require full restraint or invasive procedures, thereby minimizing stress and allowing precise control of dose and timing. This approach allows for accurate control of both dose and timing while minimizing stress. This solution was prepared from a stock solution of BPA at 4 mg/ml dissolved in absolute ethanol (Merck Chemistry Argentina, Buenos Aires, Argentina). The stock solution was subsequently diluted 1/1000 in water, resulting in a final working solution of 4 µg/ml, which was used to deliver the appropriate dose to each mouse based on their weight. Thus, BPA was dissolved in an ethanol/water solution, consistent with previous studies from our group (Santamaría et al., 2017). This vehicle facilitates complete ingestion via MDA (Schalbetter et al., 2021; Vanhecke et al., 2024). BPA dose was selected based on TDI of 4 µg/kg bw/day. Although the EFSA issued a new scientific opinion in 2023 recommending a lower TDI of 0.2 ng/kg bw/day, this regulation entered into force on January 2025, along with defined transitional periods allowing the continued marketing of certain BPA-containing products until between 2026 and 2028, depending on product type (European Commission, 2024). Thus, these regulatory transitions indicate that human exposure to BPA at levels comparable to the former TDI of 4 µg/kg bw/day remains plausible and relevant, and reflective of realistic human exposure scenarios during this ongoing regulatory transition.

The BP3 solution (98 % purity, Sigma-Aldrich, Argentina) was administered topically, following our previously published protocol (Galliani et al., 2024; Santamaría et al., 2020). Briefly, BP3 was applied to the shaved back of the mice at a dose of 50 mg/kg bw.d, adjusted to the animal's weight. This dose was selected based on human dermal exposure estimates from Janjua et al. (2008), which reported an equivalent daily dose of ~50 mg/kg bw following application of a 10 % BP3 cream. This estimation was further supported by pharmacokinetic modeling (Wang and Ganley, 2019). Finally, applying this dose, serum levels achieved in our previous study (Santamaría et al., 2020) were comparable to or below those reported in humans (Matta et al., 2019). A BP3 solution of 10 mg/ml was prepared by dissolving BP3 in extra virgin olive oil (Tres Marias, San Juan, Argentina).

To validate the control groups, a pilot experiment was conducted comparing three different vehicles: the BPA vehicle (0.001 % ethanol in water), the BP3 vehicle (olive oil), and the combined vehicle for BP3 + BPA (0.001 % ethanol in water and olive oil using their respective administrations routes). No significant differences were observed in the number of ovulated oocytes among the groups. Consequently, the control group selected for this study received both vehicles: 0.001 % ethanol orally in water via micropipette and extra virgin olive oil applied topically to the skin.

2.3. Experimental design

One BALB/C male and one C57BL/6 female were paired and housed together in individual cages. This allogeneic pairing, achieved by mating C57BL/6 females with BALB/c males, mimics the natural mating conditions observed in mammals, including humans (Müller et al., 2018). Gestational day 0 (gd0) was defined as the day a vaginal plug was detected. Pregnant mice were divided into four experimental groups and treated as follows:

V. Galliani et al.

Environmental Toxicology and Pharmacology 119 (2025) 104821

- BP3 group: received topical applications of BP3 at 50 mg/kg.bw.d (n = 11).
- BPA group: administered BPA orally at 4 µg/kg.bw.d daily by micropipette-guided drug administration (n = 15).
- BP3+BPA group: received both treatments, with BP3 applied topically and BPA administered orally (n = 13).
- Control group: received vehicle treatments orally (0.001 % ethanol in water) and topically (extra virgin olive oil) (n = 10).

Treatment commenced on gd0 and continued until gd9 in two sequential gestations of the same dams (Fig. 1). This, in detail, means that after the day of parturition of their first pregnancy, mothers were allowed to complete the lactation of their pups until the weaning on day 21. Immediately after weaning, each dam was re-mated with a BALB/c male to initiate a second pregnancy. Once pregnant, moms were re-exposed from gd0 to gd9 during this second pregnancy and then allowed to complete lactation (see Fig. 1). This window was selected to encompass critical early developmental events, including embryo implantation (gd4.5–5), spiral artery remodeling (gd6–10) (Charalambous et al., 2012; Rusidze et al., 2023) and the specification and migration of primordial germ cells (gd7.25–10) (Richardson and Lehmann, 2010). These processes are highly sensitive to endocrine disruption and relevant for assessing potential long-term effects on reproductive function. The weights of the dams were recorded daily. On the day of parturition, the number, sex and weight of offspring from both the first pregnancy (F1.P1) and second pregnancy (F1.P2) were recorded. Gestation typically lasted 19–20 days. Births were classified as off-term births if parturitions occurred on gd18 or earlier (preterm), or on gd21 or later

(post-term). During the lactation period, offspring weights were recorded.

2.4. Superovulatory protocol

The ovarian response to exogenous gonadotropin administration is a widely used experimental approach to assess the capacity of the ovary to respond to hormonal stimulation. Even when this is not a natural outcome, allow us to establish if the capacity of the ovary to respond to exogenous administration of gonadotropins is conserved. This is relevant for in vitro fertilization (IVF), where women are submitted to this kind of superstimulation, allowing the assessment of key parameters directly relevant to clinical IVF success: oocyte yield and follicular response to gonadotropins. While interspecies differences limit direct extrapolation to humans, this approach provides translational insight into how BP3 or BPA exposure might compromise ovarian stimulation efficiency in IVF settings. On postnatal day (pnd) 21, pups were weaned, and female offspring were selected for further analysis, while male pups were euthanized and used in other experiments. Superovulation was performed at this prepubertal stage to ensure that all animals had not yet initiated endogenous estrous cycles. This timing allowed for consistent and controlled exposure to exogenous gonadotropins, minimizing variability in ovarian response due to differences in pubertal status as well as prepubertal mice typically yield a higher number of ovulated oocytes compared to adults (Kolbe et al., 2016). Previous monitoring at our animal facility confirmed that vaginal opening in this C57BL/6 × BALB/c hybrid strain typically occurs on pnd 30, validating pnd27 as a prepubertal time point. Female offspring were subjected to a superovulation protocol, which involved an intraperitoneal injection of 5 IU of PMSG, followed 48 h later by an injection of 5 IU of hCG. Oocytes were collected for 14 h after the hCG injection. To evaluate the response to gonadotropins, different groups of offspring were used for sample collection at three time points of the protocol (Fig. 1):

- Time 1 (Start of protocol: 0 h PMSG, 0 h hCG): at pnd27, prior to any hormone injection, ovaries were collected to assess baseline ovarian status.
- Time 2 (Post PMSG: 48 h post-PMSG, 0 h hCG): at pnd29, 48 h after the PMSG injection, a different group of offspring was used to collect ovaries and to evaluate the ovarian response to PMSG.
- Time 3 (Post PMSG + hCG: 48 h post-PMSG, 14 h post-hCG): at pnd30, 14 h after hCG injection, another group of offspring was selected, and their ovaries were collected to assess the ovarian response to hCG. At this time, ovulated oocytes were also retrieved and counted.

At each time point, one ovary was fixed for histology and the other was stored at -80°C for RNA extraction and subsequent gene expression analysis by RT-PCR. Blood was also collected at each time point, and serum was separated and stored at -20°C for later hormone levels measurement.

2.5. Ovulated oocyte count

The oocytes released in response to the superovulatory protocol were counted in the ovaries obtained at 14 h post-hCG injection. Oocyte-cumulus complexes were surgically retrieved from the oviducts and placed in Dulbecco's modified Eagle's medium: F12 (Gibco®, Life Technologies, Invitrogen). The complexes were then treated with 0.3 % hyaluronidase (Sigma) for 30 min at 37°C to disperse the cumulus cells. Following this treatment, denuded oocytes were categorized and counted. Based on the observed results (see below, Results Section 3.5), analyses of follicular dynamics, hormone levels, and gene expression of steroidogenic enzymes were conducted exclusively in samples from F1.P2 offspring.

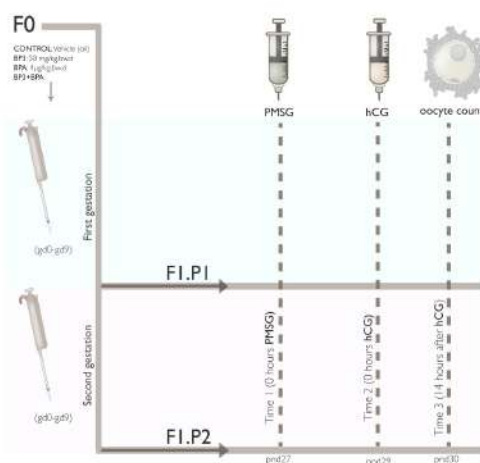


Fig. 1. Experimental design: C57BL/6 females were crossed with BALB/C males (first gestation), and from gd0 (plug day) they were treated with the compounds (BP3, BPA, BP3 +BPA and vehicle) until dg9. At pnd21 the offspring were weaned, and the dams were crossed again with a BALB/C male (second gestation) and treated again with the compounds from gd0 to gd9. Female offspring (first and second gestation) were submitted to a superovulatory protocol, for which PMSG was injected the same day and hCG was injected at 48h post PMSG. Ovulated oocytes were counted after 14h of hCG injection. At the beginning of the protocol, at 48h post PMSG and 14h post hCG, one ovary was set aside for histology and the other one stored at -80°C for RNA extraction and subsequent gene expression studies by RT-PCR. In parallel, blood was also collected at the same times, serum was separated and stored at -20°C until the time of determination of sex steroid hormone levels. BP3 benzophenone-3, BPA bisphenol-A; F0 founding generation, F1.P1 offspring born in a first pregnancy, F1.P2 offspring born in a second pregnancy.

V. Galliani et al.

Environmental Toxicology and Pharmacology 119 (2025) 104821

2.6. Follicular dynamics

Follicular dynamics were evaluated in F1.P2 offspring at the three previously described time points, following established protocols (Rodríguez et al., 2010; Santamaría, 2016). Briefly, ovaries were fixed in 10 % buffered formalin overnight at room temperature and subsequently embedded in paraffin. Serial sections of 5 µm thickness were prepared from the midpoint of the organ, and every tenth section was stained with picosirius-hematoxylin (P/H). A total of 4 sections per ovary was analyzed (Santamaría et al., 2019). Oocyte counts were performed using an Olympus BH2 microscope at 400X magnification. The following parameters were evaluated: a) total oocytes per square micrometer, b) primordial follicles per square micrometer, c) percentage of primordial follicles, d) antral follicles per square micrometer, and e) percentage of antral follicles. To calculate the oocyte counts per area, the total area of each section was measured in square micrometers using Fiji software.

2.7. Measurement of estradiol, progesterone, and testosterone

Hormone measurements were conducted using serum pools collected from F1.P2 female offspring at the three time points of the superovulation protocol. For each time point, serum from individual samples was combined into pools as follows:

Time 1 (Start of the protocol): 3 CONTROL pools (9 samples), 3 BP3 pools (8 samples), 4 BPA pools (12 samples), and 4 BP3 + BPA pools (10 samples).

Time 2 (48 h post-PMSG injection): 4 CONTROL pools (9 samples), 3 BP3 pools (6 samples), 3 BPA pools (8 samples), and 5 BP3 + BPA pools (11 samples).

Time 3 (14 h post-hCG injection): 4 CONTROL pools (10 samples), 6 BP3 pools (12 samples), 5 BPA pools (9 samples), and 5 BP3 + BPA pools (8 samples). Organic extraction was performed using 200 µl of serum from each pool. Sulfuric ether was used for the extraction, and the resulting extracts were reconstituted with 0.5 ml of 0.1 % gelatin in PBS-EDTA, following established protocols (Portelinha et al., 2015).

The extracted hormones were measured using the ECLIA-Roche method, with the following parameters:

- a) Estradiol: expressed in pg/ml, with a detection limit of 5 pg/ml.
- b) Progesterone: expressed in ng/ml, with a detection limit of 0.05 ng/ml.
- c) Testosterone: expressed in ng/ml, with a detection limit of 0.03 ng/ml.

All hormone measurements were performed at the Alkemy laboratory in Santa Fe, Argentina, following standardized protocols and quality control procedures.

2.8. Real-time PCR

An optimized reverse transcription-qRT-PCR protocol was used to analyze the relative mRNA expression levels of cytochrome P450scc (Cyp11a), 17 α -hydroxylase (Cyp17a), P450aromatase (Cyp19), follicle stimulating hormone receptor (FSHR) and luteinizing hormone receptor (LHR) in the ovaries obtained from F1.P2 offspring. Primer sequences and amplicon sizes for each mRNA are provided in Table S1, which were designed using the NCBI primer-blast tool. Ovaries from each experimental group (n = 8 CONTROL, n = 8 BP3, n = 8 BPA, n = 8 BP3 + BPA) were individually homogenized in Trizol (Life Technologies, NY, USA), and total RNA was extracted according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was assessed by A260 measurements on a Nanodrop spectrophotometer, then the RNA was stored at -80 °C until further use. Equal amounts (1 µg) of total RNA were reverse transcribed into cDNA using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT) primers (Invitrogen), following previously published protocols (C.G. Santamaría et al., 2019; Santamaría et al., 2017). Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) assays were performed using HOT FIRE Pol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; Biocientífica) and a Step One

thermocycler (Applied Biosystem). Controls without template DNA were included in all assays, and no consistent amplification was observed in these controls. Product purity was confirmed by dissociation curves and random samples were subjected to agarose gel electrophoresis. Standard curves were prepared using six serial dilutions of a cDNA mixture containing equal amounts of cDNA from different experimental groups, as previously reported. All standards and samples were assayed in duplicate in each independent experiment. To select a suitable house-keeping (HK) gene for normalization, we assessed two candidates: ribosomal protein L19 (L19) and β -actin (ACTB) following a previously published protocol (Abud et al., 2024). Analysis revealed that L19 expression was unaffected by BP3 but was altered by BPA and BP3 + BPA treatments. Conversely, ACTB expression remained stable across all treatments (BP3, BPA, and BP3 + BPA). Therefore, ACTB was selected as the normalization gene. The thermocycling conditions included an initial denaturation step at 95 °C for 15 min, followed by cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 59 °C (for Cyp11a), 58 °C (for Cyp17a), 60 °C (for Cyp19a, FSHR, LHR, and L19) for 15 s, and extension at 72 °C for 30 s. Significant differences in gene expression ($p < 0.05$) were determined using the Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test©35 performed with the Relative Expression Software Tool REST© 2009 v. 2 (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002).

2.9. Statistical analysis

Data were presented as means $\pm$ S.E.M. The normal distribution of data was assessed using the Shapiro-Wilk test. For normally distributed data, a two-way ANOVA was conducted to analyze two independent factors: BPA exposure (present/absent) and BP3 exposure (present/absent). This 2 $\times$ 2 factorial design allowed the evaluation of the main effects of each compound, as well as their potential interaction. When main effect and/or interaction was detected, post hoc comparisons between experimental groups were performed using unadjusted Fisher's LSD test. Post hoc tests were not applied when neither the main effects nor the interaction reached statistical significance (Krzywinski and Altman, 2014; Wei et al., 2012). Additionally, the proportions were analyzed with Fisher's exact test, with results expressed as percentages. For the comparison of P2 groups against the P1 control group, a one-proportion test was applied.

The number of samples or experiments analyzed, the statistical tests used, and corresponding p-values for significant differences are indicated in the respective figure legends. A significance threshold of $p \leq 0.05$ was considered for all analyses. GraphPad Prism 5.0 was used to perform statistical analyses.

3. Results

3.1. Maternal outcomes following exposure to BP3, BPA or BP3 + BPA

Fig. 2a and 2b present intra-gestational comparisons, evaluating gestational length in treated groups relative to their respective controls within each pregnancy. In this analysis, exposure to BPA and the combination of BP3 + BPA during the first ten days of gestation significantly increased the incidence of off-term births—encompassing both preterm and post-term deliveries—in both pregnancies. In contrast, BP3 exposure alone did not alter birth timing relative to the corresponding control groups (Fig. 2a, 2b). Fig. 2c shows an inter-gestational comparison, where all experimental groups from the second pregnancy (P2), including the P2 control, were compared to the control group of the first pregnancy (P1). This analysis revealed a significant increase in the proportion of preterm births in the P2 control group compared to the P1 control, indicating that preterm delivery emerged even in the absence of chemical exposure during the second gestation. Additionally, all treated groups from P2 (BP3, BPA, and BP3 + BPA) exhibited significantly higher proportions of off-term births relative to the P1 control (Fig. 2c).

Maternal weight during gestation was not affected by BP3, BPA, or

V. Galliani et al.

Environmental Toxicology and Pharmacology 119 (2025) 104821

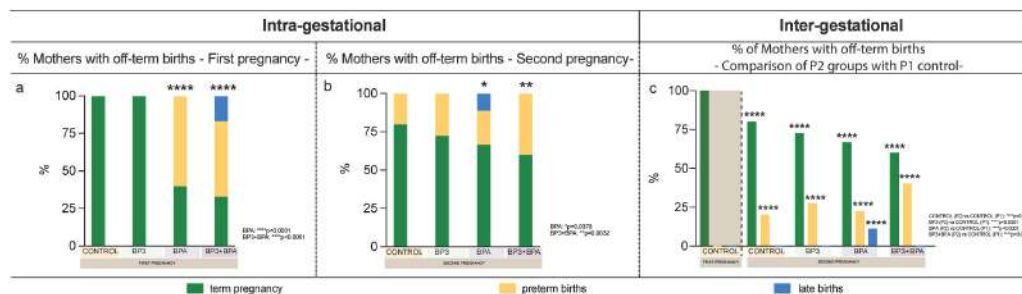


Fig. 2. Percentages of mothers with term and off-term births (preterm and post-term births): a) Mothers corresponding to a first exposure to BP3, BPA, and BP3 + BPA (first gestation) (n = 5 CONTROL, n = 5 BP3, n = 5 BPA, n = 7 BP3 + BPA). b) Mothers with a second exposure to BP3, BPA, and BP3 + BPA (second gestation) (n = 7 CONTROL, n = 7 BP3, n = 12 BPA, n = 10 BP3 + BPA). c) Inter-gestational comparison of the proportion of off-term births in all P2 groups (Control, BP3, BPA, BP3 + BPA) relative to the Control group from the first pregnancy (P1). Statistical analysis was performed using the Fisher's exact test for panels a and b, and one-proportion test for panel c. Data are expressed as percentages. Significance levels are denoted as follows: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. CONTROL. BP3 benzophenone-3, BPA bisphenol-A.

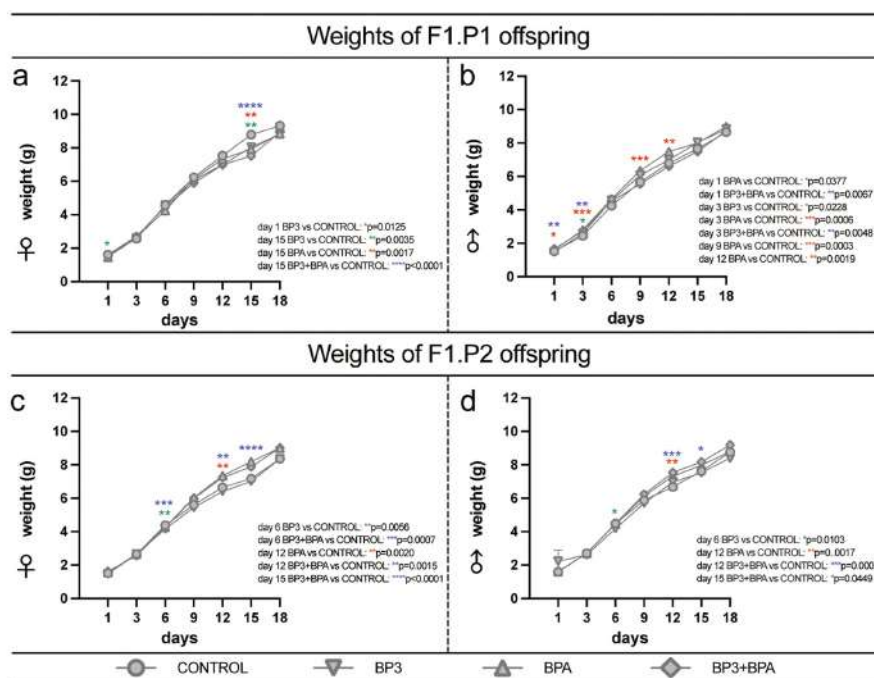


Fig. 3. Weights of offspring prenatally exposed to BP3, BPA and BP3 + BPA born in a first and second pregnancy: a) Weight of female F1.P1 exposed to BP3, BPA and BP3 + BPA vs CONTROL (n = 19 CONTROL, n = 12 BP3, n = 10 BPA, n = 20 BP3 + BPA). b) Weight of male F1.P1 exposed to BP3, BPA and BP3 + BPA vs CONTROL (n = 23 CONTROL, n = 24 BP3, n = 22 BPA, n = 23 BP3 + BPA). c) Weight of female F1.P2 exposed to BP3, BPA and BP3 + BPA vs CONTROL (n = 32 CONTROL, n = 22 BP3, n = 49 BPA, n = 41 BP3 + BPA). d) Weight of male F1.P2 exposed to BP3, BPA and BP3 + BPA vs CONTROL (n = 27 CONTROL, n = 23 BP3, n = 43 BPA, n = 33 BP3 + BPA). Weight was recorded only for litters with more than six pups. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA. Data are expressed as mean $\pm$ SEM, and significant differences were determined using the post hoc Uncorrected Fisher's LSD. *Green asterisks indicate significant differences between BP3 and CONTROL, *red asterisks indicate significant differences between BPA and CONTROL, and *blue asterisks indicate significant differences between BP3 + BPA and CONTROL. Significance levels are denoted as follows: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001 vs. CONTROL. Interaction effects for each day (weights of F1.1 offspring): Females - day 1 (*p = 0.0125). Male - day 3 (*p = 0.0469), day 9 (***p < 0.0001), day 12 (***p = 0.0005), day 15 (***p = 0.0009). Interaction effects for each day (weights of F1.2 offspring): Female - day 15 (***p < 0.0001). BP3 benzophenone-3, BPA bisphenol-A.

V. Galliani et al.

Environmental Toxicology and Pharmacology 119 (2025) 104821

BP3 +BPA exposure in either pregnancy (Fig. S1).

3.2. Impact of BP3, BPA, and BP3 +BPA on offspring number and sex ratio

The number of offspring per delivery and the sex ratio (%female/total) were unaffected by maternal exposure to BP3, BPA, or BP3 +BPA in either pregnancy (Fig. S2). For F1.P1, the percentages of female offspring were: 47.92 % (control, $n = 48$), 36.84 % (BP3, $n = 38$), 30.56 % (BPA, $n = 36$) and 44.44 % (BP3 +BPA, $n = 36$). In F1.P2 the percentages were: 55.74 % (control, $n = 61$), 50.00 % (BP3, $n = 52$), 54.25 % (BPA, $n = 94$) and 56.25 % (BP3 +BPA, $n = 80$).

3.3. Weight of exposed offspring

Weight changes during lactation were observed in both offsprings (Fig. 3). Male F1.P1 exposed to BPA or BP3 +BPA showed weight increases (Fig. 3b) that normalized by weaning, whereas female F1.P1 of treated groups displayed altered weight only at pnd15 or pnd1 (BP3). In F1.P2, both males and females showed transient weight increases mainly when exposed to BP3 +BPA, that normalized by pnd18 (Fig. 3c, d). Descriptive statistics expressed as mean $\pm$ SEM for the number of ovulated oocytes in both F1.P1 and F1.P2 offspring are available in Supplementary Table S2.

3.4. Ovary weights in offspring exposed to BP3, BPA, and BP3 +BPA

Ovary weights recorded at the initial stage of the protocol (before any hormone injection), 48 h post-PMSG injection, and at 14 h post-hCG injection showed no significant differences across the groups in either pregnancy (Table S3).

3.5. Ovulation rate and exposure to BP3, BPA, or BP3 +BPA

F1.P1 offspring did not exhibit alterations in the number of ovulated oocytes following a superovulation protocol (Fig. 4a). On the contrary, F1.P2 offspring exposed to BP3, BPA, or BP3 +BPA exhibited significantly fewer ovulated oocytes compared to controls (Fig. 4b). Descriptive statistics expressed as mean $\pm$ SEM for the number of ovulated oocytes in both F1.P1 and F1.P2 offspring are available in Supplementary Table S4.

3.6. BP3, BPA, BP3 +BPA and follicular development

Antral follicle counts (AFC) were significantly decreased at 48 h post-PMSG injection in BP3, BPA, and their combination (BP3 +BPA) (Fig. 5b) in F1.P2 offspring. Additionally, BPA and BP3 +BPA led to a reduction in primordial follicle counts both at the beginning of the protocol and 14 h post-hCG injection (Fig. 5a). Total number of oocytes were also lower at the beginning of the superovulation protocol in BPA and BP3 +BPA groups (Fig. 5c). Descriptive statistics for follicular counts (mean $\pm$ SEM) at all three evaluated time points are provided in Supplementary Table S5.

3.7. Hormonal levels in F1.P2 offspring

Hormonal analysis at different time points during the superovulation protocol revealed increased estradiol levels in BP3 and BP3 +BPA groups at 14 h post-hCG injection (Fig. 6a). Additionally, testosterone levels were elevated in the BP3 +BPA group at this time point in F1.P2 offspring (Fig. 6c). Progesterone levels remained unchanged across all groups (Fig. 6b). Supplementary Table S6 provides the mean $\pm$ SEM values of serum hormone levels (estradiol, progesterone, and testosterone) at the evaluated time points.

3.8. Unaffected mRNA levels of steroidogenic enzymes and gonadotropin receptors in response to PMSG and hCG treatment

The expression of steroidogenic enzymes (Cyp19a, Cyp17a, Cyp11a) and gonadotropin receptors (FSHR, LHr) was unaltered in F1.P2 offspring ovaries (Fig. S3).

4. Discussion

The impact of BP3 and BPA on reproductive physiology have gained considerable attention due to their widespread presence in personal care products and the resulting ubiquitous human exposure. In previous studies, we demonstrated that both BP3 and BPA individually affect ovarian function (Galliani et al., 2024; Santamaría et al., 2019; Santamaría et al., 2017). However, whether these compounds exert synergistic effects when combined remains unexplored, it is also important to consider that moms may exhibit a different susceptibility to EDCs compared to those with only one pregnancy. To address this complexity,

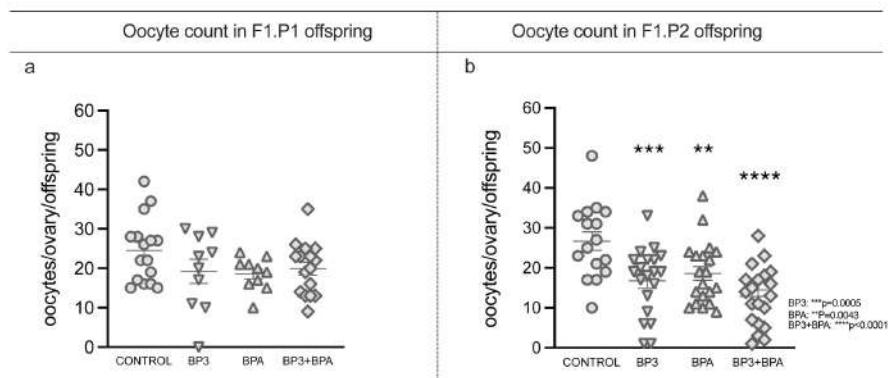
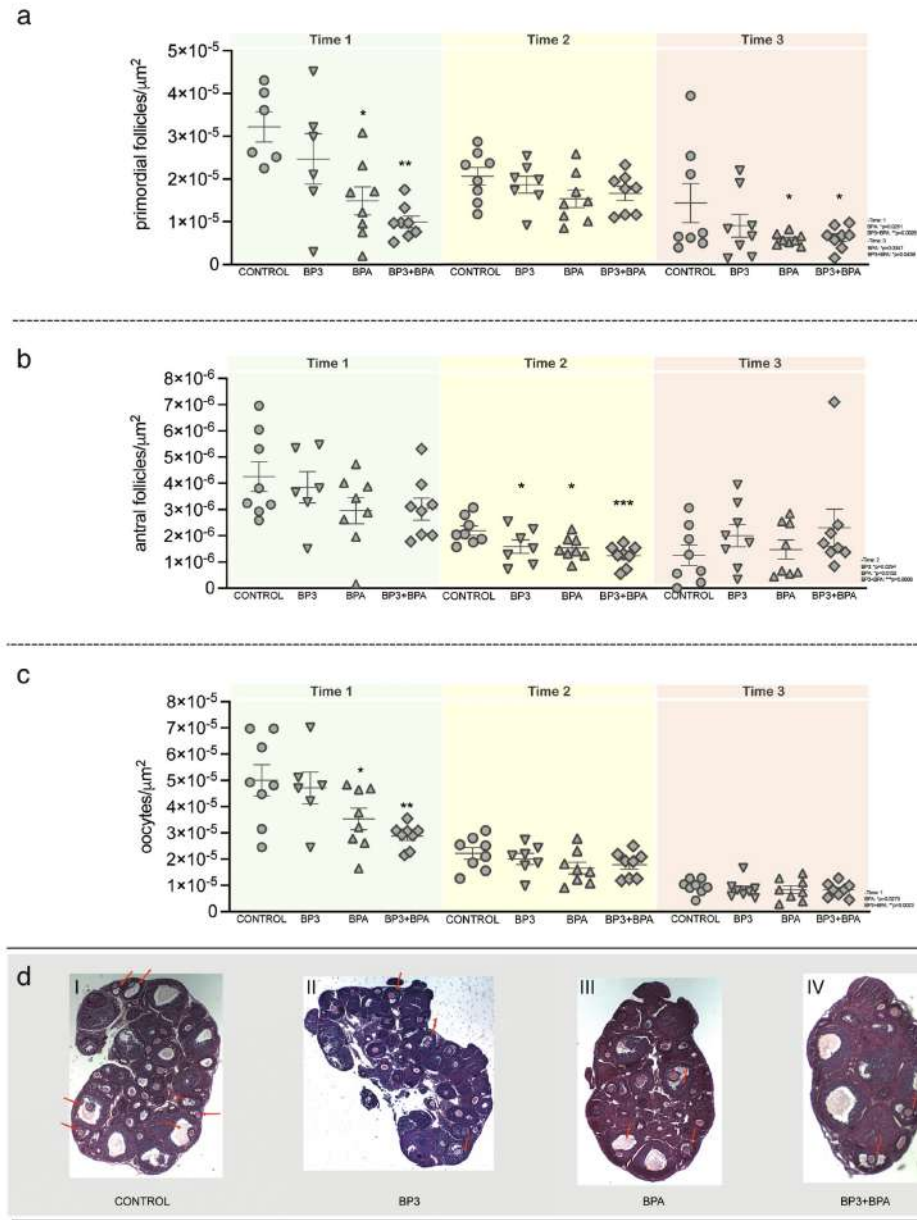


Fig. 4. Oocyte count following a superovulation protocol in offspring prenatally exposed to BP3, BPA, or BP3 +BPA: a) Oocyte count in F1.P1 offspring ($n = 16$ CONTROL, $n = 10$ BP3, $n = 10$ BPA, $n = 16$ BP3 +BPA). b) Oocyte count in F1.P2 offspring ($n = 16$ CONTROL, $n = 20$ BP3, $n = 20$ BPA, $n = 20$ BP3 +BPA). Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA, with no interaction observed. Data are expressed mean $\pm$ SEM, and significant differences were determined using the post hoc Uncorrected Fisher's LSD. Significance levels are denoted as follows: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ vs. CONTROL. BP3 benzophenone-3, BPA bisphenol-A.

V. Galliani et al.

Environmental Toxicology and Pharmacology 119 (2025) 104821

Total, primordial, and antral follicle count in F1.P2 offspring



(caption on next page)

V. Galliani et al.

Environmental Toxicology and Pharmacology 119 (2025) 104821

Fig. 5. Total, primordial, and antral follicle count in F1.P2 offspring: a) Primordial follicle count per area at time points: time 1 (n = 8 CONTROL, n = 6 BP3, n = 8 BPA, n = 8 BP3 + BPA), time 2 (n = 8 CONTROL, n = 7 BP3, n = 8 BPA, n = 8 BP3 + BPA), and time 3 (n = 8 CONTROL, n = 8 BP3, n = 8 BPA, n = 8 BP3 + BPA). b) Antral follicle count per area at time points: 1 (n = 8 CONTROL, n = 6 BP3, n = 8 BPA, n = 8 BP3 + BPA), time 2 (n = 8 CONTROL, n = 7 BP3, n = 8 BPA, n = 8 BP3 + BPA), and time 3 (n = 8 CONTROL, n = 8 BP3, n = 8 BPA, n = 8 BP3 + BPA). c) Total oocyte count per area at time points: time 1 (n = 8 CONTROL, n = 6 BP3, n = 8 BPA, n = 8 BP3 + BPA), time 2 (n = 8 CONTROL, n = 7 BP3, n = 8 BPA, n = 8 BP3 + BPA), and time 3 (n = 8 CONTROL, n = 8 BP3, n = 8 BPA, n = 8 BP3 + BPA). d) Representative images of whole ovaries 48 h after PMSG injection in F1.P2: I) CONTROL, II) BP3, III) BPA, IV) BP3+BPA. Red arrows indicate antral follicles. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA, with no interaction observed. Data are expressed mean $\pm$ SEM, and significant differences were determined using the post hoc Uncorrected Fisher's LSD. Significance levels are denoted as follows: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. CONTROL. BP3 benzophenone-3, BPA bisphenol-A. Time 1: Initial stage of the superovulation protocol (without hormone injection). Time 2: 48 h post PMSG injection during the superovulation protocol. Time 3: 14 h post hCG injection during the superovulation protocol.

we employed a multi-exposure multiparity model to examine the combined effects of BP3 and BPA across two sequential pregnancies. This design reflects the real-world scenario where women are exposed to EDCs during successive gestational windows. Specifically, we investigate whether exposure to BP3 and BPA or their combination disrupts gestational parameters and ovary response to exogenous gonadotropins in prepubertal mouse offspring and whether the cumulative exposure and multiparity amplify these disruptions.

Our results revealed that the ovulation rate in offspring born to mothers exposed to BPA, BP3 or BP3 + BPA during the first gestation remain unaltered. However, offspring born to mothers exposed to these compounds during a second pregnancy exhibited a significantly diminished response to gonadotropin stimulation, evidenced by a significantly lower count of ovulated oocytes at 14 h post-hCG injection in the BP3, BPA, and BP3 + BPA groups. To better understand the mechanisms underlying this reduced ovulation rate, we examined ovarian follicular dynamics, hormonal levels and expression of steroidogenic enzymes as well as gonadotropin receptors in the F1.P2 offspring at three key time points during the superovulation protocol: the beginning of the protocol (before PMSG injection), at 48 h post-PMSG injection, and at 14 h post-hCG injection. At 48 h post-PMSG injection, a significant decrease in the number of antral follicles was evident in the ovaries of the BP3, BPA, and BP3+BPA groups compared to controls. This reduction in antral follicles likely diminishes the pool of ovulatory follicles available for hCG-induced maturation and ovulation, contributing to the lower ovulation rates observed. These results align with human studies that associate BPA and BP3 exposure with reproductive dysfunctions. BPA has been linked to a lower AFC in women undergoing in vitro fertilization (IVF) treatments (Souter et al., 2013) and a diminished ovarian reserve associated with infertility (Park et al., 2020). Additionally, higher serum BPA levels have been reported in infertile women compared to their fertile counterparts (Caserta et al., 2013; La Rocca et al., 2014). Other studies have associated BPA exposure with poorer IVF outcomes in humans, including reduced numbers of retrieved oocytes, lower implantation rates, and decreased pregnancy success (Ehrlich et al., 2012; Mok-Lin et al., 2010; Pivonello et al., 2020). Regarding BP3, recent findings indicate a negative correlation between urinary BP3 concentrations and AFC, particularly in younger women, suggesting that this population may be more vulnerable to the adverse effects of BP3 due to their typically higher AFCs (Silva et al., 2024). More recently, some evidence indicates that EDC exposure (including BPA and BP3) may disrupt assisted reproduction processes and early embryonic development (Tzouma et al., 2025). Since IVF relies on controlled hormonal stimulation to maximize the number of oocytes available for fertilization, our results raise concern that chronic exposure to BPA or BP3 could negatively impact fertility in ART settings.

We also observed a reduction in the primordial follicle population in the BPA and BP3+BPA both at the beginning of the protocol (prior to PMSG injection) and at 14 h post-hCG injection, but not at 48 h post-PMSG injection. This pattern strongly suggests that BPA specifically impacts the primordial follicle population, as the reduction observed before any gonadotropin stimulation indicates a direct effect of BPA exposure during gestation. This conclusion is reinforced by the finding of lower total oocyte counts in the same groups at the same time point. Furthermore, the absence of these changes in the BP3 group alone

highlights BPA as the primary agent responsible for these effects. On the other hand, the diminished reserve of primordial follicles may contribute to the reduced AFC observed at the end of the PMSG stimulus (Fortune, 2003; McGee and Hsueh, 2000). Within the superovulation protocol, primordial follicles are actively recruited and stimulated to grow, eventually reaching the antral stage. Therefore, a reduction in the primordial follicle pool available for recruitment could lead to fewer antral follicles available for further development and ovulation. This aligns with the observed reduction in ovulated oocytes and underscores the critical role of primordial follicle reserve in determining ovarian response to gonadotropin stimulation, particularly under BPA exposure.

This poor ovulatory response was accompanied by a marked increase in estradiol (E) levels in BP3 and BP3+BPA at 14 h post-hCG injection, with testosterone (T) also elevated in BP3+BPA at the same time. Despite these hormonal alterations, the mRNA levels of steroidogenic enzymes and gonadotropin receptors remained unchanged. In the case of the group exposed solely to BP3, the elevated estradiol levels with normal testosterone and progesterone suggest a selective alteration in the estrogen synthesis pathway or the gonadal cells' sensitivity to FSH. Possible mechanisms include potentiation of aromatase activity, modulation of estrogen receptors, or disruption of the negative feedback regulation of the hormonal axis. However, since we measured the mRNA levels of aromatase (Cyp19a1) along with other steroidogenic enzymes by qRT-PCR and found them to be within normal ranges (Hales, 2011; Miller, 2017), the observed estradiol elevation is likely not due to increased aromatase expression. Previous studies have shown that BPA can alter gonadotropin signaling (Gómez et al., 2015) and that BP3 affects estrogen receptor-mediated pathways (Li et al., 2024) which may contribute to the observed hormonal changes. Furthermore, BPA has been linked to increased aromatase activity in certain contexts (Santamaría et al., 2017), which could explain the elevated estradiol levels. Further research is needed to explore the effects of these disruptors on hormonal regulation and receptor activity.

Moreover, while most research has focused on outcomes of a first pregnancy, emerging evidence suggests that parity status can influence several endocrine parameters, including oocyte quality, embryo survival (Vicente et al., 2022) and susceptibility to obesity (Rebholz et al., 2012). The use of a multiparous model was justified by increasing evidence that reproductive and endocrine parameters may be modulated not only by exposure to endocrine-disrupting chemicals (EDCs) but also by the number of pregnancies itself. Repeated pregnancies can alter the organism's physiological response to subsequent exposures (Bridges, 2015), potentially modifying susceptibility to EDCs. This differential sensitivity may arise from physiological adaptations induced by multiparity, including changes in ovarian reserve, metabolic state, and hypothalamic-pituitary-gonadal axis sensitivity (Rebholz et al., 2012; Vicente et al., 2022). Therefore, assessing the effects across two pregnancies provides an integrative perspective on cumulative risks associated with parity, a biologically relevant context often overlooked in endocrine disruption studies. A recent study by Friedman et al. (2023) demonstrated that maternal serum concentrations of per- and polyfluoroalkyl substances were inversely associated with breastfeeding duration, but only in multiparous women (Friedman et al., 2023; Rebholz et al., 2012; Vicente et al., 2022). While multiparity is often associated with physiological changes in reproductive health, it is

Hormones levels in F1.P2 offspring

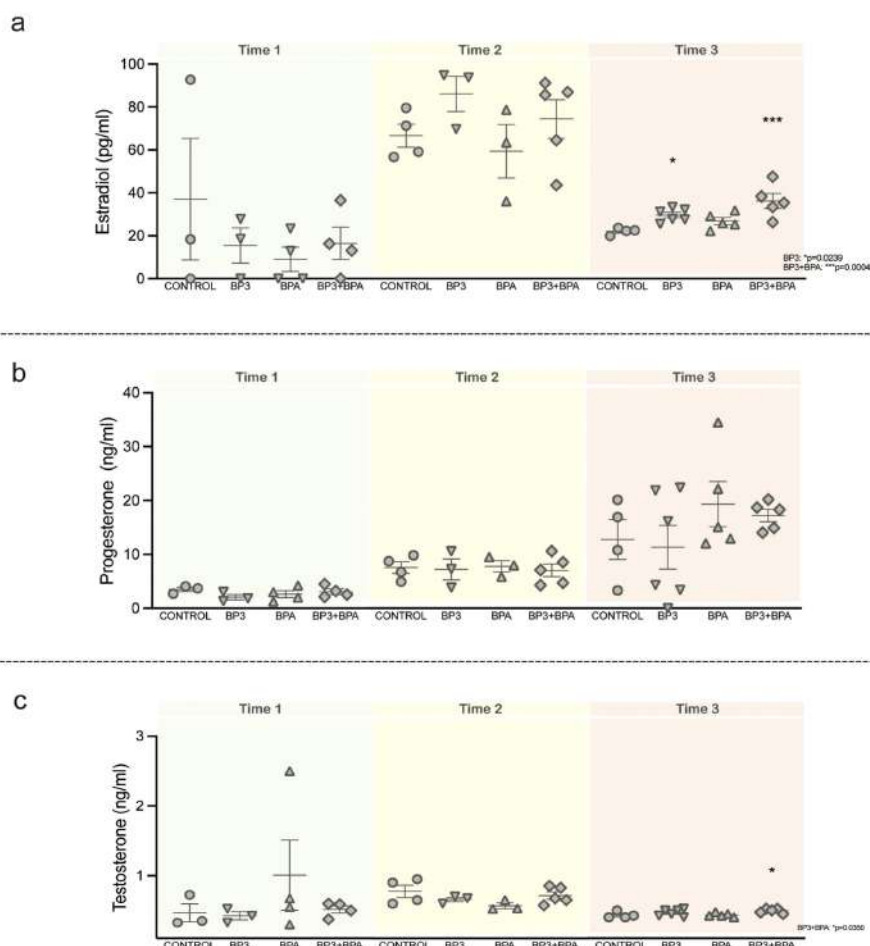


Fig. 6. Hormonal levels corresponding to estradiol, progesterone, and testosterone in F1.P2 offspring: a) Estradiol levels at time 1, time 2, and time 3. b) Progesterone levels at time 1, time 2, and time 3. c) Testosterone levels at time 1, time 2, and time 3. Hormone measurements were performed on serum samples. For hormone analysis, serum pools were generated from offspring females in each group across three time points. At Time 1, 3 pools were created for the CONTROL group (from 9 offspring), 3 pools for the BP3 group (from 8 offspring), 4 pools for the BPA group (from 12 offspring), and 4 pools for the BP3 + BPA group (from 10 offspring). At Time 2, 4 pools were created for the CONTROL group (from 9 offspring), 3 pools for the BP3 group (from 6 offspring), 3 pools for the BPA group (from 8 offspring), and 5 pools for the BP3 + BPA group (from 11 offspring). At Time 3, 4 pools were created for the CONTROL group (from 10 offspring), 6 pools for the BP3 group (from 12 offspring), 5 pools for the BPA group (from 9 offspring), and 5 pools for the BP3 + BPA group (from 8 offspring). Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA, with no interaction observed. Data are expressed as mean $\pm$ SEM, and significant differences were determined using the post hoc Uncorrected Fisher's LSD. Significance levels are denoted as follows: * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$ vs CONTROL. BP3 benzophenone-3, BPA bisphenol-A. Time 1: Initial stage of the superovulation protocol (prior to hormone injection). Time 2: 48 h after PMSG injection in the superovulation protocol. Time 3: 14 h post hCG injection in the superovulation protocol.

important to consider that mothers remain continuously exposed to environmental compounds throughout their lives, and that each new cohort of developing embryos is exposed in utero during every gestation. Thus, the concurrence of gestational exposure in a chronically exposed mother—together with the physiological changes induced by

multiparity—may amplify the cumulative impact of these compounds on the reproductive health of the offspring. Notably, in our study, the most significant changes, particularly the reduction in ovulation rate, were observed only during the second pregnancy. This observation is particularly significant when considering that the oocytes that gave rise

V. Galliani et al.

Environmental Toxicology and Pharmacology 119 (2025) 104821

to the first-generation offspring (F1.P1) were not exposed to BP3, BPA, or BP3+BPA, as these compounds were administered after pregnancy had already commenced. In contrast, the oocytes that gave rise to the second pregnancy offspring (F1.P2) were exposed to BP3, BPA, or BP3+BPA. The effects on follicular dynamics and ovulation in F1.P2 may be attributed to epigenetic changes or alterations in the germ cells of FO, which only manifested after a second gestation. Therefore, the potential interaction between multiparity, cumulative exposure to these endocrine disruptors, and possible epigenetic changes warrants further investigation.

It is interesting to note that these alterations were observed at doses relevant to human exposure. The BP3 doses used in this study reflects human exposure levels following whole-body dermal application (Janjua et al., 2009), further validated by our group in recent research (Santamaria et al., 2020), where we demonstrated that the topical application of 50 mg/kg bw resulted in blood levels of approximately 20 ng/ml. These levels are actually lower than those reported in humans after seven days of topical BP3 application (Matta et al., 2019). Regarding BPA, the dose employed in our study corresponds to the 4 µg/kg bw/day threshold set by the European Union in 2015. This TDI is currently under review: EFSA (EFSA Panel on Food Contact Materials et al., 2023) issued a new scientific opinion in 2023 recommending a lower TDI of 0.2 ng/kg bw/day, which entered into force on January 2025 and introduced a full ban on BPA in food contact materials. However, it also defined transitional periods allowing the continued marketing of certain BPA-containing products until between 2026 and 2028, depending on product type (European Commission, 2024). Therefore, human exposure to BPA at levels comparable to the former TDI of 4 µg/kg bw/day remains plausible and reflective of realistic human exposure scenarios during this ongoing regulatory transition. Our findings, therefore, provide further evidence supporting the need for a reduction or ban of BPA levels in consumer products, in line with the EFSA's recommendations.

Regarding gestational parameters and offspring parameters, no significant changes were observed in maternal weight during gestation and lactation, litter size, or offspring sex ratio. However, an alteration in gestational length was noted in mothers exposed to both BPA and BP3+BPA during both pregnancies (intra-gestational analysis). This finding aligns with prior studies that have associated BPA exposure with changes in gestational length (Aker et al., 2019; Cantonwine et al., 2010; Mustieles et al., 2023; Weinberger et al., 2013). On the other hand, inter-gestational analysis revealed that pre-term births emerge in second pregnancies independently of EDC exposure. Consequently, it raises the question of whether the changes observed in the treated groups during the second pregnancy are due to EDCs or simply reflect the baseline shift already evident in the second control group. Analyzing both intra- and inter-gestational comparisons, BP3, BPA, and BP3+BPA groups differed significantly from the control of the first pregnancy (Control-P1), but only BPA and BP3+BPA differed from their corresponding control in the second pregnancy (Control-P2). These findings suggest that the increase in preterm births observed in the BP3 group during the second pregnancy is likely driven by multiparity-associated factors rather than by BP3 itself. In contrast, BPA and the combination of BP3+BPA induced a greater-than-expected proportion of off-term births during the second pregnancy, even after accounting for the multiparous effect. Weight alterations in offspring were sporadic, with a transient increase in male offspring weight linked to BPA exposure after the first pregnancy, and to BP3+BPA after the second pregnancy. While these findings are consistent with reports suggesting that BPA exposure may alter milk composition, potentially increasing lipid content and contributing to offspring weight gain through breastfeeding (Altamirano et al., 2015), their sporadic nature and limited scope suggest a need for cautious interpretation.

5. Conclusions

The exposure to EDCs such as BP3 and BPA raises significant concerns for human reproductive health. Our study highlights critical findings with direct implications for pregnant women, emphasizing the risks associated with exposure to BP3 or BPA, and their combination. These compounds, individually or combined, disrupt ovarian responses to exogenous gonadotropins in successive pregnancies, suggesting potential impacts on immediate fertility outcomes and broader dysregulation of the reproductive axis. The heightened sensitivity observed in second pregnancies underscores the need to consider cumulative exposures and their implications for both maternal and offspring health. We recognize that maternal uterine environment, particularly endometrial and glandular function, may also be influenced by repeated EDC exposure and could contribute to altered pregnancy outcomes and offspring development, especially during the second gestation. Future studies will be designed to explore whether exposure to BP3, BPA, or their combination induces histological or molecular alterations in the uterine endometrium and glands of the dams, including assessment of endometrial receptivity markers, glandular density, and inflammatory or epigenetic changes in uterine tissue. Such data could help determine whether maternal uterine remodeling contributes to the observed differences in P2 offspring, including birth timing and reproductive outcomes. These results support ongoing regulatory efforts to reassess and potentially lower acceptable exposure thresholds for BPA and BP3, in alignment with international health recommendations. In summary, our findings underscore the urgency of further investigating the long-term effects of EDCs.

CRedit authorship contribution statement

Julián Elías Abud: Supervision, Investigation. **Rodríguez Horacio:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization. **Joana Fessia:** Investigation. **Clarisa Guillermina Santamaria:** Supervision, Conceptualization. **Valentina Galliani:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis.

Funding sources

This work was supported by grants from ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica), grant number PICT 2018-03617 and PICT 2020-08917. VG is a doctoral fellow from CONICET. JF is a doctoral fellow from ANPCyT. JEA, CGS and HAR are career Investigators of CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We are very thankful to Mr. Juan Grant and Mr. Agustín García, who oversaw the mouse colonies. We also thanks to Dr. Stella Vaira from Mathematics Center of FBCB, and to Dr. Paula Cardona who critically revised the statistics approach of data.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.etap.2025.104821](https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104821).

V. Galliani et al.

Environmental Toxicology and Pharmacology 119 (2025) 104821

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Abud, J.E., Pagotto, R., Galliani, V., Teglia, C., Culzoni, J., Bollati-Fogolin, M., Zencussen, M.L., Rodríguez, H.A., 2024. In vitro blastocyst implantation and trophoblast migration are disrupted by the UV filter benzophenone-3 (BP3). *Environ. Pollut.* 349, 123840. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123840>.
- Aker, A.M., Ferguson, K.K., Rosario, Z.Y., Mukherjee, B., Alshawabkeh, A.N., Cordero, J. F., Meeker, J.D., 2019. The associations between prenatal exposure to triclocarban, phenols and parabens with gestational age and birth weight in Northern Puerto Rico. *Environ. Res.* 169, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.10.030>.
- Altamirano, G.A., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E.H., Gómez, A.L., Delconte, M.B., Kass, L., 2015. Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to bisphenol A. *Mol. Cell. Endocrinol.* 411, 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.007>.
- Bridges, R.S., 2015. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Front. Neuroendocrin.* 36, 178–196. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.007>.
- Cantonwine, D., Hu, H., Sánchez, B.N., Lanodrid-Figueroa, H., Smith, D., Ettinger, A.S., Mercado-García, A., Hernández-Avila, M., Wright, R.O., Téllez-Rojo, M.M., 2010. Critical windows of fetal lead exposure: adverse impacts on length of gestation and risk of premature delivery. *J. Occup. Environ. Med.* 52, 1106. <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e318186d6ce>.
- Caserta, D., Bordini, G., Ciardo, F., Marci, R., La Rocca, C., Tait, S., Bergamasco, B., Stecca, L., Mantovani, A., Guerranti, C., Fanello, E.L., Perra, G., Borghini, F., Focardi, S.E., Moscarini, M., 2013. The influence of endocrine disruptors in a selected population of infertile women. *Gynecol. Endocrinol.* 29, 444–447. <https://doi.org/10.3109/09513590.2012.758702>.
- Charalambous, F., Elia, A., Georgiades, P., 2012. Decidual spiral artery remodeling during early post-implantation period in mice: investigation of associations with decidual nNK cells and invasive trophoblast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 847–852. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.057>.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30, 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>.
- EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP), Claude Lambre, José Manuel Barón-Barrera, Claudia Bolognesi, Andrew Chesson, 2023. Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal* 21, 7908. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7908>.
- Ehrlich, S., Williams, P.L., Missmer, S.A., Flaws, J.A., Ye, X., Calafat, A.M., Petrozza, J.C., Wright, D., Hauser, R., 2012. Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Hum. Reprod.* 27, 3583–3592. <https://doi.org/10.1093/humrep/des328>.
- European Commission, 2024. Reglamento (UE) 2024/3190 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2024, sobre el uso de bisfenol A (BPA) y otros bisfenoles y derivados de bisfenoles con clasificación armonizada para propiedades peligrosas específicas en determinados materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos, por el que se modifica el Reglamento (UE) no 10/2011 y se deroga el Reglamento (UE) 2018/213.
- Fortune, J.E., 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 135–163. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00088-5).
- Friedman, C., Dabelea, D., Keil, A.P., Adgate, J.L., Glueck, D.H., Calafat, A.M., Starling, A.P., 2023. Maternal serum per- and polyfluoroalkyl substances during pregnancy and breastfeeding duration. *Environ. Epidemiol.* 7, e260. <https://doi.org/10.1097/EE9.0000000000000260>.
- Galliani, V., Abud, J.E., Zencussen, M.L., Rodríguez, H.A., 2024. Female offspring of mice perinatally exposed to benzophenone-3 showed early subfertility linked to a poor oocyte stockpile. *Arch. Toxicol.* 98. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03730-5>.
- Gómez, J.M., Penalba, R., Cardoso, N., Bernasconi, P.S., Carbone, S., Ponzo, O., Pandolfi, M., Scacchi, P., Reynoso, R., 2015. Exposure to a low dose of bisphenol A impairs pituitary-ovarian axis in prepubertal rats: effects on early folliculogenesis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.10.015>.
- Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., Toppari, J., Zoeller, R.T., 2015. Executive summary to EDC 2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr. Rev.* 36, 593–602. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1093>.
- Hales, D.B., 2011. Steroidogenesis and its regulation. *Encyclopedia of Reproduction*, 2nd edition.
- Hoekstra, E.J., Simoneau, C., 2013. Release of bisphenol A from polycarbonate—a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 386–402. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.536919>.
- Janjua, N., Kongshoj, B., Andersson, A.-M., Wulf, H., 2008. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* 22, 456–461. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2007.02492.x>.
- Kolbe, T., Sheety, S., Walter, I., Palme, R., Rülicke, T., 2016. Impact of superovulation and mating on the wellbeing of juvenile and adult C57BL/6N mice. *Reprod. Fertil. Dev.* 28, 969–973. <https://doi.org/10.1071/RD14372>.
- Krzywinski, M., Altman, N., 2014. Two-factor designs. *Nat. Methods* 11, 1187–1188. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3180>.
- La Rocca, C., Tait, S., Guerranti, C., Busani, L., Ciardo, F., Bergamasco, B., Stecca, L., Perra, G., Mancini, F.R., Marci, R., Bordini, G., Caserta, D., Focardi, S., Moscarini, M., Mantovani, A., 2014. Exposure to endocrine disruptors and nuclear receptor gene expression in infertile and fertile women from different Italian areas. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 10146–10164. <https://doi.org/10.3390/ijerph111010146>.
- Li, H.-M., Gao, Y.-R., Chang, Q., Pei, X.-Y., Sun, J.-H., Lin, Y.-J., Tian, Y.-N., Qiang-Wang, M., Zhao, B., Xie, H.-Q., Ma, H.-M., Xu, H.-M., 2024. BP-3 exposure at environmentally relevant concentrations induced Male developmental reproductive toxicity via ER/CCL27/ROS pathway in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 290, 117556. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.117556>.
- Matta, M.K., Zusterzeel, R., Pilli, N.R., Patel, V., Volpe, D.A., Florian, J., Oh, L., Basha, E., Zineh, I., Sanabria, C., Kemp, S., Godfrey, A., Adah, S., Coelho, S., Wang, J., Furlong, L.-A., Ganley, C., Michele, T., Strauss, D.G., 2019. Effect of sunscreen application under maximal use conditions on plasma concentration of sunscreen active ingredients: a randomized clinical trial. *JAMA* 321, 2082–2091. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.5586>.
- Matta, M.K., Florian, J., Zusterzeel, R., Pilli, N.R., Patel, V., Volpe, D.A., Yang, Y., Oh, L., Basha, E., Zineh, I., Sanabria, C., Kemp, S., Godfrey, A., Adah, S., Coelho, S., Wang, J., Furlong, L.-A., Ganley, C., Michele, T., Strauss, D.G., 2020. Effect of sunscreen application on plasma concentration of sunscreen active ingredients: a randomized clinical trial. *JAMA* 323, 256–267. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.20747>.
- McGee, E.A., Hsueh, A.J., 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 21, 200–214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>.
- Merrill, A.K., Anderson, T., Conrad, K., Marvin, E., James Todd, T., Cory Slechts, D.A., Sobolewski, M., 2021. Protracted impairment of maternal metabolic health in mouse dams following pregnancy exposure to a mixture of low dose Endocrine-Disrupting chemicals, a pilot study. *Toxicol. Res.* 9, 346. <https://doi.org/10.3390/toxicol9120346>.
- Michalowitz, J., 2014. Bisphenol A – sources, toxicity and biotransformation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 738–758. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.003>.
- Miller, W.L., 2017. The regulation of steroidogenesis. *The Endocrine Society Handbook of Hormones*.
- Mok Lin, E., Ehrlich, S., Williams, P.L., Petrozza, J., Wright, D.L., Calafat, A.M., Ye, X., Hauser, R., 2010. Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *Int. J. Androl.* 33, 385–393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01014.x>.
- Moon, J.H., Lee, J., Kim, K.H., Kim, H.J., Kim, Hyeonsek, Cha, H. N., Park, J., Lee, H., Park, S. Y., Jang, H.C., Kim, Hail, 2023. Multiparity increases the risk of diabetes by impairing the proliferative capacity of pancreatic β cells. *Exp. Mol. Med.* 55, 2269–2280. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01100-2>.
- Müller, J.E., Meyer, N., Santamaria, C.G., Schunacher, A., Luque, E.H., Zencussen, M.L., Rodríguez, H.A., Zencussen, A.C., 2018. Bisphenol A exposure during early pregnancy impairs uterine spiral artery remodeling and provokes intrauterine growth restriction in mice. *Sci. Rep.* 8, 9196. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27575-y>.
- Mustieles, V., Balogh, R.K., Axelstad, M., Montazeri, P., Márquez, S., Vrijheid, M., Draskau, M.K., Taxvig, C., Peinado, F.M., Berman, T., Frederiksen, H., Fernández, M. F., Marie Vinggaard, A., Andersson, A.-M., 2023. Benzophenone-3: comprehensive review of the toxicological and human evidence with meta-analysis of human biomonitoring studies. *Environ. Int.* 173, 107739. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107739>.
- Park, S.Y., Jeon, J.H., Jeong, K., Chung, H.W., Lee, H., Sung, Y.-A., Ye, S., Ha, E.-H., 2020. The association of ovarian reserve with exposure to bisphenol A and phthalate in Reproductive-aged women. *J. Korean Med. Sci.* 36. <https://doi.org/10.3346/jkms.2021.36.e1>.
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S.T., Howells, D.W., Karp, N.A., Lazić, S.E., Lidster, K., MacCallum, C.J., Macleod, M., Pearl, E.J., Petersen, O.H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E.S., Silberberg, S.D., Steckler, T., Würbel, H., 2020. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 40, 1769–1777. <https://doi.org/10.1177/0271678X20943823>.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>.
- Darbre, Philippa D., 2021. *Endocrine Disruption and Human Health*, 2nd Edition.
- Pivonello, C., Muscogiuri, G., Nardone, A., Garifalos, F., Provisiero, D.P., Verde, N., de Angelis, C., Conforti, A., Piscopo, M., Auriumma, R.S., Colao, A., Pivonello, R., 2020. Bisphenol A: an emerging threat to female fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 18, 22. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0558-8>.
- Portelinha, T.C.G., Jahn, G.A., Hapon, M.B., Verdade, L.M., Piña, C.L., 2015. Hormone levels and ultrasound evaluation of *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae) ovulation. *South Am. J. Herpetol.* 10, 23–31. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-14-00030.1>.
- Rebholz, S.L., Jones, T., Burke, K.T., Jaeschke, A., Tso, P., D'Alessio, D.A., Woollett, L.A., 2012. Multiparity leads to obesity and inflammation in mothers and obesity in male offspring. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E449–457. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00487.2011>.
- Richardson, B.E., Lehmann, R., 2010. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 37–49. <https://doi.org/10.1038/nrm2815>.
- Rodríguez, H.A., Santambrosio, N., Santamaria, C.G., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E.H., 2010. Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the

V. Galliani et al.

Environmental Toxicology and Pharmacology 119 (2025) 104821

- rat ovary. *Reprod. Toxicol.* 30, 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.07.008>.
- Rusidzė, M., Gargas, A., Febrissy, C., Dubucs, C., Weyl, A., Ousselin, J., Aziza, J., Arnal, J. F., Lenfant, F., 2023. Estrogen actions in placental vascular morphogenesis and spiral artery remodelling: a comparative view between humans and mice. *Cells* 12, 620. <https://doi.org/10.3390/cells12040620>.
- Santamaría, C.G., Meyer, N., Schumacher, A., Zenchussen, M.L., Teglia, C.M., Cutiloni, M. J., Zenchussen, A.C., Rodríguez, H.A., 2020. Dermal exposure to the UV filter benzophenone-3 during early pregnancy affects fetal growth and sex ratio of the progeny in mice. *Arch. Toxicol.* 94, 2847–2859. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02776-5>.
- Santamaría, C.G., 2016. Efectos de la exposición perinatal a perturbadores endocrinos sobre el desarrollo ovárico y la fertilidad de la hembra [dissertation]. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Santamaría, C.G., Rodríguez, H.A., Abud, J.E., Rivera, O.E., Muñoz de Toro, M., Luque, E.H., 2017. Impaired ovarian response to exogenous gonadotropins in female rat offspring born to mothers perinatally exposed to bisphenol A. *Reprod. Toxicol.* 73, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.050>.
- Santamaría, C.G., Abud, J.E., Porporato, M.M., Meyer, N., Zenchussen, A.C., Kass, L., Rodríguez, H.A., 2019. The UV filter benzophenone 3, alters early follicular assembly in rat whole ovary cultures. *Toxicol. Lett.* 303, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.12.016>.
- Santamaría, C.G., Abud, J.E., Luque, E.H., Kass, L., Rodríguez, H.A., 2019. Culturing rat whole ovary for UV filter Benzophenone-3 treatment. *Curr. Protoc. Toxicol.* 82. <https://doi.org/10.1002/cpts.89>.
- Schalbetter, S.M., Mueller, F.S., Scarborough, J., Richetto, J., Weber Stadlbauer, U., Meyer, U., Notter, T., 2021. Oral application of clozapine-N-oxide using the micropipette-guided drug administration (MDA) method in mouse DREADD systems. *Lab Anim.* 50, 69–75. <https://doi.org/10.1038/s41684-021-00723-0>.
- Silva, E.L., Mínguez-Alarcón, L., Coull, B., Hart, J.E., James-Todd, T., Calafat, A.M., Ford, J.B., Hauser, R., Mahalingaiah, S., 2024. Urinary benzophenone-3 concentrations and ovarian reserve in a cohort of subfertile women. *Fertil. Steril.* 122, 494–503. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2024.04.032>.
- Souter, I., Smith, K.W., Dimitriadis, I., Ehrlich, S., Williams, P.L., Calafat, A.M., Hauser, R., 2013. The association of bisphenol A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments. *Reprod. Toxicol.* 42, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.09.008>.
- Tzotoua, Z., Dourou, P., Diamanti, A., Harizopoulou, V., Papalexis, P., Karampas, G., Liepinaitienė, A., Dedele, A., Sarantaki, A., 2025. Associations between endocrine-disrupting chemical exposure and fertility outcomes: a decade of human epidemiological evidence. *Life (Basel)* 15, 993. <https://doi.org/10.3390/life15070993>.
- Ullah, Sana, Ahmad, S., Guo, X., Ullah, Saleem, Ullah, Sana, Nabi, G., Wanghe, K., 2023. A review of the endocrine disrupting effects of micro and nano plastic and their associated chemicals in mammals. *Front. Endocrinol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1084236>.
- Vanhecke, D., Bugada, V., Steiner, R., Polić, B., Buch, T., 2024. Refined tamoxifen administration in mice by encouraging voluntary consumption of palatable formulations. *Lab Anim.* 53, 205–214. <https://doi.org/10.1038/s41684-024-01409-z>.
- Vicente, J.S., Marco-Jiménez, F., Pérez García, M., Naturil-Alfonso, C., Penaranda, D.S., Viudes de Castro, M.P., 2022. Oocyte quality and in vivo embryo survival after ovarian stimulation in nulliparous and multiparous rabbit does. *Theriogenology* 189, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.003>.
- Wang, J., Ganley, C.J., 2019. Safety threshold considerations for sunscreen systemic exposure: a simulation study. *Clin. Pharm. Ther.* 105, 161–167. <https://doi.org/10.1002/cpt.1178>.
- Wei, J., Carroll, R.J., Harden, K.K., Wu, G., 2012. Comparisons of treatment means when factors do not interact in two factorial studies. *Amino Acids* 42, 2031–2035. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0924-0>.
- Weinberger, B., Vetrano, Anna M., Archer, Faith E., Marcella, Stephen W., Buckley, Brian, Wartenberg, Daniel, Robson, Mark G., Klini, Jammie, Azhar, Sana, Cavin, Sarah, Wang, Lu, Rich, David Q., 2013. Effects of maternal exposure to phthalates and bisphenol A during pregnancy on gestational age. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 27. <https://doi.org/10.3109/14767058.2013.815718>.
- Wnuk, W., Michalska, K., Krupa, A., Pawlak, K., 2022. Benzophenone-3, a chemical UV-filter in cosmetics: is it really safe for children and pregnant women? *Adv. Dermatol. Allergol.* 39, 26–33. <https://doi.org/10.5114/ada.2022.113617>.

Anexo VI: Galliani et al., 2026

Toxicological Sciences



Toxicological Sciences

Impaired in vitro follicle maturation and ovulation following Bisphenol A exposure

Journal:	<i>Toxicological Sciences</i>
Manuscript ID:	TOXSCI-26-0065
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	21-Jan-2026
Complete List of Authors:	Valentina, Galliani ; CONICET Santa Fe, Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL); Universidad Nacional del Litoral (UNL), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) Berli, Claudio; UNL-CONICET), Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC Teglia, Carla ; Universidad Nacional del Litoral Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría (LADAQ); CONICET Santa Fe Gutiérrez, Fabiana; Universidad Nacional del Litoral Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría (LADAQ); CONICET Santa Fe Julián E., Abud ; CONICET Santa Fe, Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL); Universidad Nacional del Litoral (UNL), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) Rodríguez, Horacio; CONICET Santa Fe, Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL); Universidad Nacional del Litoral Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Cátedra de Fisiología Humana
Category - Please select one category that is most applicable to your manuscript.:	Endocrine Toxicology
Key Words:	Bisphenol A, Ovulation, Estrogen receptor beta, 3D follicle culture, Follicular maturation, Steroidogenesis

SCHOLARONE™
Manuscripts