Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

# El arsenito de sodio, un disruptor endócrino que afecta el eje reproductivo y la homeostasis de la glucosa

Bourguignon, Nadia Soledad

2014-12-18

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Bourguignon, Nadia Soledad. (2014-12-18). El arsenito de sodio, un disruptor endócrino que afecta el eje reproductivo y la homeostasis de la glucosa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Bourguignon, Nadia Soledad. "El arsenito de sodio, un disruptor endócrino que afecta el eje reproductivo y la homeostasis de la glucosa". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-12-18.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

**Dirección:** Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

**Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

# El arsenito de sodio, un disruptor endócrino que afecta el eje reproductivo y la homeostasis de la glucosa

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Lic. Nadia Soledad Bourguignon**

**Director de tesis:** Dr. Carlos Libertun

**Director Asistente:** Dra. María Silvia Bianchi

**Consejero de estudios:** Dr. Juan Carlos Calvo

**Lugar de Trabajo:** Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) – CONICET

**Fecha:** Buenos Aires, 2014

# RESUMEN


## EL ARSENITO DE SODIO, UN DISRUPTOR ENDÓCRINO QUE AFECTA EL EJE REPRODUCTIVO Y LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

La contaminación con As (As) en el agua de bebida se considera una amenaza para la salud en todo el mundo, ya que está asociado a un mayor riesgo de contraer enfermedades como cáncer de piel y pulmón, provocar efectos indeseables sobre el desarrollo, la reproducción las secreciones internas y alteraciones cardiovasculares.

Debido a que el As puede actuar como un disruptor endócrino aquí investigamos el efecto de la exposición a As, durante períodos críticos del desarrollo neuroendócrino como es la gestación y las semanas postparto, sobre el eje reproductivo y el metabolismo de la glucosa, en las madres y sus crías.

Se administraron 5 (A5) o 50 ppm (A50) de arsenito de sodio en el agua de bebida a ratas *Sprague Dawley* preñadas, desde el día 1 de gestación hasta el sacrificio (2 meses postparto). Al destete, se dividieron las crías en dos grupos: uno continuó recibiendo el mismo tratamiento que la madre y el otro recibió agua destilada hasta el día del sacrificio (4 meses).

En las madres, la exposición a As produjo alteraciones en la homeostasis de la glucosa durante la preñez, probablemente alterando la funcionalidad de las células β, incrementando el riesgo de desarrollar diabetes gestacional. Además, alteró la fisiología reproductiva, sugiriendo el desarrollo de una falla ovárica prematura. Las crías expuestas a As durante el desarrollo presentaron alteraciones en la fisiología reproductiva, principalmente las hembras, mientras que el metabolismo de la glucosa no se vio afectado.



**Palabras clave:** arsenito de sodio; disruptor endócrino; reproducción; metabolismo de la glucosa; madres; crías.

# ABSTRACT

## SODIUM ARSENITE, AN ENDOCRINE DISRUPTOR THAT AFFECTS THE REPRODUCTIVE AXIS AND GLUCOSE HOMEOSTASIS

Arsenic contamination in drinking water is considered a worldwide threat to health, that is associated with an increased risk of diseases such as skin and lung cancer, cause undesirable effects on development, internal reproduction secretions and cardiovascular disorders.

Because As can act as an endocrine disruptor, here we investigated the effect of As exposure, during critical periods of neuroendocrine development as gestation and postnatal weeks, on the reproductive axis and metabolism of glucose in dams and their offspring.

We administered 5 (A5) or 50 ppm (A50) of sodium arsenite in drinking water to Sprague Dawley rats from gestational day 1 until sacrifice (two months postpartum). At weaning the offspring were divided in two groups: one of each continued to receive the same treatment and the other one received distilled water until sacrifice (4 months of age).

In dams, As exposure induces glucose homeostasis alterations during pregnancy, probably by altering β-cell function, increasing the risk of developing gestational diabetes. In addition, profoundly impaired reproductive physiology, suggesting premature ovarian failure due to arsenic exposure, may have developed. Offspring rats exposed to arsenic during development present altered reproductive physiology, mainly females, while metabolism is not affected.



**Keywords**: arsenic; endocrine disruptor; Glucose metabolism; Reproduction; dams; offspring.

**Parte de los resultados presentados en esta Tesis de Doctorado dieron origen, hasta hoy, a los siguientes trabajos científicos:**

**2014** Effects of sodium arsenite exposure on reproductive axis and glucose metabolism in: I) Pregnant and postlactational dams.

Nadia Soledad Bourguignon*, María Marta Bonaventura*, Diego Rodríguez, Marianne Bizzozzero, Carlos Libertun, Victoria Adela Lux-Lantos.
*Contributed equally.
ENVIADO PARA SU EVALUACIÓN.

**2014** Effects of sodium arsenite exposure on reproductive axis and glucose metabolism in: II) Offspring exposed from conception to adulthood.

Nadia Soledad Bourguignon, María Marta Bonaventura, Diego Rodríguez, Marianne Bizzozzero, Victoria Adela Lux-Lantos, Carlos Libertun.
ENVIADO PARA SU EVALUACIÓN.

# ÍNDICE

**INTRODUCCIÓN GENERAL** ..... **6**

PARTE A: EL SISTEMA HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-GONADAL ..... 8

A.1. EL HIPOTÁLAMO ..... 9

A.2. LA HIPÓFISIS ..... 12

A.3. LAS GÓNADAS ..... 15

A.3.1. El ovario ..... 16

Ciclo Ovárico ..... 17

Ciclo Estral ..... 21

Regulación del ciclo ovárico/estral ..... 23

A.3.2. El testículo ..... 27

A.4. REGULACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISO-GONADAL ..... 28

A.4.1. GnRH ..... 29

A.4.2. Esteroides gonadales ..... 32

PARTE B: REGULACIÓN DE LA GLUCEMIA ..... 33

B.1. EL PÁNCREAS ENDÓCRINO ..... 33

B.2. INSULINA ..... 35

B.3. GLUCAGON ..... 36

B.4. CONTROL HORMONAL DE LA GLUCEMIA ..... 38

B.5. ALTERACIONES DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA ..... 41

PARTE C: DISRUPTORES ENDÓCRINOS ..... 43

C.1. EL ARSÉNICO ..... 44

C.2. ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN DE ARSÉNICO ..... 47

C.3. FUENTES DE EXPOSICIÓN EN EL HUMANO ..... 47

C.4. ARSÉNICO EN EL AGUA DE BEBIDA ..... 48

C.5. METABOLISMO DEL ARSÉNICO ..... 50

C.6. DISTRIBUCIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS CON ARSÉNICO EN EL MUNDO ..... 53

C.7. AGUAS ACONTAMINADAS CON ARSÉNICO EN ARGENTINA ..... 54

C.8. HIDROARSENICISMO CRÓNICO REGIONAL ENDÉMICO (HACRE) ..... 56

C.9. EL ARSÉNICO COMO DISRUPTOR ENDÓCRINO ..... 56

C.10. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ARSÉNICO ..... 57

C.10.1. Estrés oxidativo ..... 58

C.11. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO EN EL HUMANO ..... 59

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES** ..... **61**

HIPÓTESIS ..... 61

OBJETIVOS ..... 61
OBJETIVO GENERAL ..... 61
OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 61

**MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES ..... 62**

ANIMALES ..... 62
MODELO EXPERIMENTAL ..... 62
PREPARACIÓN DEL ARSENITO DE SODIO ..... 63
MEDICIÓN HORMONAL POR RADIOINMUNOENSAYO (RIA) ..... 63
OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS ..... 63
Sueros ..... 63
Tejidos ..... 64
RIA DE HORMONAS PROTEICAS ..... 65
RIA de hormona luteinizante (LH) ..... 65
RIA de hormona folículo estimulante (FSH) ..... 67
RIA de prolactina (PRL) ..... 67
RIA de glucagon ..... 69
RIA de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) ..... 69
RIA DE HORMONAS ESTEROIDEAS ..... 71
RIA de estradiol ($E_2$) ..... 71
RIA de progesterona ($P_4$) ..... 72
RIA de testosterona (T) ..... 73
PRUEBA DE GNRH IN VIVO ..... 74
EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN PULSÁTIL DE GNRH ..... 74
DETERMINACIONES METABÓLICAS ..... 75
GLUCEMIA ..... 75
TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (TTG) ..... 75
TEST DE TOLERANCIA A LA INSULINA (TTI) ..... 75
ÍNDICE HOMA de RESISTENCIA A LA INSULINA (HOMA-IR) ..... 76
DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN HÍGADO ..... 76
ANÁLISIS ESTADÍSTICO ..... 76

**CAPÍTULO I – ESTUDIOS EN MADRES ..... 77**

I.A. INTRODUCCIÓN I ..... 77
ENDOCRINOLOGíA DURANTE LA PREÑEZ ..... 77
IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA ..... 78
CAMBIOS METABÓLICOS EN LA PREÑEZ ..... 79
ARSÉNICO Y PREÑEZ ..... 80

I.B. OBJETIVO CAPÍTULO I ..... 81
I.C. MATERIALES Y MÉTODOS I ..... 82
MODELO EXPERIMENTAL ..... 82
ESTUDIOS REPRODUCTIVOS ..... 84
Performance reproductiva ..... 84
Niveles de hormonas esteroideas ..... 84
Niveles de hormonas proteicas ..... 84
Ciclo estral ..... 85
Contenido hipotalámico de GnRH ..... 85
Estudio de liberación pulsátil de GnRH ..... 85
Respuesta hipofisaria a GnRH *in vivo* ..... 85
Morfología e histología ovárica ..... 85
ESTUDIOS METABÓLICOS ..... 86
Test de tolerancia a la glucosa (TTG) ..... 86
Test de tolerancia a la insulina (TTI) ..... 86
Niveles de hormonas proteicas ..... 86
Índice HOMA de resistencia a la insulina (HOMA-IR) ..... 87
ESTRÉS OXIDATIVO ..... 87
Peroxidación lipídica ..... 87
Actividad de la enzima catalasa ..... 88
Contenido de GSH ..... 88
DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN HÍGADO ..... 89
I.D. RESULTADOS – DURANTE LA PREÑEZ ..... 90
PESO CORPORAL ..... 90
ESTUDIOS REPRODUCTIVOS ..... 91
Performance reproductiva ..... 91
Niveles séricos de hormonas esteroideas ..... 92
Peso ovárico y placentario ..... 93
Contenido ovárico de hormonas sexuales ..... 95
Peso de la glándula adrenal ..... 95
Niveles séricos de gonadotrofinas y prolactina ..... 96
ESTUDIOS METABÓLICOS ..... 97
Test de tolerancia a la glucosa (TTG) ..... 97
Niveles de insulinemia y glucemia en ayuno ..... 98
HOMA-IR ..... 99
Niveles séricos de insulina y glucagon ..... 99
Contenido pancreático de insulina y glucagon ..... 100
I.E. RESULTADOS- DURANTE EL POSTPARTO ..... 101

PESO CORPORAL ..... 101
ESTUDIOS REPRODUCTIVOS ..... 101
Performance reproductiva ..... 101
Ciclo estral ..... 102
Niveles séricos de hormonas sexuales ..... 103
Niveles séricos de gonadotrofinas ..... 104
Contenido hipotalámico de GnRH ..... 105
Evaluación de la liberación pulsátil de gnrh ..... 106
Respuesta hipofisaria a GnRH *in vivo* ..... 108
Niveles séricos de prolactina ..... 109
Peso de la glándula adrenal ..... 109
Peso ovárico ..... 110
Morfología ovárica ..... 110
ESTUDIOS METABÓLICOS ..... 114
Test de tolerancia a la glucosa (TTG) ..... 114
Test de tolerancia a la insulina (TTI) ..... 115
ESTRÉS OXIDATIVO ..... 116
CONTENIDO DE ARSÉNICO TOTAL EN HÍGADO ..... 118
I.F. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES I ..... 119

**CAPITULO II – ESTUDIOS EN CRÍAS ..... 128**

II.A. INTRODUCCIÓN II ..... 128
DIFERENCIACIÓN DEL SISTEMA REPRODUCTIVO ..... 128
ARSÉNICO Y CRÍAS ..... 130
II.B. OBJETIVO CAPÍTULO II ..... 131
II.C. MATERIALES Y MÉTODOS II ..... 132
MODELO EXPERIMENTAL ..... 132
ESTUDIOS REPRODUCTIVOS ..... 135
Marcadores de desarrollo sexual ..... 135
Distancia anogenital (AGD) ..... 135
Descenso testicular (DT) y apertura vaginal (AV) ..... 135
Ciclo estral ..... 135
Niveles de hormonas esteroideas ..... 135
Niveles de hormonas proteicas ..... 136
Contenido hipotalámico de GnRH ..... 136
Estudio de liberación pulsátil de GnRH ..... 136
Respuesta hipofisaria a GnRHGnRH *in vivo* ..... 136
ESTUDIOS METABÓLICOS ..... 137

Test de tolerancia a la glucosa (TTG) ..... 137
Test de tolerancia a la insulina (TTI) ..... 137
Niveles de hormonas proteicas ..... 137
Índice HOMA de resistencia a la insulina (HOMA-IR) ..... 137
DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN HÍGADO ..... 137
II.D. RESULTADOS II ..... 138
PESO CORPORAL ..... 138
ESTUDIOS REPRODUCTIVOS ..... 139
Distancia anogenital ..... 139
Marcadores de inicio de la pubertad ..... 140
Niveles séricos de hormonas sexuales ..... 141
Niveles séricos de gonadotrofinas ..... 143
Peso gonadal ..... 144
Contenido ovárico de esteroides sexuales ..... 145
Ciclo estral ..... 146
Contenido hipotalámico de GnRH ..... 146
Evaluación de la liberación pulsátil de GnRH ..... 147
Respuesta hipofisaria a GnRH *in vivo* ..... 150
Niveles séricos de prolactina ..... 151
peso de la glándula adrenal ..... 152
ESTUDIOS METABÓLICOS ..... 152
Test de tolerancia a la glucosa (TTG) ..... 153
Test de tolerancia a la insulina (tti) ..... 154
Insulinemia y glucemia en ayuno – HOMA-IR ..... 155
CONTENIDO DE ARSÉNICO TOTAL EN HÍGADO ..... 155
II.E. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES II ..... 157
**DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES ..... 164**
**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 175**

# INTRODUCCIÓN GENERAL

El **arsénico** (As) es un compuesto que produce preocupación en nuestro país y el mundo, debido a su amplia distribución y los efectos adversos para la salud en los organismos vivos. Se encuentra naturalmente en la corteza de la Tierra, y puede contaminar las fuentes de agua potable, aumentando sus niveles por la erosión y la minería. Altas concentraciones de As se han registrado en aguas de todo el mundo, incluyendo numerosas provincias argentinas. Para la población general, la principal fuente de exposición de As es el agua potable (National Research Council 2001). El consumo de As a través del agua y los alimentos produce una entidad nosológica llamada **Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE)**. Ésta se caracteriza por presentar lesiones en la piel y alteraciones sistémicas cancerosas y no cancerosas.

Según la Organización Mundial de la Salud, el límite permisible de As en el agua potable es de 0,01mg/L, que es equivalente a **10 ppb o 0.01 ppm** (Chakraborti et al. 2002; Walker and Fosbury 2009). Sin embargo, recientemente se ha informado de que existe un riesgo de toxicidad incluso a esta concentración (Bodwell et al. 2004). De todas formas una gran población en todo el mundo está expuesta a niveles mucho más altos de As(Guo et al. 2001; Kristoforovic-Ilic et al. 2009). En el año 2000 se estimaba que más de dos millones de personas en Argentina estaban potencialmente expuestas a la ingestión de aguas con más de 0.05 ppm de As y otros tantos estarían expuestos a concentraciones algo menores. El área afectada se extiende en un continuo noroeste-sureste desde el Altiplano hacia la costa atlántica.

La ingesta crónica de As está también fuertemente asociada, entre otros, con un aumento en el riesgo de contraer patologías endócrinas, metabólicas, reproductivas y del desarrollo (Navas-Acien et al. 2006; DeSesso et al. 1998). Es por ello que se considera que el As también podría actuar como un potente disruptor endócrino, alterando la transcripción de genes mediada por el complejo receptor-hormona activado en dosis muy bajas, tanto en cultivos celulares como modelos animales (Davey et al. 2007; Kaltreider et al. 2001). Chattopadhyay y col. han reportado que el

As afecta la esteroidogénesis ovárica de ratas maduras a dosis de 0,4 mg/L en el agua potable (Chattopadhyay et al. 2003).

Durante el período gestacional, la exposición a As puede causar alteraciones a la madre y al feto, ya que puede atravesar la placenta (Concha et al. 1998b). Estudios recientes han demostrado que el As puede producir efectos reproductivos adversos en el humano (Hopenhayn et al. 2003), incluyendo un aumento en el riesgo de pérdida fetal, malformaciones congénitas, nacimientos prematuros y mortalidad neonatal, así como también bajo peso al nacimiento (Hopenhayn-Rich et al. 2000; Ahmad et al. 2001; Kapaj et al. 2006; Rahman et al. 2009b), a bajos niveles de exposición. El As también produce efectos tóxicos en los roedores (Chattopadhyay et al. 2001; DeSesso 2001; Holson et al. 2000).

Debido a su importancia nacional y mundial, aquí nos propusimos evaluar los efectos de este contaminante ambiental natural, en distintos modelos animales que exploran el efecto del As a edades críticas. Nos dedicaremos a lo largo de este trabajo a determinar si la exposición en el agua de bebida a este metaloide, en períodos importantísimos del desarrollo neuroendócrino, gestación y meses postparto, produce efectos adversos, en madres y sus crías, en la regulación del eje reproductivo y la homeostasis de la glucosa. En primer lugar, profundizaremos los conceptos teóricos y luego nos adentraremos en la metodología utilizada y los resultados obtenidos.

## PARTE A: EL SISTEMA HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-GONADAL

Los organismos pluricelulares complejos requieren sistemas de coordinación que puedan regular e integrar las funciones de los diferentes tipos de células. Los dos sistemas de coordinación que han evolucionado son el sistema nervioso y el sistema endócrino. El primero utiliza señales eléctricas para transmitir muy rápidamente la información entre células, mientras que el segundo utiliza señales químicas, las hormonas. Estas últimas, son producidas por un tipo particular de células y circulan por el torrente sanguíneo hasta otras células blanco, sobre las que ejercen un efecto regulador.

Los sistemas nervioso y endócrino están estrechamente relacionados. Muchas neuronas son capaces de secretar hormonas. Esto se conoce como neurosecreción y se observa, por ejemplo, en el hipotálamo, que secreta hormonas a los vasos sanguíneos portales hipofisarios especializados. A través de éstos, las hormonas liberadoras llegan a la adenohipófisis, donde modifican la síntesis, almacenamiento y secreción de sus hormonas. Las hormonas de la neurohipófisis también son sintetizadas y secretadas por otro grupo neuronas hipotalámicas (PococK and Richards 2002).

La unidad hipotálamo-hipofisaria es un elemento esencial en el control del eje hipófiso-gonadal a lo largo de la vida. Esta unidad es altamente sensible a las acciones organizativas de los esteroides sexuales que tienen lugar durante períodos tempranos y críticos del desarrollo y resultan en efectos funcionales perdurables(Tena-Sempere et al. 2000). La disrupción de los procesos normales de organización funcional de la unidad hipotálamo-hipofisaria resulta en alteraciones (inmediatas o diferidas) del eje neuroendócrino de la reproducción, que pueden conducir, entre otras, a alteraciones de la pubertad (precocidad, retraso) y ciertas formas de infertilidad.

## A.1. EL HIPOTÁLAMO

El hipotálamo (HT) es la estructura fundamental que monitorea el medio interno (estado metabólico, hormonal, etc.) y externo (luz, temperatura, presencia del sexo opuesto, etc.), siendo en los organismos superiores, el principal centro integrador de los estímulos que recibe de otras áreas del SNC, así como de los niveles de hormonas circulantes (Levine 2000).

Esta estructura es de origen neuroectodérmico (surge por evaginación del piso diencefálico) y se extiende bajo el tálamo, comprendiendo la zona gris que rodea ventralmente al tercer ventrículo. Su límite anterior es el plano frontal que atraviesa la comisura anterior, y su límite posterior, el plano que atraviesa por detrás de los cuerpos mamilares, los cuales funcionalmente pertenecen al sistema límbico.

Lateralmente limita con el tálamo ventral, el ansa peduncularia, la cápsula interna, el globus pallidus y el tracto óptico. La zona lateral del hipotálamo es rica en fibras nerviosas y su celularidad no se agrega en núcleos definidos(Silverman and Pickard 1983). Ventralmente adquiere una disposición infundibular que se continúa con el tallo hipofisario. Entre el *infundibulum* y el tallo, hay una pequeña prominencia de gran relevancia fisiológica, la eminencia media del *tuber cinereum* (EM). Las neuronas hipotalámicas en algunos casos constituyen núcleos bien definidos y, en otros, acúmulos de límites poco netos, existiendo variaciones según la especie estudiada. Dentro del HT pueden reconocerse cuatro regiones principales, organizadas rostro-caudalmente en: área preóptica, hipotálamo anterior, hipotálamo medio e hipotálamo posterior(Palkovits 2000). Los núcleos más relevantes de las mismas son:

**Área preóptica (APO):** el núcleo preóptico medial, con neuronas secretoras de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) que proyectan hacia la eminencia media en la mayoría de los mamíferos. Esta área incluye al núcleo dimórfico sexual. Aunque embriológicamente el área preóptica no forma parte del hipotálamo, dado que se origina en el telencéfalo, funcional y topográficamente se considera parte del hipotálamo neuroendócrino.

**Hipotálamo anterior (HA):** el núcleo periventricular (proyecta a la EM) y dentro de éste se encuentra el núcleo antero ventro periventricular (AVPV), donde se alojan las neuronas que secretan kisspeptina que interactúan con las de GnRH, y los núcleos supraóptico, paraventricular (proyectan fundamentalmente hacia el lóbulo neural) y supraquiasmático (reloj biológico para las regulaciones neuroendocrinas).

**Hipotálamo medio (HM):** en él se reconocen tres partes: el hipotálamo medio basal (HMB), el dorsal (HMD) y el lateral (LHT). Esta región incluye a la EM y a los núcleos arcuato (ARC), ventromedial (VMN) y dorsomedial (DMN) que proyectan hacia la EM.

**Hipotálamo posterior (HP):** aquí se encuentran los cuerpos mamilares. El núcleo premamilar ventral proyecta hacia la EM.

El hipotálamo utiliza una compleja regulación de la actividad neuronal de sus núcleos para llevar a cabo su función de procesamiento de la información entrante. En ella intervienen neuronas que actúan mediante una notable diversidad de neurotransmisores: aminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, opiáceos, peptidérgicos, GABAérgicos, aminoacídicos, etc. (Malven 2000).

Las conexiones neurales del HT son múltiples y complejas siendo en su mayoría recíprocas, formando circuitos dentro de los núcleos celulares hipotálamicos, entre varios núcleos y áreas hipotalámicas, como también entre regiones hipotalámicas y diferentes regiones extrahipotalámicas (Halasz 2000; Palkovits 2000). Las conexiones del hipotálamo más conocidas son las vías eferentes que lo comunican con la hipófisis (**Figura 1**): los tractos supraóptico y paraventrículo hipofisarios que atraviesan la zona interna de la EM llegando a la HP; fibras que se originan en APO, AVPV, núcleo pariventricular y núcleo ARC y llegan a la zona externa de la EM, en estrecho contacto con los capilares del plexo portal primario superior.

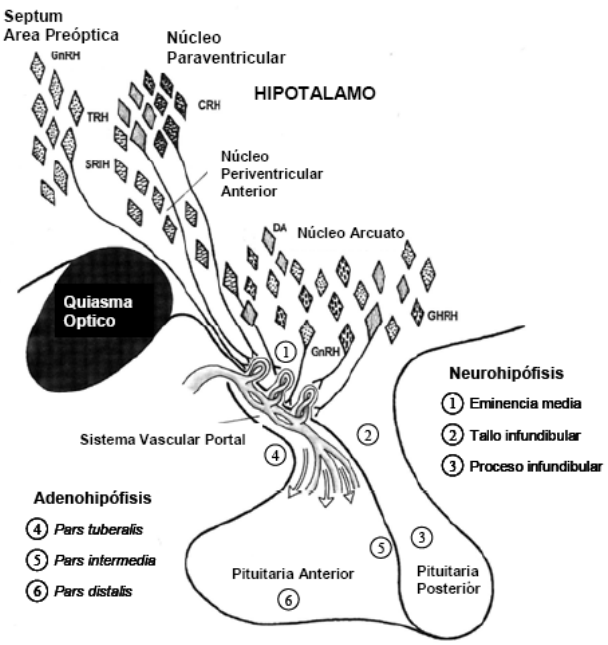



**Figura 1.** Mecanismos neurohormonales que controlan la función de la adenohipófisis**.** Tomado de Pocock (PococK and Richards 2002).

La información entrante a través de vías humorales y neurales es registrada, analizada e integrada en neuronas hipotalámicas, donde se elabora una respuesta que en parte es canalizada hacia otros centros del encéfalo y en parte hacia la hipófisis, traduciéndose en cambios, si fueran necesarios, en las secreciones hormonales, estado comportamental y actividad autónoma (Levine 2000).

Algunas neuronas hipotalámicas responden liberando, de manera pulsátil, diferentes neurohormonas que regulan la síntesis, almacenamiento y secreción de las hormonas tróficas adenohipofisarias. Estas neurohormonas se denominan hormonas liberadoras o inhibitorias según su propiedad de estimular o inhibir la actividad secretoria de la hipófisis respectivamente. La mayoría de estas neurohormonas son oligo o polipéptidos sintetizados en núcleos hipotalámicos discretos (Arimura 2004; Fink 2000), algunos de los cuales también actúan como neurotransmisores o neuromoduladores en el sistema nervioso central. En una misma neurona o núcleo pueden sintetizarse y coexistir diferentes tipos de neuropéptidos. Las neurohormonas hipofisotróficas más conocidas son: la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), la hormona liberadora de

tirotrofina (TRH), la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), la hormona inhibitoria de la liberación de hormona de crecimiento (somatostatina), la dopamina, inhibidora de la liberación de prolactina (PRL), entre otras.

## A.2. LA HIPÓFISIS

La hipófisis es un cuerpo pequeño, bilobulado, situado en la base del cerebro, ubicado sobre una depresión en la base del cráneo llamada silla turca del esfenoide. Se ubica por debajo del hipotálamo, con el que se conecta por un tallo o pedículo, y se extiende hacia abajo desde el diencéfalo. Esta glándula está compuesta por dos estructuras embriológica y funcionalmente diferentes, la **neurohipófisis** o hipófisis posterior y la **adenohipófisis** o hipófisis anterior, que se encuentran adheridas en roedores y humanos (Page 1988).

La neurohipófisis es de origen neuroectodérmico y se origina a partir de la evaginación del piso diencefálico del tercer ventrículo (proyección del HT) y se diferencia en tres subdivisiones: la EM, importante para la integración del eje hipotálamo-adenohipofisario; el tallo infundibular, el cual contiene terminales axónicas secretoras de GnRH, entre otras hormonas liberadoras e inhibidoras de hormonas hipofisotróficas; y por último, el proceso infundibular o *pars nervosa***,** lugar donde termina el tracto dopaminérgico túbero-hipofisario y otros sistemas conteniendo diferentes neurotransmisores, como ser el del ácido γ aminobutírico (GABA) (PococK and Richards 2002) (**Figura 2**).

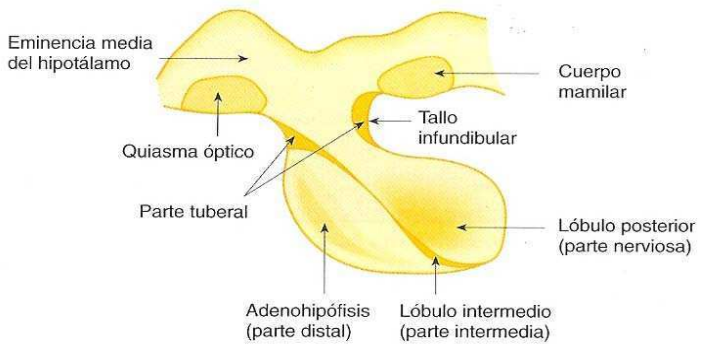



**Figura 2.** Estructura de la Hipófisis. Tomado de Pockock (PococK and Richards 2002).

La **adenohipófisis** es la porción glandular del cuerpo hipofisario. Existen dos teorías sobre el origen de esta glándula. En la teoría más antigua se postula que la HF surge de tejido ectodérmico que evagina del *stomadeum* de la boca primitiva: la bolsa de Rathke. Sin embargo existe otra teoría que dice que la HF se origina a partir de un placode neurohipofisiario, al borde de la placa neural, que luego se invagina. En ambos casos, el origen sigue siendo ectodérmico. Esta estructura se subdivide en tres regiones anatómicas: *pars distalis*, *pars tuberalis* y *pars intermedia* (Gartner L P and Hiatt J L 1997). Tanto la *Pars Tuberalis* como la *Pars Intermedia* tienen un desarrollo diferencial según la especie, estando poco desarrolladas en humanos, distinguibles sólo en períodos embrionarios y diferenciadas en rata y ratón.

La *Pars Tuberalis* está compuesta por células secretoras de diversas hormonas, principalmente por gonadotrofos (secretores de gonadotrofinas), corticotrofos (secretores de adrenocorticotrofina (ACTH)) y tirotrofos (secretores de tirotrofina (TSH)), que se disponen entre capilares fenestrados.

La *Pars Intermedia* está muy poco irrigada, pero se encuentra muy inervada por terminales de neuronas hipotalámicas adrenérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas, que contactan con células denominadas melanotrofos. Éstas últimas secretan mayoritaramente α-MSH (hormona estimulante de melanocitos) y otras melanocortinas (β-MSH, γ-MSH, CLIP, β-endorfina). La secreción de α -MSH es inhibida por las fibras dopaminérgicas provenientes del núcleo arcuato que forman parte del tallo neural(Fink 2000). La función principal de este lóbulo se relaciona con la pigmentación.

La *Pars Distalis* está compuesta por células epiteliales que se clasifican por sus productos secretorios específicos, dentro de las cuales encontramos a los gonadotrofos, células secretoras de gonadotrofinas: hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), los lactotrofos, células secretoras de prolactina (PRL), los somatotrofos, células secretoras de hormona de crecimiento (GH), corticotrofos células secretoras de corticotrofina (ACTH), tirotrofos, células secretoras de tirotropina (TSH) y las células folículoestrelladas (no son secretoras de hormonas), además de tejido conectivo y vascular.

A diferencia de la adenohipófisis, la neurohipófisis permanece conectada con el hipotálamo a través de un tracto nervioso (el tracto nervioso hipotálamo- hipofisario). La neurohipófisis secreta dos hormonas, la oxitocina y la hormona antidiurética o vasopresina (ADH), sintetizadas dentro de los cuerpos celulares de grandes neuronas que se extienden en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo. Son transportadas unidas a proteínas específicas, a lo largo de los axones de estas neuronas hasta las terminaciones nerviosas que se extienden dentro de la neurohipófisis. Antes de secretarse se almacenan en las propias terminaciones nerviosas o en las varicosidades (cuerpos de Hering) de los axones. Estas hormonas son secretadas a los capilares que perfunden el lóbulo neural como respuesta a los impulsos nerviosos originados en los núcleos supraóptico y paraventricular (PococK and Richards 2002).

En la **Figura 3** se esquematiza la relación entre el hipotálamo y la hipófisis, destacando las hormonas secretadas por esta última.

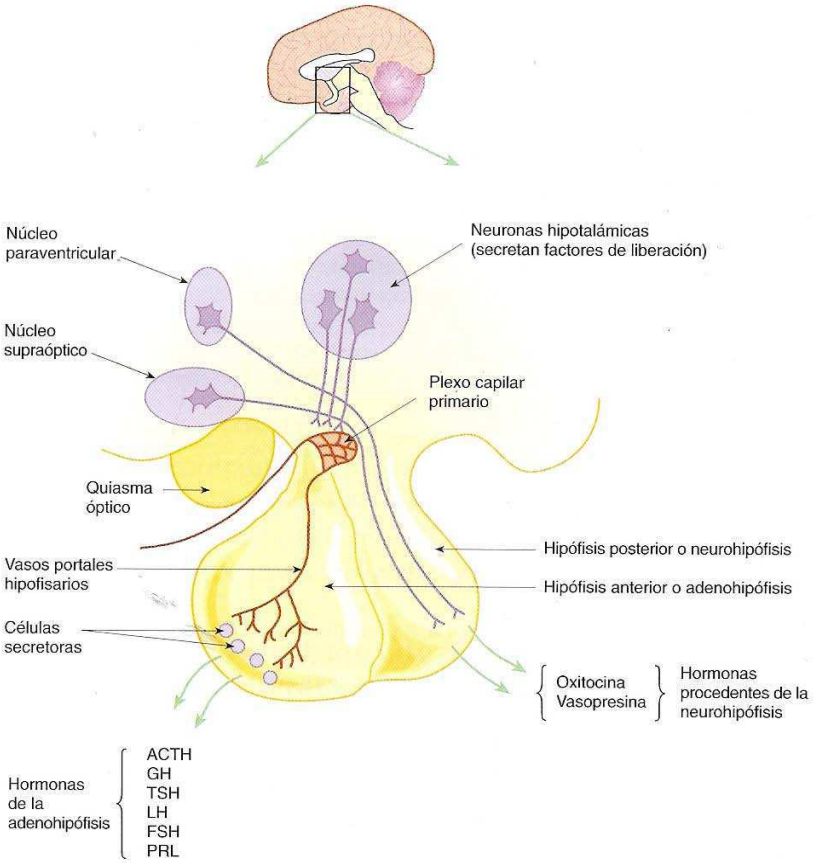



**Figura 3.** Relación entre hipotálamo e hipófisis. Tomado de Pockock (PococK and Richards 2002).

La hipófisis de los mamíferos se comunica con el SNC mediante conexiones vasculares y nerviosas. La regulación hipotalámica de la secreción de hormonas del lóbulo anterior de la adenohipófisis es fundamentalmente endocrina y se lleva a cabo mediante los sistemas portales hipofisarios (Halasz 2000).

La adenohipófisis no recibe un suministro arterial directo, sino que éste pasa a través de la neurohipófisis y la EM y llega a la glándula a través de una organización vascular llamada porta, caracterizada por la secuencia de: capilar-vaso-capilar, siendo los capilares fenestrados (Page 1988; Palkovits 2000).

La principal irrigación de la HF proviene de las arterias hipofisarias superiores que se capilarizan en la EM constituyendo el plexo capilar primario del sistema porta hipofisario superior o largo. A la capa externa de la EM llegan terminales axónicas que se originan de neuronas neurosecretoras estableciendo un estrecho contacto con estos capilares donde liberan sus contenidos. A partir de estos capilares se forman los vasos portales largos, que descienden por el tallo hipofisario hacia la *pars tuberalis* y la *pars distalis* donde se arborizan formando el plexo capilar secundario de este sistema porta hipofisario. De ambos sistemas porta hipofisarios emergen venas hipofisarias que drenan en los senos cavernosos. De esta manera las hormonas liberadas por la hipófisis alcanzan la circulación general y sus órganos blanco distantes.

Si bien el sentido principal de la circulación en el complejo hipotálamo-hipofisario es descendente, se ha descripto la existencia de vasos portales profundos en los cuales la sangre parece fluir desde la *pars distalis* hacia la EM. De esta manera, un flujo retrógrado llevaría hormonas adenohipofisarias a actuar negativamente sobre la secreción de las hormonas hipotalámicas (retroalimentación corta) según el estado hemodinámico del lecho vascular (Palkovits 2000).

## A.3. LAS GÓNADAS

El otro componente importante es la glándula efectora. En el caso del eje reproductivo, éstas son las gónadas, las cuales responden a las señales endocrinas de la hipófisis. A continuación mencionamos las características anatomo-funcionales de las gónadas para cada sexo.

### A.3.1. EL OVARIO

En los mamíferos, los ovarios son los órganos de almacenamiento y desarrollo de los ovocitos formados durante la vida embrionaria/fetal o cercana al nacimiento, y también el principal asiento de las células secretoras de hormonas femeninas en las hembras. Son glándulas pares, localizadas entre la pelvis, suspendidas por el ligamento ancho del útero mediante una inserción denominada mesovario, pliegue especial del peritoneo que transporta vasos sanguíneos hacia los ovarios. Está recubierto por un epitelio germinal cuboideo y por debajo, por la Túnica Albugínea, cápsula de tejido conectivo colagenoso denso (**Figura 4**) (Gartner L P and Hiatt J L 1997).

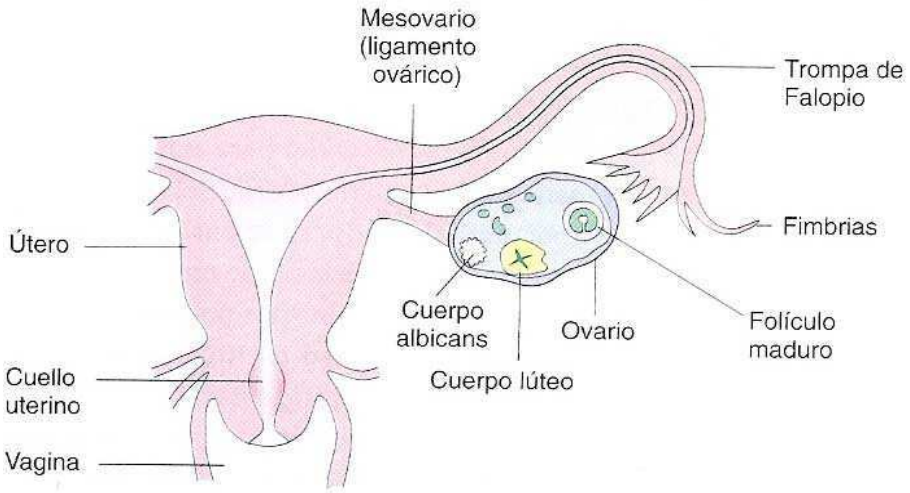



**Figura 4.** Relación entre el ovario, la trompa de Falopio y el útero. Tomado de Pocock(PococK and Richards 2002).

El ovario quiescente, en los mamíferos, es un ovoide pequeño y aplanado, de estructura compacta y con una superficie relativamente lisa (Driancourt et al. 1993). Cuando alcanza la edad reproductora, se presenta como uno de los órganos más dinámicos y con múltiples cambios morfológicos continuos (Robinson and Goy 1986). Se origina a partir de la cresta genital, que se surge como un engrosamiento de la esplacnopleura en el que también participan las células del mesénquima adyacente. Contienen células germinales, a partir de las cuales se formarán más tarde los óvulos. Cuando estas células se asientan en el ovario, se las denomina ovogonias (células

diploides), quienes sufren una división mitótica dando lugar a oocitos I (diploides). Éstos inician una división meiótica, arrestándose en Profase I. En los diferentes grados de maduración, el oocito estará rodeado por células foliculares, derivadas del tejido conjuntivo, formando los denominados folículos ováricos (Kardong K V 2007).

De esta forma, se puede dividir el parénquima del ovario en:

**Corteza ovárica**, periférica, compuesta por una red de conectivo llamado estroma, folículos ováricos en diversos estadíos de desarrollo y células del tipo fibroblastos;

**Médula ovárica**, central, que consiste en tejido conectivo laxo altamente vascularizado e inervado (Gartner L P and Hiatt J L 1997) (**Figura 5**).

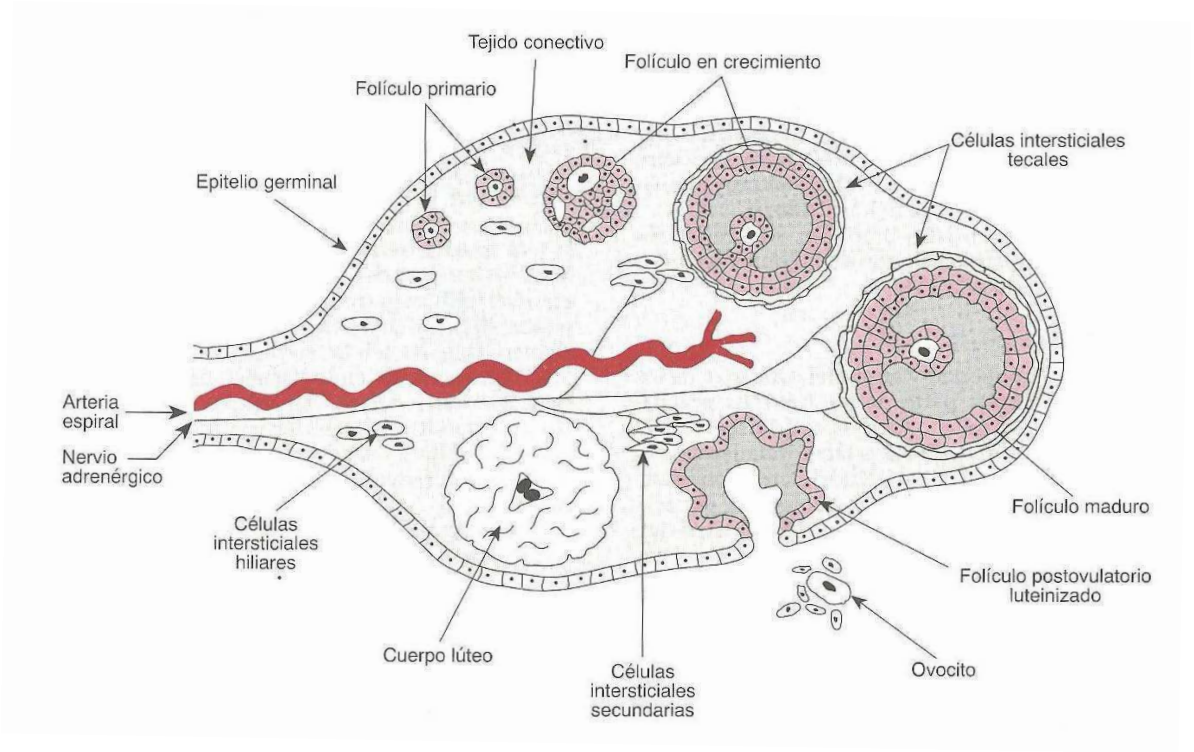
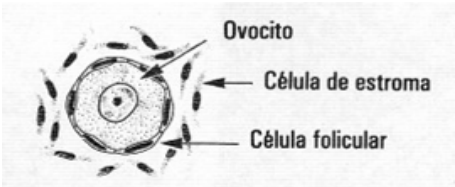



**Figura 5.** Esquema de la estructura del ovario. Tomado de J.A.F Tresguerres (Tresguerres 1992).

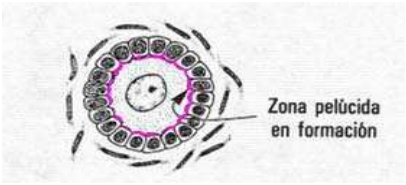
## CICLO OVÁRICO

En la mujer, en cada ciclo ovárico un folículo progresa a través de una serie de estadíos de desarrollo (foliculogénesis) que incluyen: crecimiento y maduración, ovulación, formación del cuerpo lúteo y, en ausencia de fecundación, degeneración. En

la mayoría de las mujeres, el ciclo menstrual dura entre 25 y 35 días. El desarrollo folicular o **foliculogénesis** es un proceso complejo, en el que múltiples interacciones endócrinas y parácrinas dentro del ovario, crean un cambio en el microambiente intrafolicular, para el apropiado desarrollo del oocito. En un principio, el *oocito I* es rodeado por células foliculares aplanadas y escamosas (**Figura 6**), formando el **folículo primordial** (a este estadío del oocito, frecuentemente se lo denomina vesícula germinal). Una cohorte de folículos primordiales son reclutados para iniciar su crecimiento, de los cuales sólo uno, normalmente, será seleccionado para ser ovulado en los seres humanos. El crecimiento del folículo primordial es independiente de las gonadotrofinas y es influenciado principalmente por factores endócrinos/parácrinos (Knight and Glister 2003), muchos de ellos producidos por el propio oocito y por las células de granulosa que lo rodean.




*Folículo Primordial*




*Folículo Primario*

**Figura 6.** Esquema de los primeros estadíos foliculares. Tomado de (Universidad nacional experimental politécnica de las fuerzas armadas, 2010).

Con el crecimiento continuo del folículo, las células escamosas se transforman en una capa cúbica simple, formando el **folículo primario** (Dumesic et al. 2008). Durante esta etapa aparece una sustancia amorfa llamada zona pelúcida, compuesta por diferentes glicoproteínas, que rodea al oocito separándolo de las células foliculares (**Figura 6**) (Gartner L P and Hiatt J L 1997). Cuando el folículo primario ya ha sido activado para iniciar el desarrollo, se convierte en **folículo preantral**. Esta conversión incluye un aumento considerable en su diámetro. Las células foliculares continúan proliferando formando la capa de granulosa. Células de la teca, provenientes del estroma circundante, se organizan alrededor del folículo en diferentes capas: una teca interna compuesta principalmente por una capa celular glandular muy vascularizada, y una teca externa de células planas y de naturaleza fibromuscular. A su vez, comienzan

a desarrollarse varios espacios intercelulares dentro de las células de granulosa, llenos de líquido (**Figura 7**). Hacia el final del estadío pre-antral las células foliculares adquieren receptores para ciertas hormonas, las células de granulosa para estrógenos y FSH hipofisaria, mientras que las tecales desarrollan receptores para LH hipofisaria (Rice et al. 2007; Gougeon and Lefevre 1983). A partir de aquí, el desarrollo posterior de los folículos dependerá del estado endócrino del organismo en ese momento. Siempre que los niveles de FSH y LH circulantes sean adecuados, cualquier folículo con receptores apropiados entrará en el siguiente estadío del desarrollo, el antral. Los folículos preantrales que no poseen receptores hormonales experimentan un proceso de atresia es decir, degeneran y mueren.

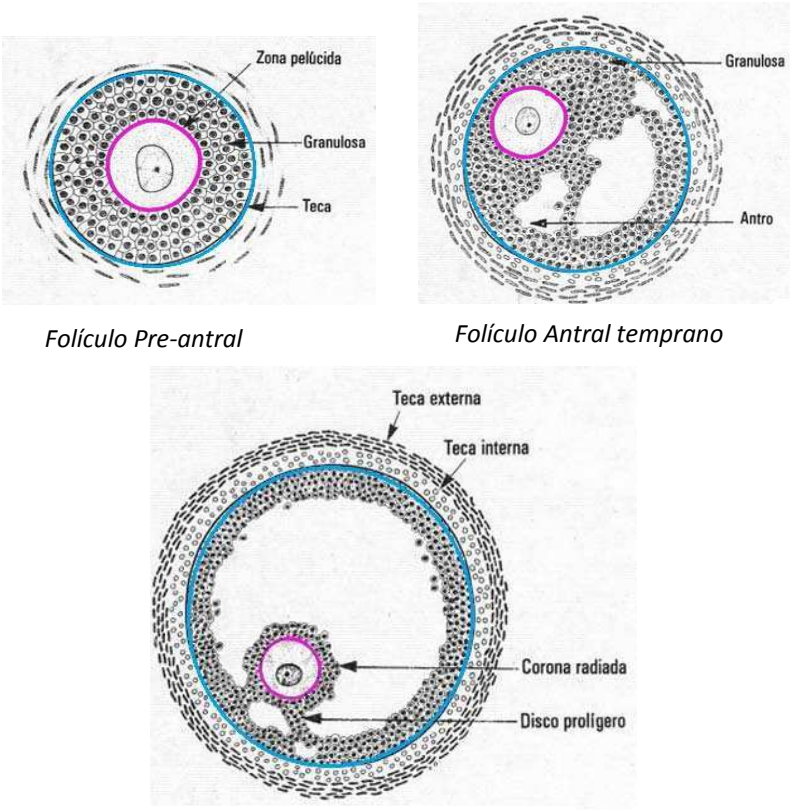
Los espacios llenos de líquido, generados durante el estadío preantral, terminan coalesciendo formando una única cavidad llena de líquido denominada antro. A este estadío se lo conoce como **folículo antral o secundario** (Gartner L P and Hiatt J L 1997). Este estadío suele durar de 8 a 10 días, tiempo durante el cual las capas celulares de granulosa y tecales continúan aumentando de grosor. Hacia el final de este estadío, el folículo es de mayor tamaño, aunque el oocito permanece más o menos con el mismo diámetro.

Bajo la influencia de las gonadotrofinas, las células del folículo antral comienzan a secretar grandes cantidades de hormonas. Bajo el estímulo de LH, las células de la teca interna sintetizan y secretan los andrógenos: testosterona y androstenediona. También producen pequeñas cantidades de estrógenos. Las células de granulosa, que poseen receptores para FSH, parecen responder a la presencia de esta hormona convirtiendo los andrógenos en estrógenos, en especial 17 β-estradiol. El resultado final de esta actividad secretora es un aumento sustancial de los niveles circulantes tanto de andrógenos como de estrógenos. En las células de granulosa, los estrógenos actúan de forma autócrina estimulando la proliferación celular. Esto lleva a un aumento repentino de estrógenos hacia los días 10-12 del ciclo en la mujer.

Hacia fines del estadío antral, las células de granulosa en respuesta a FSH y a estrógenos, adquieren receptores de LH. Cualquier folículo antral que no presente tales receptores experimentara atresia. Por consiguiente, durante la vida fértil de la

mujer en cada ciclo se desarrollan múltiples folículos primordiales, pero habitualmente sólo uno llega a la ovulación y será denominado **Folículo Dominante**.

En el estadío **Pre-ovulatorio**, LH estimula a las células de granulosa para sintetizar progesterona. A medida que aumenta la secreción de esta hormona, los estrógenos empiezan a disminuir ligeramente, y las células de granulosa pierden sus receptores para FSH y estrógenos (PococK and Richards 2002).




*Folículo Pre-antral*

*Folículo Antral temprano*

*Folículo maduro o de Graff*

**Figura 7.** Esquema de los últimos estadíos foliculares. Tomado de (Universidad nacional experimental politécnica de las fuerzas armadas, 2010).

Las células de granulosa se redistribuyen, de modo que el oocito I queda rodeado por un pequeño grupo de ellas que se proyectan desde la pared folicular hacia el antro. Esta estructura es conocida como *cumulus oophorus*. La única capa de células de granulosa que rodea al oocito se denomina *corona radiata* (**Figura 7**). Hacia el final de esta etapa, la teca interna y las células de granulosa se invaden de capilares que nutren

a ambas. Se forma así, el **Folículo maduro o de Graaf** (Gartner L P and Hiatt J L 1997). El oocito I completa la primer división meiótica convirtiéndose en oocito II. La meiosis se detiene de nuevo en metafase II, siendo ahora capaz de ser fertilizado e iniciar el desarrollo embriológico. Al producirse un aumento súbito de los valores de LH circundantes se produce la ruptura del folículo, liberando al oocito II, en un proceso denominado ovulación que ocurre a mitad del ciclo menstrual. Con ello se completa la primera mitad del ciclo ovárico, conocida como **Fase Folicular**.

La segunda mitad del ciclo ovárico se la conoce como **Fase Luteínica**. En el folículo colapsado, las células foliculares aumentan de tamaño (se luteinizan) y se convierte en **cuerpo lúteo**. En caso de fecundación, éste será el responsable de mantener el equilibrio de las hormonas esteroideas que garanticen la implantación y el mantenimiento del embrión durante las primeras semanas de embarazo. Los niveles de progesterona aumentan de forma significativa y aproximadamente a mitad de la segunda fase del ciclo se observa un segundo pico de estrógenos. Si el oocito liberado en el momento de la ovulación no es fecundado, el cuerpo lúteo degenera en un proceso llamado **luteólisis**: las células luteinizadas colapsan, se produce isquemia y muerte celular. Se genera entonces, una disminución en la secreción de estrógenos y progesterona. El cuerpo lúteo degenerado se conoce como *Cuerpo Albicans*.

## CICLO ESTRAL

Tanto el ciclo menstrual de primates como el ciclo estral del resto de los mamíferos se divide en una etapa pre-ovulatoria y otra post- ovulatoria. Entre ambas tiene lugar la ovulación, que en el caso de la rata y ratón ocurre espontáneamente. El ciclo estral de la rata se desarrolla en 4 ó 5 días, observándose un orden cronológico de 4 etapas de distinta duración (**Figura 8**): 1) **Proestro**: 12 a 14 horas, momento en que el animal entra en celo; 2) **Estro**: 25 a 27 horas, período durante el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho(Heape 1900), y es posible en la mayoría, aunque no en todos los mamíferos, un coito fecundante; 3) **Diestro I** (o metaestro): 6 a 8 horas; 4) **Diestro II**: 55 a 57 horas, período en el cual la secreción ovárica prepara los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito en estro. Si la fertilización no ocurre, el animal vuelve al período de proestro y un nuevo ciclo se inicia.

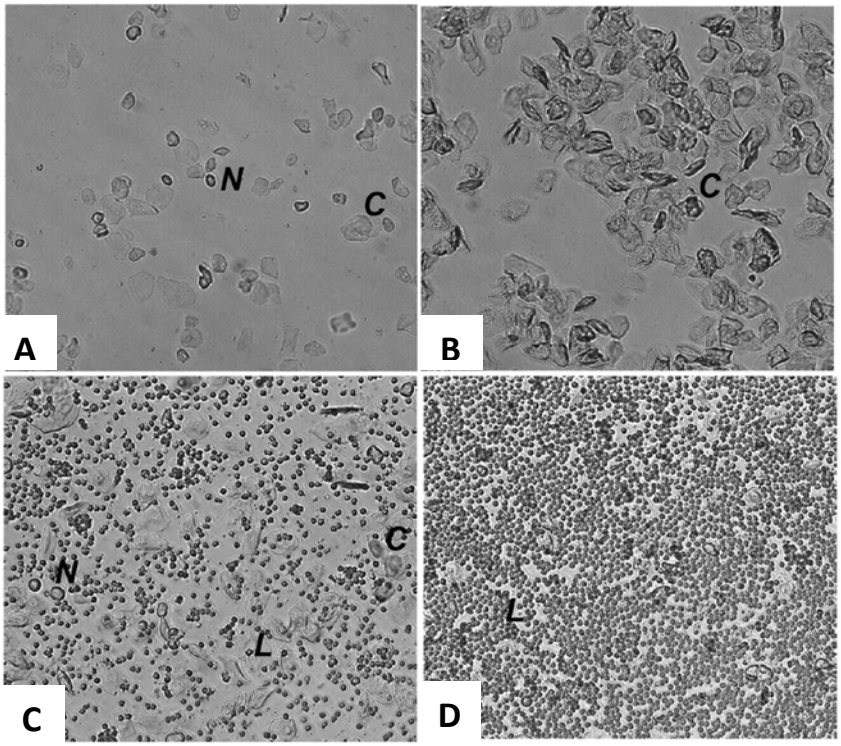



**Figura 8**. Fotografías representativas de diferentes estadíos del ciclo estral. **A. PROESTRO**, predonminantemente con células epiteliales nucleadas (N). **B. ESTRO**, con celulas cornificadas anucleares (C). **C. DIESTRO I**, con los tres tipos celulares, leucocitos, cornificadas y células epiteliales anuvleadas. **D. DIESTRO II**, predominantemente con leucocitos (L). Modificado de C. Caligioni (Caligioni 2009).

El crecimiento y maduración de los folículos comprende los días de diestro y proestro, finalizando con la ovulación espontánea en la madrugada del estro (Smith et al. 1975; Greenwald and Roy 1994).

En cada fase del ciclo estral se suceden una serie de cambios característicos a nivel de ovario, útero, vagina, así como cambios comportamentales (Marcondes et al. 2002). En el ovario, durante las fases de proestro y estro temprano, un grupo de folículos ováricos completa la etapa de maduración, pero sólo una parte de este grupo termina ovulando, mientras que el resto sufre atresia. Tras la ovulación, los folículos que ovularon se transforman en cuerpos lúteos que crecen durante dos o tres días (fase de diestro) y luego degeneran lentamente. Se pueden encontrar así tres o cuatro generaciones de cuerpos lúteos en distintos estadíos en cualquier fase del ciclo estral

en roedores. En ausencia de gestación, el cuerpo lúteo degenera a la vez que otros folículos ováricos empiezan a madurar, iniciándose un nuevo ciclo. A nivel vaginal, se pueden determinar los distintos estadíos del ciclo por observación al microscopio a bajo aumento, según los tipos celulares presentes en el extendido: en el proestro hay predominancia de células epiteliales nucleadas, redondas, ocasionalmente algunas escamosas; el día del estro, predominan las escamosas; durante los días de diestro 1 y 2 los leucocitos son mayoritarios.

En resumen, la rata de laboratorio es un mamífero no estacional, presentando un ciclo ovárico poliestral y que se continúa desde la pubertad hasta la senectud, con ovulación espontánea, normalmente cada 4-5 días con una breve fase lútea.

## REGULACIÓN DEL CICLO OVÁRICO/ESTRAL

La conservación de las especies ovulatorias está determinada por la aparición de la ovulación en el momento más indicado de manera tal que, si sobreviene la fecundación, puedan tener lugar la preñez y el parto y lograr un máximo de posibilidades de supervivencia para las crías. Los mecanismos de regulación de los ciclos ovulatorios son por lo tanto de vital importancia.

La regulación de la función reproductiva es muy compleja, y está integrada por los sistemas nervioso y endócrino. El Sistema Nervioso Central (SNC) es el receptor y coordinador de los estímulos que influyen sobre la función sexual.

En consecuencia existen tres niveles de regulación de la función reproductiva de la hembra:

a. El **SNC**, principalmente mediante la secreción hipotalámica de kisspeptinas y GnRH,

b. La **adenohipófisis**, a través de las gonadotrofinas (LH y FSH) y de PRL (hormona luteotrófica en roedores)

c. Los **ovarios** que, como se ha mencionado antes, secretan hormonas esteroides (estradiol y progesterona fundamentalmente y también testosterona) y hormonas proteicas (como la inhibina).

La interacción de estos tres niveles de secreción y regulación hormonal da origen a los ciclos ovulatorios en las distintas especies.

En la **Figura 9** y **10** se observan las variaciones en los niveles hormonales durante el ciclo ovárico en mujeres y roedores, respectivamente, como resultado de la regulación del eje hipotálamo-hipofisario.

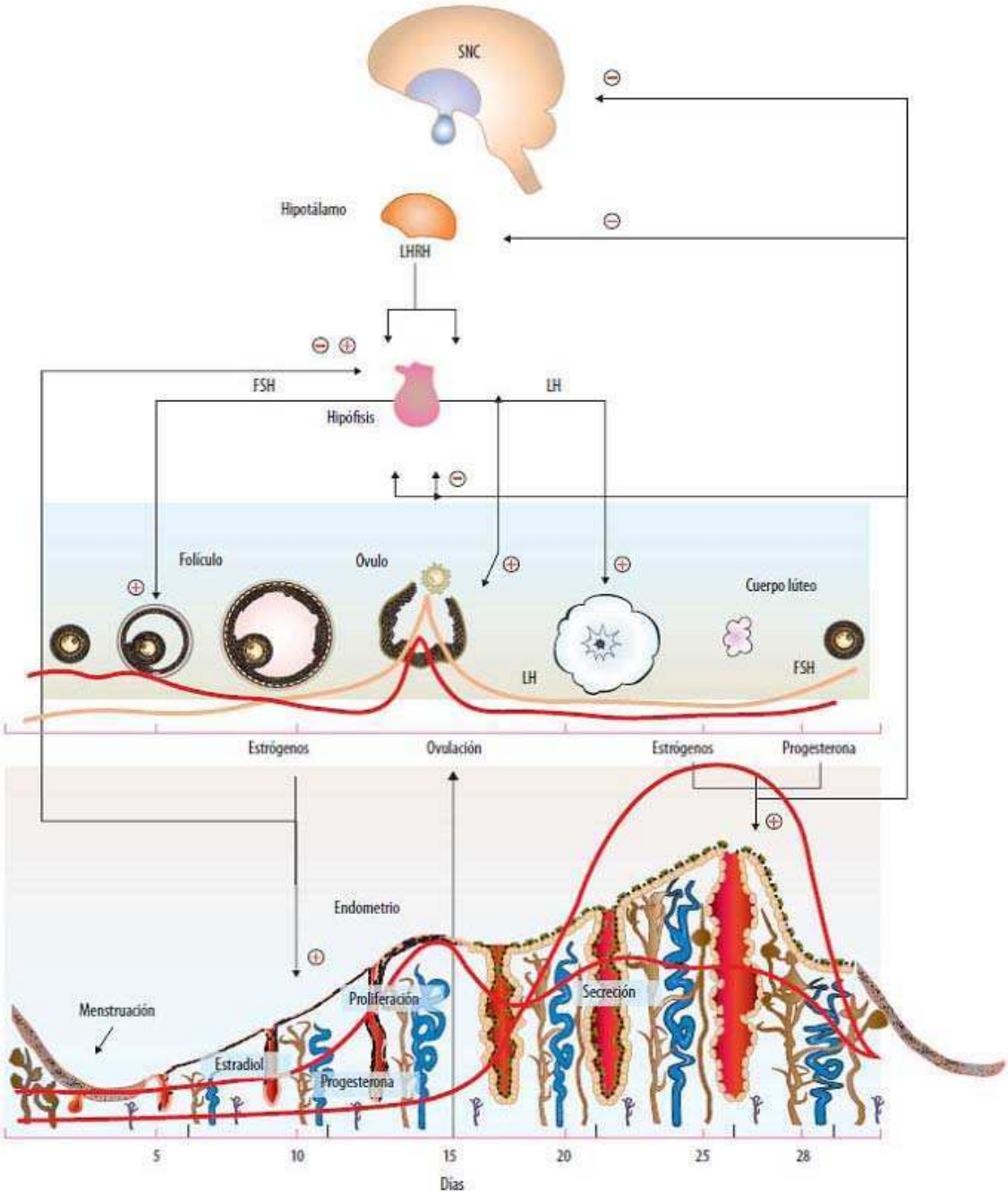



**Figura 9.** Esquema que muestra la interacción entre los distintos niveles del eje gonadotrófico (hipotálamo-hipófisis-ovario-útero) a lo largo del ciclo menstrual en la mujer. SNC: sistema nervioso central, LHRH: hormona liberadora de gonadotrofinas, LH: hormona luteinizante, FSH: hormona folículo estimulante. Tomado de J. Tresguerres (Tresguerres 1992).

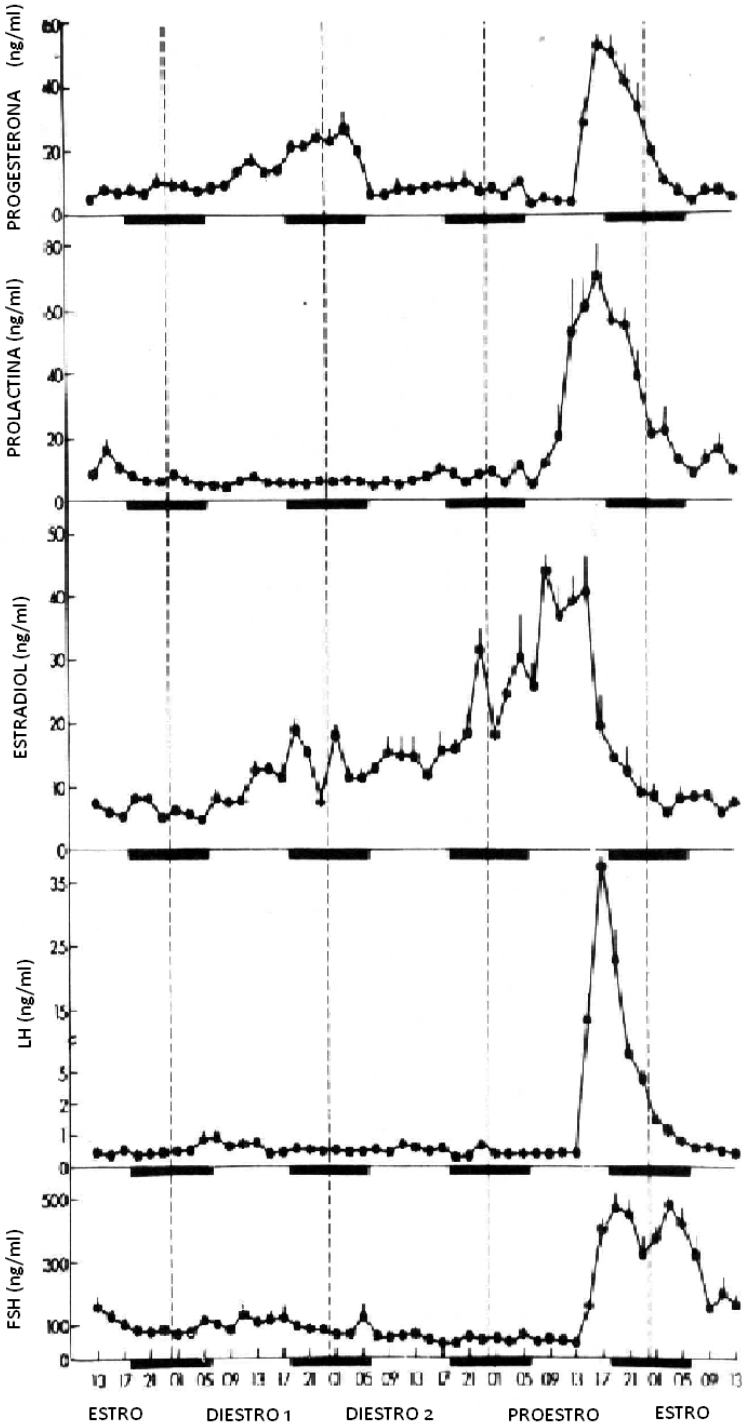



**Figura 10.** Concentraciones séricas de progesterona, prolactina, estradiol y gonadotrofinas (LH y FSH) durante el ciclo estral de la rata. Los trazos oscuros representan el período de oscuridad del ciclo diario. Modificado de M. Smith (Smith et al. 1975).

### A.3.2. EL TESTÍCULO

Los testículos, gónadas masculinas, son dos órganos glandulares ovales que se encuentran ubicados por fuera de la cavidad abdominal en un saco de piel denominado escroto. Son los encargados de la producción de andrógenos y de proporcionar el entorno adecuado para la producción de espermatozoides (Geneser 2000).

Los testículos de los mamíferos se pueden dividir funcional y estructuralmente en dos compartimientos: el tubular y el intersticial (**Figura 11**). La mayor parte del volumen testicular está ocupado por los túbulos seminíferos, los cuales conforman la unidad productora de espermatozoides y están compuestos por un epitelio seminífero que contiene dos tipos principales de células: las células de Sertoli, y las células de la serie espermatogénica, que comprenden las espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios, espermátides y espermatozoides (Geneser 2000). El tejido intersticial que completa los espacios entre los túbulos seminíferos contiene las células de Leydig, principal fuente productora de andrógenos, mastocitos y macrófagos, vasos sanguíneos y linfáticos y terminaciones nerviosas. Las células de Leydig se asocian a los vasos sanguíneos y a las paredes de los túbulos seminíferos, y su número varía según la especie, observándose mayor producción de andrógenos en aquellas especies donde existe un mayor número de células de Leydig (Setchell et al. 1994).

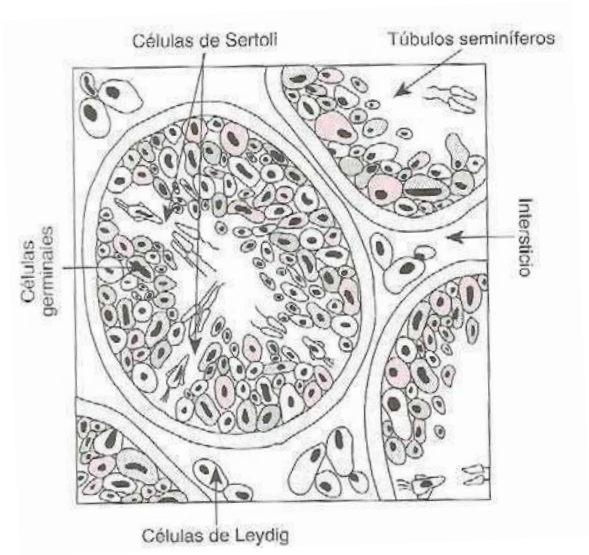



**Figura 11.** Esquema de la estructura del testículo. Tomado de Tresguerres J.A.F (Tresguerres 1992).

Además de los efectos conocidos de los andrógenos en el desarrollo y mantenimiento de los órganos sexuales masculinos, éstos ejercen acciones de diferenciación sexual sobre el cerebro en desarrollo, principalmente por su conversión de testosterona a estradiol (aromatización).

## A.4. REGULACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISO-GONADAL

El sistema nervioso, a través del control hipotalámico de la hipófisis, regula las funciones tiroideas, adrenocorticales y gonadales y modifica múltiples actividades fisiológicas, tales como reproducción, crecimiento y desarrollo, balance energético, de agua y electrolitos, respuesta a estrés y función inmune. Recíprocamente, la actividad hipotalámica y las hormonas influyen en el desarrollo y la función cerebral modificando la actividad neural y las secreciones neurohormonales, y regulando actividades cerebrales superiores como la conducta sexual, homeostasis energética, termorregulación y sueño-vigilia (Levine 2000).

Las hormonas de las glándulas endocrinas blanco, en nuestro caso el interés se centra en las gónadas, ejercen una acción de retroalimentación (larga) sobre la secreción de las hormonas producidas por la adenohipófisis actuando directamente sobre esta glándula y sobre estructuras del SNC, fundamentalmente sobre el HT.

Por otra parte, las hormonas hipofisarias como también las hormonas hipotalámicas hipofisotróficas ejercen una acción de retroalimentación directa (llamadas corta y ultracorta respectivamente) sobre estructuras del SNC involucradas en el control de la secreción de hormonas adenohipofisarias. De esta manera se constituyen mecanismos de retroalimentación largos, cortos y ultracortos, positivos y negativos, tanto a nivel central como hipofisario (Fink 2000).

Además de las señales periféricas y centrales, la función hipofisaria está regulada por interacciones intraglandulares autócrinas y parácrinas(Schwartz et al. 1998; Ray and Melmed 1997). La distribución de los distintos tipos de células dentro de la glándula no es al azar, sino que sigue una histoarquitectura definida, que es la base

estructural de esta organización funcional horizontal en la cual las células hipofisarias ejercen un control mutuo de su función y diferenciación.

### A.4.1. GNRH

La regulación de la secreción de gonadotrofinas (LH y FSH) es muy compleja; en ella participan el SNC, la HF y las gónadas (Fink 1988; Fink 2000).

El SNC integra información proveniente de diversos lugares, tales como el eje reproductor, el medio externo o interno, y de esta manera controla la secreción pulsátil de GnRH, regulando así la función gonadotrófica.

El GnRH es un decapéptido, cuya estructura molecular presenta cambios a lo largo de la evolución de los vertebrados, siendo el originalmente descrito en mamíferos: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-$NH_2$ (Schally et al. 1971).

Esta hormona, regulada por kisspeptina y por neurotransmisores excitatorios e inhibitorios, es liberada de manera pulsátil desde las terminales nerviosas en la EM y transportada por el sistema porta hipofisario a la *pars distalis*, estimulando la producción y secreción de las hormonas hipofisarias LH y FSH. Ambas gonadotrofinas viajan a través de circulación general hasta las gónadas donde ejercen su acción trófica, tanto endocrina como gametogénica (Conn et al. 1979; Kaiser et al. 1997). Los esteroides gonadales secretados por los ovarios, estradiol ($E_2$) y progesterona ($P_4$), principalmente, y por los testículos, testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT), además de desarrollar y mantener los caracteres sexuales secundarios actúan sobre el encéfalo y la hipófisis anterior regulando la secreción hormonal, mientras que los péptidos gonadales como la inhibina actúan a nivel hipofisario regulando la síntesis y liberación de FSH.

En contraste con otras neuronas hipotalámicas secretoras de péptidos, las neuronas de GnRH no forman núcleos bien definidos son sólo unas 1000-2000 neuronas. Si bien las neuronas decapeptidérgicas tienen pulsatilidad intrínseca, el patrón pulsátil de secreción de GnRH, sugiere la existencia de una red de conexiones que permite sincronizar dichas neuronas (Stojilkovic et al. 1994). Surgió así el concepto de un

**oscilador o generador de pulsos** ubicado en el HT responsable de la liberación pulsátil sincrónica de GnRH desde las terminales nerviosas de neuronas decapeptidérgicas.

En roedores clásicamente se postulaba que la secreción de GnRH es controlada por dos centros ubicados en dos áreas distintas del HT. Por un lado, el **centro tónico** ubicado en el HMB (presente en ambos sexos), responsable de la secreción pulsátil. Y por otro lado, el **centro cíclico**: compuesto por el HA y el APO (presente sólo en hembras), responsable de la secreción cíclica. Ahora se postula que las neuronas Kiss1 presentes en el ARC representarían el sustrato del generador de pulsos de GnRH, ya que kisspeptina se libera hacia la EM de manera intermitente con una frecuencia de un pulso por hora en monas (Keen et al. 2008). Sin embargo, los pacientes con mutaciones del Kiss1r exhiben liberación intermitente de LH de baja amplitud a una frecuencia normal (Seminara et al. 2003), por lo que kisspeptina funcionaría más bien amplificando la actividad del generador de pulsos en vez de generar la pulsatilidad. Si esto fuese así, al administrar de manera continua kisspeptina a la dosis a la cual el Kiss1r se internaliza, reduciría la amplitud de LH pero no la pulsatilidad y este no fue el caso en un trabajo realizado en monos, donde tanto la amplitud como la pulsatilidad de LH disminuyeron (Plant and Ramaswamy 2009). Por lo cual se requiere un mayor estudio para dilucidar el rol de kisspeptina sobre el generador de pulsos de GnRH.

La reproducción en mamíferos, tanto en machos como hembras, depende críticamente de una neurosecreción apropiada de GnRH. Esto ha sido demostrado en numerosos experimentos en los cuales el bloqueo de la secreción del decapéptido, por anestésicos o barbitúricos, o de su acción por inmunoneutralización o antagonismo del receptor, llevan a un cese o reducción en la secreción gonadotrófica y de la función gonadal. La esterilidad en ratones mutantes, carentes de GnRH, o la infertilidad humana asociada a una insuficiencia de GnRH, como en el Síndrome de Kallman, demuestran las severas consecuencias reproductivas resultantes de una secreción de GnRH deficiente (Levine et al. 1991).

En la mujer, el patrón de liberación de GnRH y gonadotrofinas varía durante la etapa reproductiva y entre las especies. La liberación hipotalámica de GnRH está regulada por neuronas presentes en diferentes regiones del cerebro (sistemas límbico y olfatorio, cortex visual, etc.), cuyas terminales finalizan en el HT. Uno de los péptidos

más importantes, recientemente descripto, que regulan positivamente la secreción de GnRH es la kisspeptina. Además existe neurotransmisores que participan en este control, entre los cuales se encuentran: el GABA y péptidos opioides endógenos que son inhibitorios de la liberación de GnRH; la epinefrina, norepinefrina, neuropéptido Y y glutamato (GLU) que la incrementan, mientras que dopamina y serotonina pueden ser inhibitorias o estimulatorias dependiendo del estado endócrino del animal. La neurona decapeptidérgica presenta también receptores para GnRH, permitiendo un mecanismo de retroalimentación ultracorto. Así la secreción de GnRH hipotalámica es el resultado de la integración de todos los estímulos facilitadores e inhibitorios, modulándose preferentemente según los niveles de estrógenos y progesterona circulantes.

El pico de liberación de GnRH es disparado por el aumento de los niveles de estradiol circulantes durante el período pre-ovulatorio. De esta forma, la neurona decapeptidérgica integra esta información y responde con pulsos de GnRH de mayor frecuencia y amplitud (Tsutsumi and Webster 2009).

Las gonadotrofinas son glicoproteínas que estimulan la espermatogénesis, foliculogénesis y ovulación. Están compuestas por una misma subunidad α y una subunidad β diferente, determinada por genes únicos. Para que una gonadotrofina se una a su receptor gonadal son necesarias ambas subunidades, y para la actividad biológica completa de la subunidad β son necesarios los componentes hidrocarbonados adecuados (Berne and Levy 1993). Tanto la frecuencia como la amplitud del pulso de GnRH son críticas para la liberación normal de las gonadotrofinas (Knobil 1980).

La acción diferencial de GnRH en la secreción de las gonadotrofinas se puede explicar por la capacidad diferencial de respuesta de cada subunidad a la frecuencia de pulsos. Pulsos de GnRH de alta frecuencia (mayores a un pulso por hora) favorecen la síntesis de la subunidad α y de β-LH, mientras que pulsos de baja frecuencia (menores a un pulso por 2 o 3 horas) favorecen la síntesis de β- FSH (Ferris and Shupnik 2006). Una frecuencia de ≤1 pulso por hora favorece la síntesis de LH generando un pico en los niveles de esta hormona y disparando la ovulación. Seguida a la misma, la

luteinización de las células de granulosa aumenta los niveles de progesterona. Ésta hace disminuir lentamente la frecuencia de pulsatilidad de GnRH para reducir los niveles de LH, aumentar los de FSH y así iniciar el nuevo ciclo.

Como es sabido, la pulsatilidad de GnRH y LH juegan un rol fundamental en el desarrollo sexual y en la regulación normal del ciclo menstrual/ estral**.**

### A.4.2. ESTEROIDES GONADALES

Las variaciones cíclicas de los niveles plasmáticos de FSH y LH son decisivas en el control de la actividad celular y endócrina en el ovario. Los esteroides pueden ejercer un control de retroalimentación tanto negativa como positiva sobre la secreción de FSH y LH en la adenohipófisis, dependiendo de los niveles de hormona y del tiempo durante el cual esté presente. Niveles bajos o moderados de estrógenos, ejercen una retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotrofinas, es decir, inhiben la secreción de FSH y LH. Sin embargo, si los niveles de estrógenos son altos durante varios días en la mujer, el efecto pasa a ser de retroalimentación positiva, es decir se estimula la secreción de las gonadotrofinas.

Los esteroides también pueden ejercer un efecto directo sobre la secreción de GnRH por parte de las neuronas hipotalámicas (PococK and Richards 2002). De este modo alteran tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de FSH y LH.

Otro circuito de retroalimentación negativa relaciona la **Inhibina** producida por las células de granulosa con la secreción de FSH. La Inhibina reduce la liberación de GnRH, la síntesis de la subunidad β de FSH y el efecto estimulador de GnRH sobre la secreción de FSH. Por el contrario, la **Activina**, producida en la hipófisis, ejerce una retroalimentación positiva, estimulando la síntesis y secreción de FSH (Berne and Levy 1993).

## PARTE B: REGULACIÓN DE LA GLUCEMIA

La metabolización de la glucosa es una fuente primaria de producción energética, acumulable en forma de ATP. La concentración de glucosa en sangre es una de las constantes más estables en el organismo. En un individuo normal, la glucemia tiene un valor de 70-110 mg/dL en ayunas, la cual se eleva a 120-140 mg/dL luego de la ingestión de algún alimento, pero el sistema de retroalimentación de control devuelve la glucemia a su nivel normal dentro de las dos horas siguientes (Dean L and McEntyre J 2004). La regulación homeostática del metabolismo energético es un proceso muy controlado, en el que están involucrados diferentes órganos (principalmente páncreas, e hígado) y hormonas (principalmente Insulina y Glucagon). La razón fundamental es que el sistema nervioso requiere un aporte continuo de glucosa, siendo ésta, en condiciones normales, su única fuente de energía. Su desregulación puede conducir a patológías tales como diabetes miellitus, enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, enfermedades renales.

### B.1. EL PÁNCREAS ENDÓCRINO

El páncreas del humano es un órgano plano y alargado que cruza el lado izquierdo del abdomen por detrás del estómago, desde el borde interno del marco duodenal hasta el hilio del bazo, teniendo una estrecha relación con la vía biliar extrahepática. Este órgano produce secreciones endócrinas y exócrinas, función que se lleva a cabo por diferentes tipos celulares. La mayor parte de ellas se dispone formando **acinos pancreáticos** donde se producen las enzimas digestivas que son vehiculizadas por un sistema de ductos hasta el duodeno, siendo esta la porción exócrina del páncreas.

El páncreas endócrino representa del 1 al 2% de todo el volumen pancreático. Está constituido por conglomerados esféricos ricamente vascularizados, denominados **Islotes de Langerhans** distribuidos por toda la glándula, vertiendo sus productos directamente al torrente sanguíneo. Estos se encuentran inervados por las vías simpática y parasimpática (Cingolani and Houssay 2000).

En la **Figura 12** se esquematiza la composición de un islote de langerhans, sus secreciones y la interacción entre cada tipo celular. Cada islote está conformado por varios tipos celulares, siendo los principales:

**Células α:** ocupan la parte periférica del islote y producen y secretan glucagon, hormona hiperglucemiante.

**Células β:** son el tipo celular predominante en el islote (60-70%) y están dispuestas en la porción central del mimo. Producen y secretan Insulina, única hormona hipoglucemiante.

**Células δ:** dispuestas entre los tipos celulares mencionados anteriormente, encargadas de secretar somatostatina, que inhibe la secreción de las células α y β.

**Células PP:** se ubican entre los otros tipos celulares y secretan polipéptido pancreático (PP) quien regula la secreción de la parte exócrina del páncreas e inhibe la motilidad intestinal.

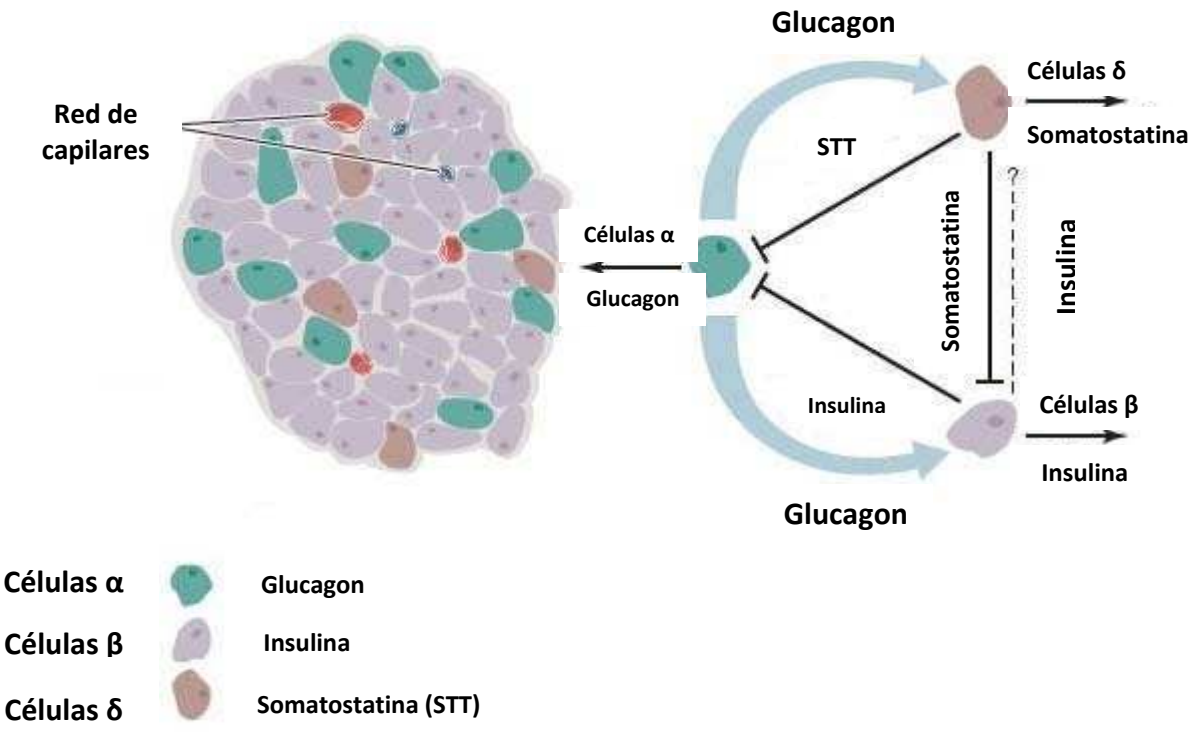



**Figura 12.** Esquema del mosaico celular de un Islote de Langerhans. Modificado de (Enciclopia británica, 2014).

Las células del islote se encuentran reguladas de manera parácrina, ya que todas ellas reconocen las hormonas insulares como elementos del sistema de señales. Por otro lado, también existen microcanales intercelulares, denominados *gap juntions*, los cuales son uniones intercelulares tipo hendidura entre células tanto homólogas como heterólogas del islote que permiten el pasaje de dichas señales.

Cada una de las hormonas insulares del islote es capaz de influir en la secreción de las restantes. Así, la insulina suprime la secreción de glucagon; el glucagon estimula la secreción de insulina y somatostatina (SST); la SST suprime la secreción de las otras tres; y, cada una de ellas, es capaz de suprimir su propia secreción (acción autócrina).

## B.2. INSULINA

La insulina es la principal hormona pancreática. Es una proteína de 51 aminoácidos que se almacena en vesículas secretoras y se libera al torrente sanguíneo por exocitosis frente al estímulo adecuado. La vida media de la insulina en plasma es de aproximadamente 5 minutos, ya que es captada rápidamente por los tejidos blanco. El receptor de insulina está constituido por glicoproteínas divididas en cuatro subunidades: dos α y dos β, unidas entre sí por puentes disulfuro. Las cadenas α permanecen fuera de la célula y conforman el sitio de unión de la insulina. Las cadenas β están ancladas en el interior de la célula y poseen actividad de tirosina quinasa. Los receptores de insulina pueden, en condiciones fisiológicas y patológicas, modificar su capacidad de unión al ligando (Cingolani and Houssay 2000).

Los niveles circulantes de Insulina pueden modificar o regular sus propios receptores, debido a que una disminución de los niveles de insulina circulante facilita la unión de la insulina a su receptor, y a la inversa. Las variaciones en la capacidad de unión de la insulina pueden ser debidos, bien a una variación de la afinidad del receptor por la hormona (hipersensiblidad o desensibilización), o a la modificación en el número de receptores (mayor expresión o internalización por exceso de ligando).

El estimulo más importante para su secreción es la glucosa. La célula β se comporta como un verdadero sensor de glucosa, siendo sensible a pequeñas variaciones de la concentración de glucosa en sangre. Un transportador específico (GLUT 2) facilita la

difusión de la glucosa dentro de las células β(Berne and Levy 1993). Tras el incremento de la glucemia, la célula β responde al estímulo mediante la secreción de insulina siguiendo un patrón característico: en primer lugar libera la insulina ya sintetizada e inmediatamente comienza una fase de síntesis y secreción simultánea.

Existen otros estímulos fisiológicos de la secreción, siempre que existan niveles mínimos de glucosa en sangre. Los aminoácidos, los ácidos grasos y algunas hormonas como las gastrointestinales estimulan su secreción, mientras que las catecolaminas son potentes inhibidores de la secreción de insulina. A su vez, los islotes tienen multitud de terminaciones nerviosas, por lo que responden también a estímulos del sistema nervioso; la vía parasimpática es estimuladora y la vía simpática inhibidora de la secreción de insulina (Tresguerres 1992).

La acción global de la insulina es facilitar el almacenamiento de sustratos e inhibir su liberación, disminuyendo las concentraciones plasmáticas, principalmente de glucosa, pero también de ácidos grasos libres, cetoácidos y aminoácidos. Los principales blancos de acción de la insulina son el hígado, el músculo y el tejido adiposo. En el músculo y en el tejido adiposo la insulina promueve el rápido ingreso de la glucosa al reclutar los transportadores GULT-4 exponiéndolos a la membrana. De esta manera las células poseen una mayor concentración de transportadores en la membrana favoreciendo el rápido ingreso de la glucosa a los tejidos. Es por este efecto que estos transportadores se denominan insulino-dependientes. En cambio, el hígado, los riñones, células del sistema nervioso central, entre otros, utilizan transportadores de glucosa no dependientes de insulina (Berne and Levy 1993).

## B.3. GLUCAGON

Es la hormona hiperglucemiante más potente, sintetizada y secretada por las células α. Al igual que la insulina, tiene una vida media en plasma muy corta (alrededor de 6 minutos). Consiste en una cadena peptídica de 29 aminoácidos que carece de puentes disulfuro. Respondiendo a un estimulo secretorio el glucagon se secreta por exocitosis y llega, a través de la vena porta, al hígado (Tresguerres 1992). Su receptor se expresa

mayoritariamente en hígado y pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, con siete pasos transmembrana (Brubaker and Drucker 2002).

El principal regulador de la secreción de glucagon son los niveles circundantes de la glucosa. En efecto, la hipoglucemia es un potente estimulador y la hiperglucemia produce la inhibición de su secreción. También existen otros estimulantes fisiológicos de la secreción como la hormona de crecimiento (GH), glucocorticoides, catecolaminas y el aumento de aminoácidos en sangre. Por lo tanto, el ayuno, las comidas ricas en proteínas y el ejercicio físico son desencadenantes indirectos de su secreción. Por el contrario, la STT y la serotonina, así como los niveles elevados de ácidos grasos, son inhibidores de la secreción. De lo anterior, se deduce que comidas ricas en carbohidratos, niveles altos de ácidos grasos y cuerpos cetónicos son inhibidores. En cuanto a la regulación por parte del sistema nervioso, el simpático es estimulador, mientras que las acciones del parasimpático son más discutidas (Cingolani and Houssay 2000).

Al contrario que la Insulina, el glucagon estimula los procesos catabólicos e inhibe los anabólicos. Ejerce efectos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas. Las acciones más notables son sobre el hígado y el tejido adiposo.

En hígado, el glucagon estimula la producción hepática de la glucosa a través de la estimulación de glucogenolisis y gluconeogénesis y una inhibición de la síntesis de glucógeno. Estos fenómenos son el resultado de la activación e inhibición de ciertas enzimas, resultando en una producción neta de glucosa que pasa al torrente sanguíneo. También produce inhibición de enzimas de la vía glucolítica e incremento de la captación de aminoácidos para la gluconeogénesis.

En tejido adiposo el glucagon ejerce un efecto lipolítico, hidrolizando los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos. Esto suministra rápidamente sustratos metabólicos lo que permite el ahorro de glucosa para que quede disponible para el cerebro y proporciona glicerol que puede actuar como precursor en la gluconeogénesis hepática.

En cuanto al músculo, se debe recordar que carece de la enzima glucosa-6-fosfatasa y que por lo tanto no se produce glucosa procedente del glucógeno muscular(Cingolani and Houssay 2000).

## B.4. CONTROL HORMONAL DE LA GLUCEMIA

Una parte fundamental en la regulación de la glucemia se debe al sistema endócrino donde intervienen catecolaminas, hormonas gastrointestinales y, fundamentalmente, la insulina y el glucagon.

Tras la ingestión de una dieta variada, compuesta de glúcidos, grasas y proteínas, el hígado recibe a través de la vena portal la glucosa procedente de los glúcidos y aminoácidos procedentes de las proteínas. La glucosa al ser una molécula polar, para ingresar a las células requiere proteínas transportadoras específicas denominadas GLUTS. Una vez que la glucosa ingresa al hígado una parte de la misma será almacenada en forma de glucógeno (glucógenogénesis). Otra parte será metabolizada (glucólisis) obteniendo como producto piruvato y ATP, y la parte restante será distribuida a través del flujo sanguíneo al resto del cuerpo. Tanto en el cerebro como en los glóbulos rojos la glucosa será consumida como tal, mientras que en el músculo y el tejido adiposo será almacenada como glucógeno y triacilglicéridos, respectivamente. Cabe destacar que el hígado también es capaz de sintetizar glucosa *de novo*, a través de un proceso denominado gluconeogénesis (Cingolani and Houssay 2000). Por otra parte, después de incrementarse la glucemia por encima de 120 mg en 100 mL, comienza a estimularse la célula β de los islotes de langerhans, quien responde liberando rápidamente insulina, aumentando los niveles de la misma en sangre unas 4-5 veces por sobre el nivel basal. La secreción de insulina pone en marcha los mecanismos de transporte transmembrana de forma que comienza rápidamente el descenso de la glucosa en sangre. En esencia, la insulina señala el estado de buena nutrición y, por distintas vías estimula el almacenamiento de combustibles y síntesis de proteínas, aumenta la actividad de ciertas enzimas, promoviendo la síntesis de glucógeno en músculo e hígado y frena la gluconeogénesis hepática. También activa la glicólisis en hígado, que a su vez favorece la síntesis de ácidos grasos. Estos procesos

ocurren hasta que la secreción de insulina es interrumpida, por lograr la normoglucemia, volviendo a los niveles basales de esta hormona.

Por el contrario, el ayuno produce un descenso en la glucemia, lo que estimula a las células α, secretando glucagon. El glucagon señala el e stado de ayuno. Esta hormona sirve para movilizar el almacén de glucógeno ante la carencia de ingestión de azúcar. El principal órgano blanco de esta hormona es el hígado. En el mismo, estimula la degradación del glucógeno e inhibe su síntesis. También inhibe la síntesis de ácidos grasos y estimula la gluconeogénesis hepática así como también inhibe la glicólisis. Como consecuencia, la gran cantidad de glucosa proveniente de la hidrólisis de glucógeno pasa del hígado a la sangre manteniendo los niveles de glucosa para poder cubrir con las necesidades de energía  Como el nivel de insulina en este estado es bajo, la entrada de glucosa a las células musculares y adiposas  también lo es. Sin embargo estos tejidos son capaces de utilizar los ácidos grasos como combustibles cuando desciende la glucemia (Berg JM et al. 2002).

Es así como del juego entre la insulina y el glucagon, nace una situación de normoglucemia, permitiendo que distintos tejidos, como el sistema nervioso central, tengan siempre el aporte necesario de glucosa.

En la **Figura 13** se resume como varían los niveles de glucemia, insulina y glucagon séricos durante el ayuno y tras la ingesta de algún alimento.

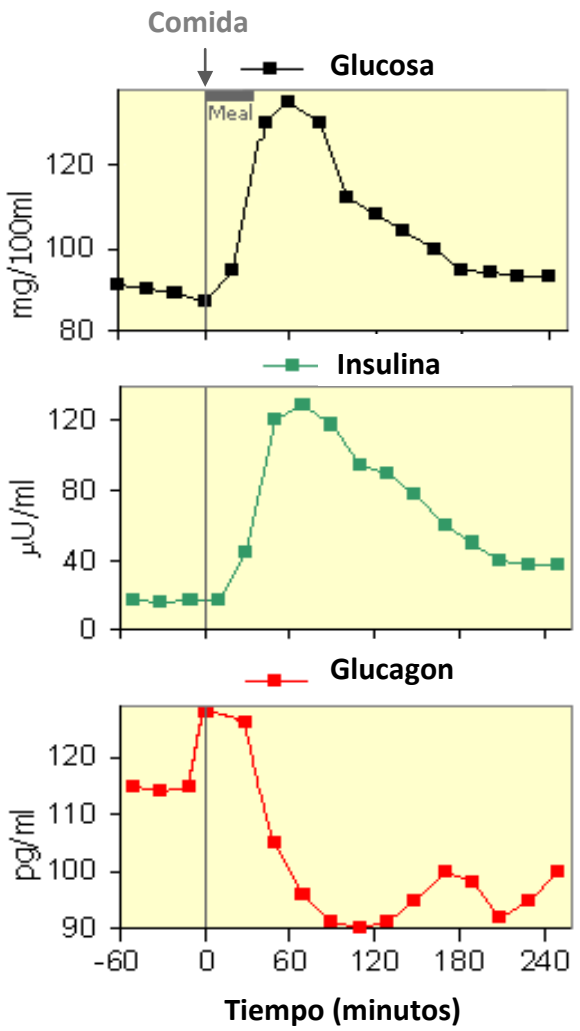



**Figura 13.** Cambios en los niveles séricos de glucosa, insulina y glucagon durante el ayuno y post-alimentación (tiempo 0). Modificado de L. Dean (Dean L and McEntyre J 2004).

Si bien, la glándula responsable del mantenimiento de la homeostasis de la glucosa es el páncreas a partir de la secreción de Insulina y Glucagon, muchos sistemas endócrinos influyen en las vías metabólicas con el objetivo de garantizar que los niveles plasmáticos de glucosa se mantengan dentro de los límites normales. Las llamadas hormonas glucogénicas o hiperglucemiantes incluyen el glucagon, las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), los glucocorticoides (principalmente corticosterona en roedores y cortisol en humanos), las hormonas tiroideas, somatotrofina y algunas otras hormonas y/o factores de crecimiento. La insulina es la única hormona hipoglucemiante.

En la **Figura 14** se esquematizan las principales vías relacionadas con el metabolismo de glucosa.

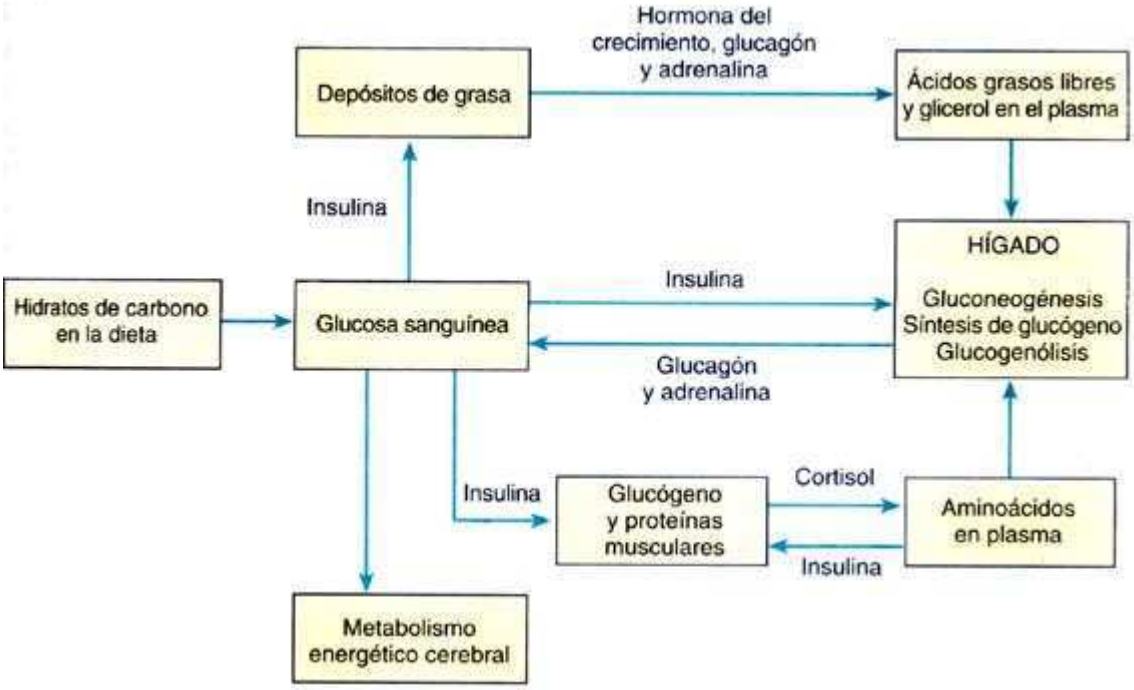



**Figura 14.** Esquema representativo de las principales vías relacionadas con el metabolismo de la glucosa. Tomado de Pockock (PococK and Richards 2002).

## B.5. ALTERACIONES DE LA HOMEOSTASIS DE GLUCOSA

La **diabetes mellitus** (DM) es la principal patología asociada a alteraciones en la homestasis de glucosa. Es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por hiperglucemia, como resultado de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina, o ambas alteraciones. Se diagnostica habitualmente por niveles de glucemia de 8 mM (120 mg/dL) o superiores, pero puede confirmarse también con un test de tolerancia a la glucosa oral. En esta prueba, se administra al paciente una solución de glucosa que equivale a la ingesta de 75 g de glucosa y se mide la glucemia basal y a intervalos de 30 minutos post-ingestión. En un individuo sano los valores sanguíneos de glucosa se normalizan a las 2 horas mientras que en los diabéticos puede superar los 11 mM a este tiempo (Cingolani and Houssay 2000).

La diabetes es una afección en permanente crecimiento en Argentina y en el mundo. Se calcula que 5-6% de la población padece la enfermedad y que esta cifra se

duplicaría hacia el año 2030 (datos de la Organización Mundial de la Salud). En la Argentina alrededor de 2 millones de personas padecen esta enfermedad y su número va en aumento, ligado también al cambio en los hábitos alimenticios y al sedentarismo.

Esta enfermedad se puede clasificar en:

**Diabetes mellitus tipo I** (anteriormente llamada diabetes de la juventud o diabetes dependiente de la insulina): es provocada por una destrucción inmunológica de las células productoras de insulina del páncreas. Los pacientes con este tipo de diabetes deben aplicarse insulina, de no hacerlo, pueden ser propensos a presentar un coma diabético y por esta razón el tratamiento desde el momento del diagnóstico es con insulina.

**Diabetes mellitus tipo II** (anteriormente llamada diabetes del adulto o diabetes no dependiente de la insulina): es la forma más frecuente de diabetes y se presenta como resultado de una resistencia a la acción de la insulina, con una secreción insuficiente de la misma por el páncreas. Los pacientes con diabetes tipo 2 permanecen sin diagnóstico de 5 a 10 años, como consecuencia de que los síntomas que presentan son leves, en otras palabras, presentan ligera elevación de la glucosa en sangre y por ello no manifiestan los síntomas de la enfermedad arriba señalados.

El riesgo de presentar diabetes se incrementa con la edad, la obesidad, la falta de ejercicio físico, hipertensión arterial, dislipidemias. Está fuertemente asociada con una predisposición genética y además ocurre con mayor frecuencia en mujeres que presentan diabetes gestacional.

**Diabetes mellitus gestacional (DMG):** se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se presenta durante el embarazo. Habitualmente la paciente recupera la normoglucemia luego del parto, pero presenta a corto, mediano o largo plazo mayor riesgo a contraer diabetes tipo II.

Existen también otros tipos de diabetes como los defectos genéticos en la función de células del páncreas, los defectos genéticos en la acción de la insulina, otras enfermedades del páncreas o endócrinas, etc. Además, otras alteraciones de la glucemia son aquellas en las que la glucemia se encuentra entre valores normales y valores de diabetes, en las que se observa una elevación de la glucemia en ayunas o un

deterioro la tolerancia a la glucosa, se denominan sindromes de resistencia a la insulina e incluyen patologías como el sindrome metabólico, la poliquistosis ovárica entre otras.

## PARTE C: DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Los organismos vivos dependen de intrincados conjuntos de sistemas de señalización química que guían su desarrollo biológico y regulan la actividad de sus células y órganos. Desde la década del '70, ha crecido dramáticamente el interés científico y público en muchos contaminantes ambientales que poseen la habilidad de interferir con estos sistemas. Una ciencia híbrida, el "Estudio de la Disrupción Endócrina", ha surgido a partir de las preocupaciones acerca de los efectos de este fenómeno en la salud y el medio ambiente. Esta ciencia engloba hallazgos y metodologías de múltiples disciplinas, incluyendo la toxicología, endócrinología, biología del desarrollo, biología molecular, biología del comportamiento y epidemiología (Myers et al. 2004).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) ha definido *Disruptor Endócrino* (DE) como "un agente exógeno que interfiere con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales del cuerpo que son responsables del mantenimiento de la homeostasis y la regulación de los procesos del desarrollo" (Kavlock et al. 1996). Inicialmente, se pensaba que los disruptores endócrinos actuaban a través de receptores nucleares de hormonas, incluyendo receptores de estrógenos (REs), receptores de andrógenos (RAs), receptor de progesterona, receptores de hormonas tiroideas (RTs), y receptores retinoides, entre otros (Diamanti-Kandarakis et al. 2009). En la actualidad, científicos han demostrado que el mecanismo de acción es mucho más amplio: pueden actuar compitiendo con una hormona esteroidea endógena por su receptor o su proteína transportadora o alterando la síntesis y/o metabolismo de hormonas endógenas, eventualmente reclutando factores de transcripción y alterando la expresión génica en las células (Talsness et al. 2009a; Wetherill et al. 2007). Esto es importante para un organismo en desarrollo, que es sensible a cambios en el entorno hormonal, o a la

exposición de drogas o químicos, lo que resulta en un *cambio organizacional* que es permanente (Guillette, Jr. et al. 1995). En cambio, en el adulto, donde existen cambios en las hormonas esteroideas de forma frecuente, se producen *cambios activacionales* que son transitorios. En estudios con animales, se han observado cambios epigenéticos luego de una exposición a un DE durante el desarrollo temprano, caracterizado por una modificación en el patrón de metilación de genes, lo que altera su expresión y produce cambios fenotípicos.

El grupo de compuestos identificados como disruptores endócrinos es muy heterogéneo e incluye a químicos sintéticos utilizados como lubricantes/solventes industriales (como las dioxinas, bifenilos policlorados (PCBs)), plásticos (Bisfenol A), plastificantes (Ftalatos), pesticidas (DDT), funguizidas (vinclozolin) y agentes farmacéuticos (Diestilbestrol (DES)). Los compuestos químicos de origen natural como los fitoestrógenos presentes en los alimentos (genisteína y cumestrol), el **arsénico**, entre otros, también pueden actuar como DEs.

La exposición a DE en humanos durante la ventana temporal de desarrollo ha sido documentada en numerosos estudios, demostrando su presencia en leche materna (Noren and Meironyte 2000; Sun et al. 2004; Main et al. 2006), hígado fetal (Schecter et al. 2007), liquido amniótico (Ikezuki et al. 2002) y sangre de cordón umbilical (Schonfelder et al. 2002; Guvenius et al. 2003). Diferentes estudios hechos en animales y humanos sugieren que los DEs juegan un rol importante en el desarrollo del cáncer (Takashima et al. 2008), disminuyen la cantidad de esperma en humanos, incrementan temporalmente la frecuencia de anormalidades en el desarrollo del tracto reproductor masculino (Sharpe and Skakkebaek 2008) y aceleran la pubertad en las mujeres (Schoeters et al. 2008; Talsness et al. 2009b).

## C.1. EL ARSÉNICO

El **arsénico** (As) es una de las mayores preocupaciones en salud pública a nivel mundial por su amplia distribución en el mundo y los efectos adversos que produce. También ha sido postulado como un potente DE. Está presente en la naturaleza ya sea en el agua, suelo y aire de forma natural y también por actividades antropogénicas.

El As es un elemento ubicuo que existe en la naturaleza en su forma orgánica e inorgánica y en distintos estados de oxidación, incluyendo -3, 0, +3 y +5. El **metal arsénico** ($As^0$) se encuentra poco frecuentemente en el ambiente y es de poco interés toxicológico. El As con estado de oxidación -3, lo podemos encontrar como un compuesto altamente tóxico, en su forma gaseosa, como **Arsina** ($AsH_3$). Este compuesto es muy inestable y no es usual encontrarlo en el medio ambiente, solo en un entorno industrial.

Los estados de oxidación del As que resultan de significancia toxicológica son +3 ($As^{III}$) y +5 ($As^{V}$), ya que causan toxicidad aguda y crónica en una amplia variedad de organismos incluyendo al humano (Kitchin 2001).

El **arseniato** (As (V)) es la especie arsenical más difundida en el medio ambiente, y la mayoritaria en agua y suelos. Como luego veremos, está presente en plantas, algas y animales acuáticos y terrestres.

El **arsenito** (As (III)) es la forma inorgánica reducida y está presente en forma minoritaria en aguas, suelos y seres vivos. Durante mucho tiempo fue considerada la especie arsenical más tóxica.

En el agua, los niveles de As son menores en agua superficial (mares, ríos y lagos) y más elevados en agua subterránea, especialmente en áreas con depósitos de roca volcánica o de minerales ricos en As (Bundschuh J et al. 2008).

En la **Figura 15** se muestran las estructuras y nombres de los principales compuestos arsenicales presentes en el medio ambiente.

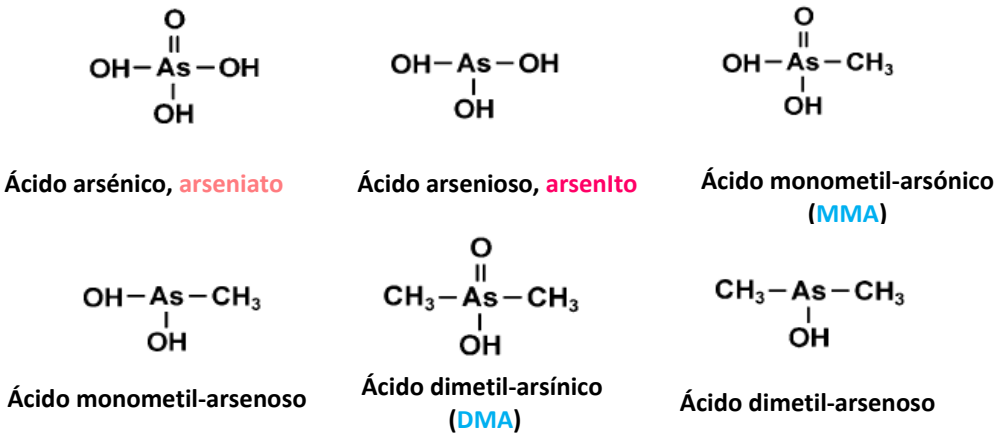



**Figura 15**. Estructuras químicas de algunos compuestos arsenicales relevantes. Modificado de MF Hughes (Hughes et al. 2011).

El ácido monometil-arsónico ($MMA^V$) y el ácido dimetil-arsínico ($DMA^V$) son metabolitos estables del $As_i$ presentes en mamíferos y, tal como veremos más adelante, son excretados principalmente en orina. Además el $DMA^V$ y las sales de sodio del $MMA^V$ se utilizan como herbicidas (Hughes 2002).

El grado de toxicidad del As depende de su forma química así como también del estado oxidativo que presente (Mandal et al. 2004). Los compuestos de As potencialmente más tóxicos son los que presentan el estado de oxidación trivalente. A su vez, las formas inorgánicas son más toxicas que las orgánicas. Esto está relacionado con la reactividad de los compuestos arsenicales con compuestos que contienen azufre y la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). De todas formas, los seres humanos estamos expuestos tanto a las especies trivalentes como las pentavalentes.

El **As inorgánico** ($As_i$) se encuentra en el medio ambiente como óxidos de As o sales de óxido (arsenito: ($As^{III}O^{2-}$); arsenato ($As^V0^{4-}$)). También se encuentra en la superficie de rocas y minerales, donde puede combinarse con azufre y/o metales, incluyendo el manganeso, plata, cobalto, estaño, hierro y níquel, a menudo como óxidos complejos.

El **As orgánico** lo podemos hallar en pescados y mariscos, siendo la forma de As más común la **arsenobetaína**.

## C.2. ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN DE ARSÉNICO

El As, como mencionamos, se encuentra naturalmente en la corteza terrestre y puede contaminar el agua de bebida a través de la lixiviación, erosión y la minería (Wang et al. 2006).

A su vez, el ser humano contribuye a la contaminación con As en el medio ambiente, principalmente en la manufactura de pesticidas (incluyendo los preservantes de madera), vidrio, aleaciones, compuestos electrónicos (semiconductores), pigmentos y productos farmacéuticos. La mayor contribución del hombre en la contaminación de As es en a través de la fundición de plomo, cobre y minerales de níquel; de la manufactura de productos mencionados anteriormente, combustión de combustibles fósiles, y por el uso inapropiado de pesticidas.

## C.3. FUENTES DE EXPOSICIÓN EN EL HUMANO

La mayor fuente de exposición para la población general, es por **ingestión** del agua de bebida, de una fuente subterránea o superficial contaminada. Altas concentraciones de As en el agua se han reportado en Asia: Bangladesh, India, China, Taiwán; Europa: Hungría; América del Sur: Argentina, Chile, México; y América del Norte: nordeste y oeste de EEUU.

En aguas naturales, el As se encuentra en general como especie disuelta, formando oxianiones. El As presente en el agua de bebida es principalmente $As_i$.

En general, en aguas superficiales, el As (V) predomina sobre el As (III). En aguas subterráneas pueden encontrarse ambos estados de oxidación ya que las concentraciones de As (III) y As (V) dependen de la entrada de As en el sistema, de las condiciones redox y de la actividad biológica (Bundschuh J et al. 2008).

La segunda vía de exposición es por ingesta de alimentos. Los peces o crustáceos pueden contener cantidades de As orgánico. Los granos y vegetales crecidos en zonas contaminadas con As o regadas o hervidas con aguas arsenicales incorporan As en sus tejidos. La preparación de las comidas con aguas arsenicales aumenta el contenido de As en un 10 a 30% para la mayoría de los alimentos, y en 200 a 250% para legumbres y

granos, que absorben casi toda el agua de cocción. Sin embargo, la ingesta de agua de bebida contaminada con As es una vía más perjudicial que la proveniente por alimentos ya que la biodisponibilidad del As en el agua de bebida es mayor que la presente en los granos o en los vegetales.

En los humanos la exposición por **inhalación** ocurre como consecuencia de la actividad industrial (por ejemplo en la fundición de minerales), producción de energía (por ejemplo en las plantas eléctricas de carbón), actividad minera o por inhalar el humo del cigarrillo. El As se emite a la atmósfera por un proceso de altas temperaturas como las que se utilizan en las plantas de generación de energía, vulcanismo o quemado de vegetación. En esos casos, se libera a la atmosfera principalmente como $As_2O_3$ que existe en forma de partículas que se dispersan por el viento.

La absorción por **vía dérmica** es generalmente despreciable, aunque efectos sistémicos han sido reportados en raras ocasiones.

Por otra parte, el As ha sido utilizado por muchos años en productos medicinales para una gran variedad de dolencias, incluyendo infecciones parasitarias, lesiones en la piel, bronquitis crónica, asma, anemia perniciosa, cáncer de piel y sífilis. De todas formas, actualmente, los compuestos arsenicales utilizados en el área medicinal son importantes solamente en el tratamiento de ciertas infecciones protozoarias.

Entonces la ingestión de comida contaminada con As, la inhalación de arsina en entornos industriales, y la exposición a herbicidas y pesticidas pueden contribuir a aumentar la exposición a As en el humano. Los efectos adversos que este compuesto produzca en la salud, dependerán de la dosis, duración de la exposición y del estado nutricional de la población expuesta (Rahman et al. 2009a).

## C.4. ARSÉNICO EN EL AGUA DE BEBIDA

En el año 1963, la organización mundial de la salud (OMS) recomendó un nivel máximo de 50 µg/L de As en el agua de bebida. Al aumentar la evidencia que demuestra una relación entre la exposición a bajos niveles de As y el riesgo de cáncer,

en 1992 la OMS bajó el nivel máximo admisible a 10 µg/L(World Health Organization 1993).

Actualmente, el nivel máximo admisible de As en el agua de bebida se mantiene en **10 µg/L** (lo que equivale a **10 ppb** o **0,01 mg/L = 0,01 ppm**), comenzando a regir este valor en Taiwán desde el año 2000, en la Unión europea desde el 2003 y en EEUU desde 2006. De todas formas, el estándar nacional de As en el agua de bebida en algunos lugares como Bangladesh, India y China se mantiene en 50 µg/L (Tseng 2009).

A nivel nacional se encuentra vigente desde mayo del año 2007 mediante la Resolución Conjunta de la Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias Nº 68/2007 y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos Nº 196/2007, la modificación de los artículos 982 (que establece una concentración máxima de As en agua de bebida de 50 ppb desde el año 1994) y 983 de criterios de calidad de agua de bebida del Código Alimentario Argentino, que establece un límite de 0,01 mg/l (10 ppb) de As en el agua de bebida de suministro público o envasada. Pero también indica que la autoridad sanitaria competente podrá admitir valores distintos si la composición normal del agua de la zona y la imposibilidad de aplicar tecnologías de corrección lo hicieran necesario. De tal forma que, para aquellas regiones del país con suelos de alto contenido de As, se establece un plazo de hasta 5 años para adecuarse al valor de 0,01 ppm. El agua envasada de estas zonas deberá consignar en el rotulado la localidad de elaboración y no podrá expenderse fuera de ella. La autoridad sanitaria competente deberá informar la nómina de los productos así autorizados a las restantes jurisdicciones y a la Autoridad Sanitaria Nacional (García 2011).

El consumo de agua contaminada con As por estos mecanismos ambientales naturales no produce casos de intoxicación aguda. Los efectos son crónicos derivados de la ingesta de pequeñas cantidades de As en el agua y en otros alimentos contaminados por el agua durante largos períodos de tiempo (García 2011).

## C.5. METABOLISMO DEL ARSÉNICO

El $As_i$ es la forma más común de As en el medio ambiente. Se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y es biotransformado en el hígado y otros tejidos. La mayoría de los mamíferos, incluyendo a los ratones, ratas y seres humanos, biotransforman el $As_i$ a través de una serie de metilaciones oxidativas y reductivas (Carter et al. 2003; Vahter 2002). Sin embargo la vía metabólica no está del todo esclarecida. En un rango de pH de 4-10, los compuestos arsenicales trivalentes mantienen carga neutra y los compuestos pentavalentes se cargan negativamente. Entonces las especies trivalentes pueden atravesar la membrana celular fácilmente, mientras que las pentavalentes no pueden entrar a las células al pH fisiológico (Cohen et al. 2006). El **arseniato** inorgánico es reducido principalmente a **arsenito** en el flujo sanguíneo antes de entrar a la célula para ser metabolizado. También se sabe que tanto el arseniato como el arsenito pueden ser transportados activamente a las células vía acuaporinas y transportadores fosfato, respectivamente (Rosenblatt and Burnstein 2009).

En la **Figura 16** se muestra la vía de transformación clásica del As más aceptada. En esta vía el arsenito inorgánico es el sustrato preferencial de la enzima $As^{III}$-metiltransferasa. El metabolismo involucra una serie de metilaciones reductivas y oxidativas, en las cuales las especies pentavalentes del As se transforman a sus formas trivalentes (reacciones que tienen lugar en el plasma), y los metabolitos mono y dimetilados se generan secuencialmente (reacciones que ocurren principalmente en el hígado). La reducción de ácido monometil- arsónico ($MMA^{V}$) a ácido monometil - arsenoso ($MMA^{III}$) podría ser el paso limitante (Zakharyan et al. 2001).

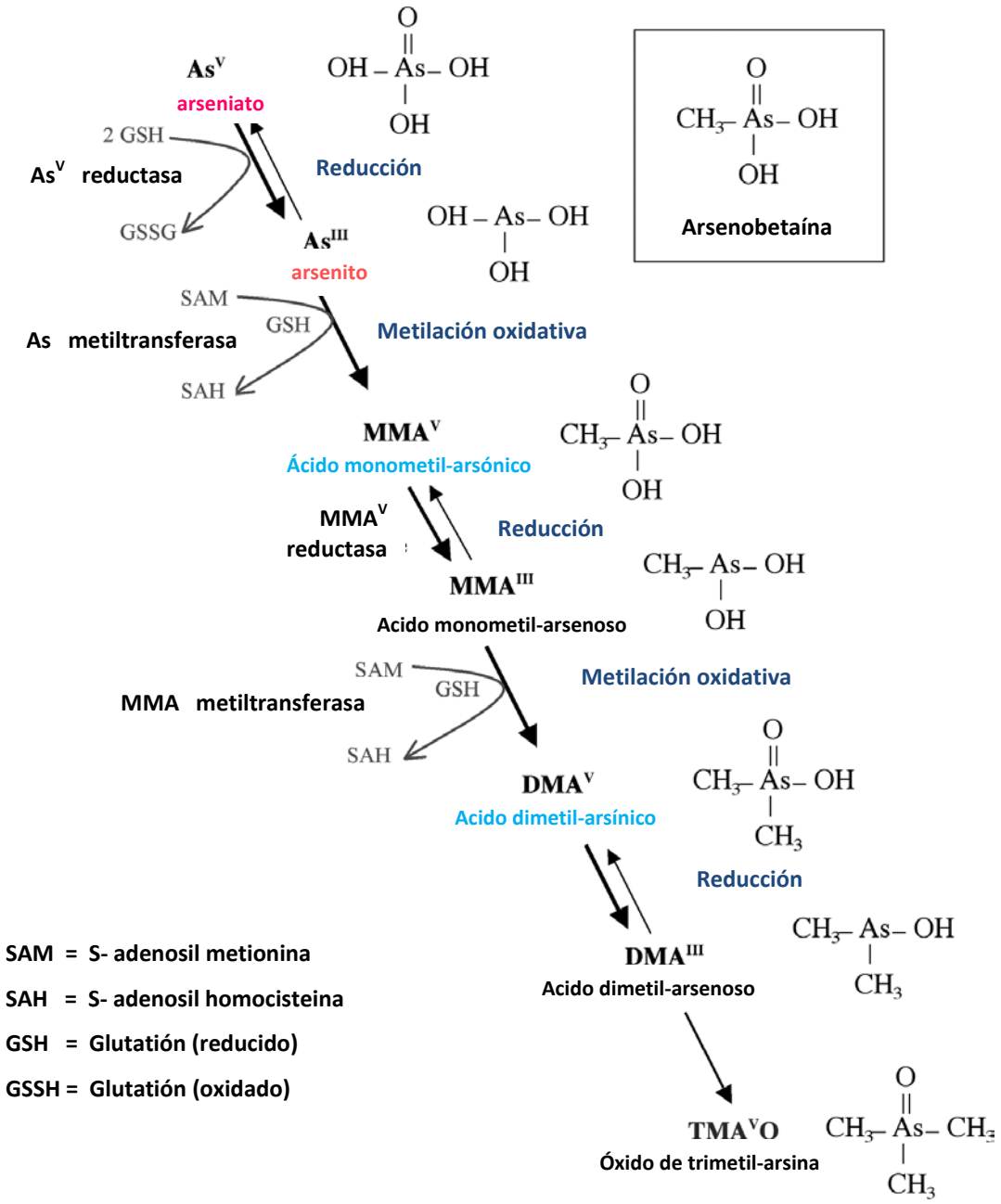



**Figura 16.** Vía de metabolismo clásico del As. Modificado de A. Wang.

La reducción esta facilitada por reductasas y la forma reducida del glutatión (GSH) además de otros posibles tioles dadores de electrones. La metilación oxidativa se lleva a cabo por metiltransferasas y la S-adenosil metionina (SAM) sirve como principal dador de metilos. Además, tanto ratas como ratones son más efectivos en la metilación del As que los humanos.

En algunos animales, incluyendo las ratas (Lu et al. 2003), el producto final del metabolismo es el óxido trimetil- arsínico ($TMA^{V}O$). En humanos, este proceso metabólico no se completa y el $As_i$ junto a los metabolitos mono y dimetilados son excretados principalmente en la orina, y en menor medida en la bilis. En cambio, la forma de As orgánico: arsenobetaína, se excreta sin cambios en la orina. Sólo una parte del As se acumula en estructuras biológicas variando significativamente según el órgano blanco, el tiempo y la dosis a la cual se está expuesto. La acumulación se produce en estructuras ricas en queratina, como pelo y uñas y también en otros tejidos como hígado y riñón. Es sabido que las ratas retinen más cantidad de As como consecuencia de la mayor afinidad de este metaloide (en especial el $DMA^{III}$) por sus glóbulos rojos. La retención total del $As_i$ en las ratas es 20 veces mayor que en los ratones expuestos a dosis similares (Vahter 1981). A pesar de la acumulación de As en los eritrocitos, el As se distribuye a todos los tejidos incluyendo al feto.

Por mucho tiempo, se creyó que la metilación del As era una simple reacción de detoxificación del As. Sin embargo, varios trabajos sugieren que es un proceso metabólico más, complejo debido a que los perfiles de toxicidad de los mteabolitos varían *in vivo*. $MMA^{III}$ y $DMA^{III}$ se han reportado que son más tóxicos que otros metabolitos de $As_i$ (Thomas et al. 2001). De esta manera la metilación puede no ser un mecanismo de detoxificación para el metaloide, y aún podría considerase como una vía de activación. De hecho, se observan más efectos tóxicos en humanos que presentan una tasa de metilación más alta que aquellos que excretan menos especies metiladas y más As inorgánico.

## C.6. DISTRIBUCIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS CON ARSÉNICO EN EL MUNDO

Millones de personas en el mundo están en riesgo de padecer los efectos adversos de la exposición al As. La mayor parte de la exposición peligrosa proviene del agua de bebida extraída de pozos excavados en zonas con sedimentos ricos en As.

En EEUU hay regiones extensas de agua subterránea contaminada incluyendo a New Hampshire, Maine y otros estados del noreste; Michigan y otros estas del norte; vastas áreas del suroeste; áreas de las montañas rocosas y regiones de California. Generalmente los niveles de As en este país, son menores a las encontradas en otras partes del mundo como Bangladesh, con pozos contaminados con altas concentraciones de As que van de 10-100 ppb, aunque algunos pozos se han encontrado con niveles de 800-1000 ppb. Además, el problema es extensivo a aéreas rurales, siendo aproximadamente unas 259 millones de personas las que estarían expuestas a agua de bebida con exceso de As.

La situación en Bangladesh y Bengal es radicalmente diferente. En los años 70 cuando UNICEF, en respuesta a las epidemias de cólera, disentería y otras enfermedades relacionadas con aguas contaminadas de fuentes superficiales, apoyó la iniciativa de cambiar la fuente de agua de estas poblaciones, millones de pozos se excavaron en terrenos ricos en As y el agua extraída de algunos pozos alcanzaba niveles de As de 500 a 1000 ppb. Posteriormente los estudios de campo revelaron que la población en riesgo ascendía a más de 500 millones (2004), la “peor intoxicación en masa de la historia” según la OMS (García 2011).

Extensas áreas de China también enfrentan este problema, con más de 3 millones de personas expuestas. Por ejemplo, en la provincia de Shanxi, más del 50% de los pozos que abastecen a la población contienen concentraciones superiores a 50 ppb de As(García 2011).

En Ghana, la contaminación del agua y alimentos con As se debe a la explotación minera del oro.

En Nepal, se calcula que alrededor de 500.000 personas se abastecen de pozos superficiales con aguas arsenicales; y que 1 de 20 individuos tienen manifestaciones dermatológicas de HACRE(García 2011).

## C.7. AGUAS CONTAMINADAS CON ARSÉNICO EN ARGENTINA

En el año 2000 se estimaba que más de dos millones de personas en Argentina estaban potencialmente expuestas a la ingestión de aguas con más de 50 ppb de As. Numerosos trabajos pusieron de manifiesto que la extensión geográfica del área afectada en Argentina es mucho más grande de lo que inicialmente se pensaba. El área afectada se extiende en un continuo noroeste-sureste desde el Altiplano hacia la costa atlántica. El límite meridional corresponde a los cursos de los ríos Desaguadero y Colorado, y el limite septentrional provisoriamente se ha fijado en el borde norte del Altiplano, y en los cursos de los ríos Bermejo y Paraná. Esta vasta zona puede subdividirse en:

- Zona cordillerana, que incluye el Altiplano, la Puna y áreas limítrofes;
- Zona peri cordillerana, y
- Zona pampeana.

A excepción de algunos pocos casos (minas y fundiciones), el origen del As es natural y está relacionado con el vulcanismo y la actividad hidrotermal asociada de la cordillera de los Andes. La dispersión secundaria a través de aguas superficiales ha sido el mecanismo dominante que ha llevado al As hasta la costa atlántica.

Diferentes trabajos han logrado determinar los niveles de As alcanzados en aguas de diferentes regiones del país: **Chaco:** ›0.7 ppm; **Santiago del Estero:** entre 0.143-2.4 ppm; **Córdoba:** ›0.1 ppm; **Catamarca:** 0.01 -0.17 ppm; **Buenos Aires:** ›0.05 ppm (centro-norte) y 0.15 ppm (sudoeste); **Mendoza:** 0.01 ppm al sur y 0.22 ppm al noreste y noroeste (García 2011).

En la **Figura 17** se puede observar la distribución del As en el agua de bebida a lo largo del país.

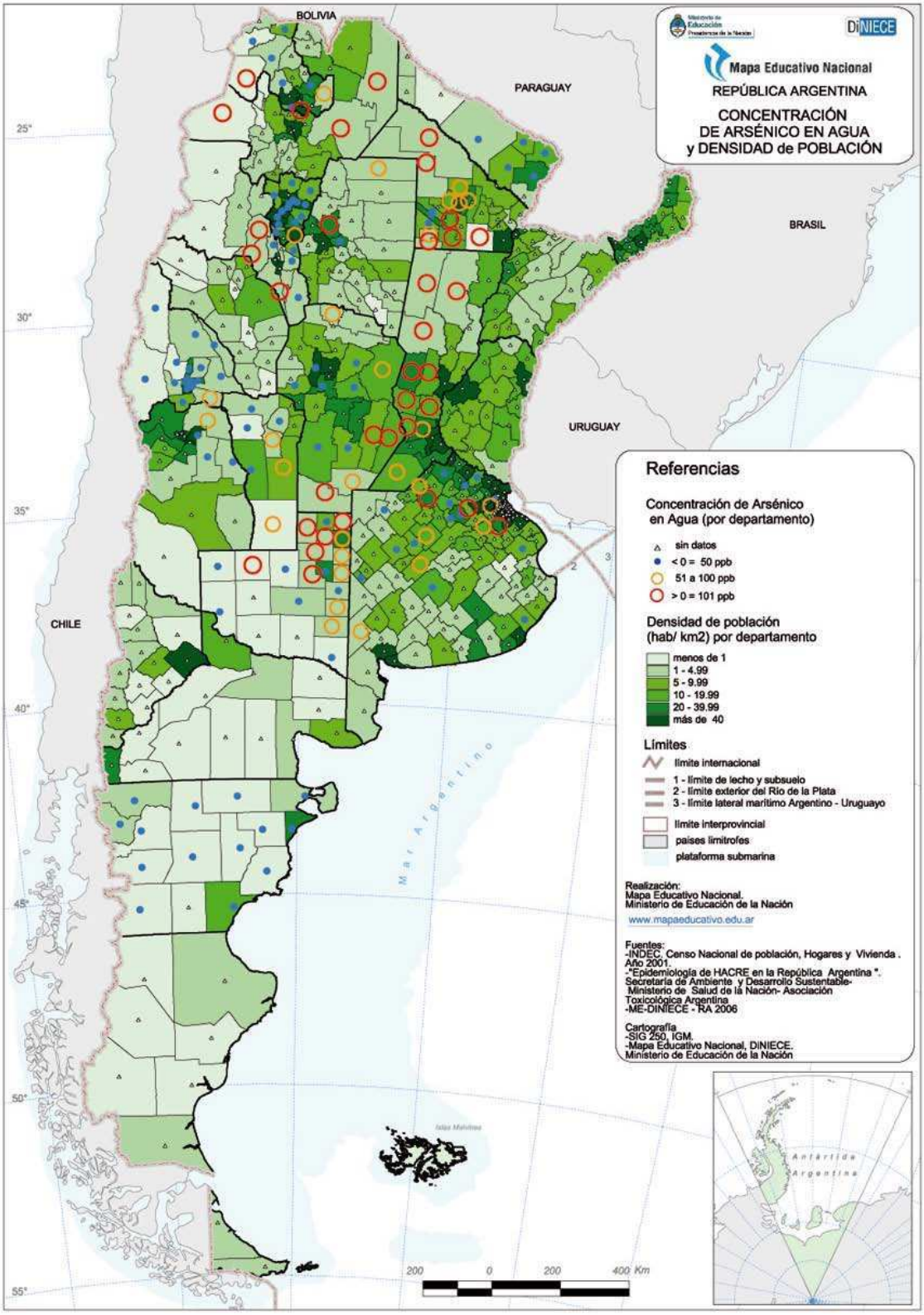



**Figura 17.** Mapa de la Argentina donde se representa la distribución de la concentración de As en el agua. Los **O** = ›0.101 ppm; **O** = entre 0.051 y 0.1 ppm; •‹0.05 ppm; ^ = sin datos. Tomado de (Ministerio de educación, 2008).

## C.8. HIDROARSENICISMO CRÓNICO REGIONAL ENDÉMICO (HACRE)

El conocimiento de la presencia de elevadas concentraciones de As en agua y sus efectos en la salud están bien documentados en Argentina desde principios del siglo XX. Entre los casos más emblemáticos, y con mayor repercusión mundial, de afectación de la salud por el As en el agua de consumo humano, se destaca el de Bell Ville en Córdoba. El gran número de casos de HACRE en esta ciudad hizo que la patología se conociera como "enfermedad de Bell Ville" hasta 1913, año en que Goyenechea y Pusso relacionaron las patologías observadas con el consumo de agua contaminada con As. Más tarde, esta patología fue descripta en detalle por Ayerza y la denominó "hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE)" (1917).

El HACRE produce alteraciones cardíacas, vasculares y neurológicas, repercusiones en el aparato respiratorio y lesiones hepáticas, renales e hiperqueratosis cutánea (**Figura 18**) que avanzan progresivamente hasta las neoplasias o cáncer (García 2011).

**Hiperqueratosis palmar**

**Hiperqueratosis plantar**

**Figura 18.** Fotos representativas de la hiperqueratosis característica producida por el S.I. García (García 2011).

## C.9. EL ARSÉNICO COMO DISRUPTOR ENDÓCRINO

Últimamente, se le ha dado una gran importancia al papel de los metales en la disrupción endócrina y su relación con algunos receptores hormonales. El resultado de numerosos trabajos sugieren que los compuestos arsenicales producen efectos adversos en la salud debido en parte a alteraciones en el sistema endócrino. Los

compuestos trivalentes de As, incluyendo al arsenito de sodio, reaccionan con moléculas ricas en grupos tioles como las cisteínas y presentan gran afinidad a ditioles y monotioles. Varios estudios reportaron que el As puede actuar como potente disruptor endócrino alterando la regulación génica de los receptores de hormonas esteroideas (SR): receptores de glucocorticoides (GR), mioneralocorticoides (MR), progesterona (PR) y de andrógenos (AR). Los SR presentan en su dominio de unión al ADN (DBD) residuos de cisteínas bien conservados, por lo cual compuestos de As trivalentes pueden interactuar en esta región y regular su actividad disrumpiendo su unión al ADN. Todos los receptores arriba mencionados mostraron una respuesta compleja similar dosis dependiente al As: estimula en la actividad transcripcional de estos receptores a muy bajas dosis de AS y la supresión de la misma a dosis altas pero no tóxicas. Sin embargo, interesantemente el As estimula la actividad trasncripcional del receptor de $E_2$ por unión al dominio de unión al ligando (LBD) del receptor (Stoica et al. 2000).

## C.10. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ARSÉNICO

El mecanismo de acción de los compuestos arsenicales no se encuentra completamente esclarecido, y múltiples factores se necesitan para entenderlo. Estos factores varían entre propiedades físico-químicas como el estado de valencia (trivalentes/pentavalentes), el grado de metilación, carga a pH fisiológico, atracción y repulsión electrostática a sitios activos en macromoléculas importantes, hasta factores farmacocinéticos (absorción, distribución, metabolismo, unión a proteínas y excreción). Existen numerosos mecanismos propuestos sobre la capacidad del As para influir en numerosos procesos patológicos. Entre ellos se incluyen: alteraciones en las vías de señalización, control del ciclo celular, reparación del ácido desoxiribonucleico (ADN), entre otros (Abernathy et al. 1999; Aposhian and Aposhian 2006; Rossman 2003). El estrés oxidativo es uno de los mecanismos de acción más estudiados por el que el As realizaría su acción tóxica (Ercal et al. 2001).

### C.10.1. ESTRÉS OXIDATIVO

El sistema redox es esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular. En condiciones fisiológicas, las células mantienen el equilibrio redox a través de la generación y eliminación de **especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS)**. Las ROS incluyen radicales tales como el superóxido ($O_2^-$ ) y radical hidroxilo ($HO^\bullet$), junto con especies no radicales tales como peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$). RNS incluyen óxido ($NO^\bullet$) y peroxinitrito nítrico ($ONOO^-$). Las ROS derivan de oxígeno molecular, un obligado componente de organismos eucariotas, cuya reducción es el principal mecanismo para su formación.

El delicado equilibrio entre la generación de ROS y su eliminación se mantiene por muchos mecanismos complejos, y una disfunción de cualquiera de ellos podría conducir a alteraciones en el estado redox celular. Un aumento en la producción de ROS o una disminución en la capacidad de su eliminación debido a estímulos exógenos (irradiación, contaminantes ambientales, compuestos químicos) o alteraciones metabólicas endógenas, pueden perturbar la homeostasis redox y conducir a un aumento global en los niveles de ROS intracelulares, o al estrés oxidativo. El estrés oxidativo es, entonces, una situación en la cual las concentraciones intracelulares de las ROS se encuentran incrementadas sobre los valores fisiológicos. Puede producirse por aumento en la velocidad de producción de las mismas, una disminución de los niveles de antioxidantes o una combinación de ambas (Sies and CADENAS 1985).

Las alteraciones en los niveles de ROS/RNS pueden modificar las funciones de proteínas a través de la regulación de su expresión, modificaciones postraduccionales y/o de su estabilidad(Trachootham et al. 2008).

Las ROS pueden ser generadas por una gran variedad de mecanismos en las células de organismos con metabolismo aerobio. Son producidos principalmente en mitocondrias, como así también en peroxisomas, citosol y retículo endoplásmico. Las ROS pueden también ser producidas en los tejidos por acción enzimática, por enzimas como la óxido nítrico sintasa, la xantina oxidasa, NADPH oxidasa y citocromo P450. También se producen en el proceso de autooxidación de catecolaminas, el

metabolismo del ácido araquidónico y en la cadena respiratoria mitocondrial (Xia et al. 1998; Griendling et al. 2000)).

En las células existen sistemas de defensa específicos, cuya función es la de metabolizar las ROS. Los mismos se denominan **sistemas de defensa antioxidante** y se los puede clasificar en dos grandes grupos: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Dentro del primer grupo encontramos a enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, mientras que formando parte de los antioxidantes no enzimáticos podemos nombrar al glutatión (GSH), ácido ascórbico, ácido úrico, vitamina E, coenzima Q10 y los carotenos (Nordberg and Arner 2001).

Los lípidos son más susceptibles a la modificación oxidativa. La **peroxidación lipídica** genera radicales de lípidos, que pueden atacar subsecuentemente a otras moléculas de lípidos y generar como una reacción en cadena. El proceso de reacción en cadena consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

Es así como, el aumento del estrés oxidativo juega un papel crucial en una variedad de condiciones patológicas, incluyendo cáncer, enfermedades neurodegenerativas, y el envejecimiento.

## C.11. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO EN EL HUMANO

La exposición aguda a dosis altas de $As_i$ puede ser fatal. En el ser humano adulto, el rango letal de $As_i$ se estima en dosis entre 1-3 mg/kg. La toxicidad aguda por As en humanos, se caracteriza por malestar gastrointestinal, vómitos, diarrea, sangre en la orina, anuria, shock, convulsiones, coma y la muerte.

En 1980 el $As_i$ fue clasificado como carcinógeno por la agencia internacional para la investigación del cáncer(International Agence for Research on Cancer (I.A.R.C) 2004)), pero sus efectos tóxicos a largo plazo se conocieron ya en el siglo XIX (US EPA 1982). Además la organización mundial de la salud (OMS) ha clasificado al As como compuesto carcinogénico para humanos.

Más de 130 millones de personas, principalmente en los países en desarrollo, están siendo expuestos a As en el agua de bebida a niveles por encima del máximo admisible

por la OMS (Mandal et al. 2001; van Halem et al. 2010). El primer estudio epidemiológico relacionado a efectos en la salud producidos por exposición a As en agua de bebida estudió lesiones en la piel cancerosas y no cancerosas, como hiperpigmentación, queratosis en las palmas de las manos y plantas de los pies, en sujetos con "enfermedades de pies negros" en Taiwán (Chen and Wu 1965). A partir de mediados de 1980, el número de estudios epidemiológicos en el mundo aumentó. Inicialmente, se enfocaban en las manifestaciones cutáneas y cánceres, pero recientemente lo han hecho en las enfermedades cardiovasculares y diabetes insulino independiente. Estas investigaciones fueron las primeras llevadas a cabo en áreas endémicas con concentraciones de As muy altas (cientos de microgramos por litro) como en Taiwán, India, Bangladesh. Para estas poblaciones, alto riesgo en la salud se ha destacado y relacionado con la ingestión crónica de agua contaminada con As, principalmente para cánceres primarios (de piel, pulmón, riñón y vejiga) y otras enfermedades crónicas como lesiones en la piel inducidas por As, enfermedades cardiovasculares, neurológicas y diabetes observadas en áreas endémicas con arsenicismo (Vizcaya-Ruiz et al. 2009; States et al. 2009). Más recientemente, efectos similares se observaron en estudios hechos en países con menores niveles de As (entre ›50µg/L y cientos de µg), como en Chile, EEUU, Europa y nuestro país, Argentina.

La exposición crónica a $As_i$ está asociada a pérdida del peso corporal (Nandi et al. 2005), cáncer de piel, sensación de ardor en la vista, hinchazón de las piernas, fibrosis hepática, enfermedades crónicas de pulmón, gangrena en los pies (Mazumder 2005), desórdenes metabólicos como diabetes (Longnecker and Daniels 2001; Tseng et al. 2000) y disfunciones del sistema endócrino (Rahman et al. 1998), nervioso (Del Razo et al. 2001) y reproductivo (Borzsonyi et al. 1992).

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES

## HIPÓTESIS

La exposición a arsenito de sodio en el agua de bebida desde la gestación, afecta el eje hipotálamo- hipófiso- gonadal y el metabolismo de la glucosa en ratas *Sprague Dawley* preñadas, en desarrollo y adultas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue dilucidar, por su importancia básica y aplicada, los efectos del As sobre la reproducción y el metabolismo de la glucosa. Estudiamos los efectos de la exposición a este disruptor endócrino en el agua de bebida tanto en las madres como en sus crías en ratas *Sprague Dawley*.

### Objetivos específicos

Para poder verificar o refutar la hipótesis planteada en la presente Tesis Doctoral, nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

I. Determinar los efectos que produce la exposición a arsenito de sodio en el agua de bebida desde el día 1 de gestación, en ratas *Sprague Dawley* durante la preñez y el postparto, en el eje reproductivo y metabolismo glucídico.

II. Evaluar los efectos de la exposición a arsenito de sodio en crías de ratas *Sprague Dawley*, expuestas desde la concepción hasta la adultez, en distintos estadíos del desarrollo, en el eje reproductivo y metabolismo glucídico.

# MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

## ANIMALES

Se utilizaron ratas de la especie *Rattus norvegicus*, de la cepa Sprague- Dawley, de la colonia del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Las primeras parejas a partir de las cuales se estableció la colonia fueron traídas del Laboratorio de Charles Rivers, en el año 1985. Los animales fueron mantenidos en cuartos con aire acondicionado a 23°C y con un fotoperíodo de 12hs (luces encendidas de 07:00hs a 19:00hs), alojados en jaulas de acero con viruta de madera y tuvieron libre acceso a alimento balanceado (Cargill) y líquido en botellas de vidrio (a menos que se indique lo contrario). Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a protocolos para el uso de animales, aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (IBYME- CONICET) y por el National Institute of Health (NIH).

## MODELO EXPERIMENTAL

Ratas Sprague Dawley fueron puestas en apareo en una relación de 3 hembras: 1 macho y se examinó la presencia de tapón vaginal todas las mañanas. El día en el cual se confirmó la presencia de espermatozoides en el fluido vaginal, se asignó como día 1 de gestación (DG 1), se dividieron las hembras en jaulas separadas y se las expuso en el agua de bebida a 5 (A5) o 50 ppm (A50) de arsenito de sodio diluido en agua destilada. El grupo Control recibió agua destilada.

Un grupo de madres fueron sacrificadas al DG 18 para evaluar distintos parámetros reproductivos en esta etapa. El otro grupo de madres, continuó su preñez y el día del parto cada camada se ajustó a un número de 8 crías por madre (4 hembras/ 4 machos cada vez que fue posible).

Las crías hembra y macho de cada madre se destetaron al día postnatal 21 (DPN 21), dividiéndolas en dos grupos: uno de ellos continuó recibiendo el mismo tratamiento que su madre (grupos A5-A5 y A50-A50) y el otro comenzó a beber agua

destilada (A5-C y A50-C) hasta el día de su sacrificio. Las crías de las madres control continuaron recibiendo agua destilada. A su vez, las madres se separaron en diferentes jaulas exponiéndolas al mismo tratamiento asignado desde el principio del experimento. Este grupo de madres fueron sacrificadas a los 2 meses postparto.

Se evaluó el estadío del ciclo estral en las madres y crías hembra de cada grupo experimental durante un mes, examinando el frotis vaginal bajo microscopio óptico. Luego se determinó el porcentaje de días en ciclos normales (ciclos de 4-5 días) y en anestro (falta de ritmicidad en los ciclos).

En todos los estudios experimentales realizados se intentó minimizar al máximo las condiciones de estrés debido a su su importante efecto sobre los niveles hormonales.

En este trabajo evaluaremos los efectos de la exposición al As en el agua de bebida tanto en las madres como en sus crías en distintas etapas de su vida, los cuales desarrollaremos con mayor profundidad en el Capítulo I y Capítulo II, respectivamente.

## PREPARACIÓN DEL ARSENITO DE SODIO

El arsenito de sodio ($NaAsO_2$) (Interchemistry, Buenos Aires, Argentina) fue disuelto en agua destilada para obtener concentraciones de 5 ppm (**A5**) y 50 ppm (**A50**) en el agua de bebida. Estas concentraciones son equivalentes a una ingesta diaria de aproximadamente 0.6 y 6 mg $As_i$/ kg/día, respectivamente, en ratas adultas. El agua se renovó cada 2-3 días para evitar la oxidación del As.

## MEDICIÓN HORMONAL POR RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

### OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

#### SUEROS

Al sacrificar las ratas (madres y crías) por decapitación, se recolectó la sangre troncal en tubos de ensayos y se dejó coagular a temperatura ambiente durante aprox. 4 horas. Luego se trasvasó el suero (fase superior) a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se

centrifugaron luego a 2000 rpm durante 10 minutos. Se transvasó el suero remanente a otro tubo de 1.5 mL. Los sueros así obtenidos, se guardaron a -20ºC hasta la medición de las hormonas por RIA.

**TEJIDOS**

Se recolectaron el hipotálamo (HT) y las gónadas de las madres y crías de ambos sexos de cada grupo experimental, se pesaron y guardaron a -20ºC hasta su homogeneización. Los páncreas de las madres fueron recolectados y guardados a -20ºC hasta su homogeneización.

Para medir el contenido de GnRH hipotalámico, se homogeneizaron los HT en 100 µl de HCl 0.1 N a 4ºC, mediante un homogeneizador como fue descripto previamente por Heger y col. y Catalano y col. (Heger et al. 2003; Catalano et al. 2010). El homogenato se centrifugó por 30 minutos a 13,000 x g a 4ºC y se recuperó el sobrenadante; este procedimiento se repitió para extraer GnRH remanente en el precipitado. Las muestras se guardaron a -20 ºC hasta que se llevaron a cabo los ensayos de RIA para GnRH.

Para la medición del contenido ovárico de testosterona (T), estradiol ($E_2$) y Progesterona ($P_4$), los tejidos se homogeneizaron en 900 µl /ovario de *buffer* Tris-ClH 10 mM pH 7.5 mediante un homogeneizador eletromecánico (Polytron®, Kinematica AG, Suiza). Los homogenatos se centrifugaron a 750 x g durante 10 minutos a 4ºC y se recuperaron los sobrenadantes.

Se extrajeron alícuotas de 450 µl de los sobrenadantes de la homogeneización de los ovarios dos veces con 3 mL de éter etílico por vez para la realización de los RIA de $E_2$, $P_4$ y T. Los extractos se evaporaron en un baño a 50ºC en campana química y se disolvieron, posteriormente, en *buffer* fosfato 0.075 M, azida sódica 0,02%, NaCl 154 mM, pH 7.0, conteniendo 0,1% (P/V) de gelatina (*buffer* fosfosalino gelatina): 1.2 mL.

Para la medición del contenido pancreático de Insulina y Glucagon, se homogenizaron los páncreas enteros en 40 volúmenes de etanol ácido (75% Etanol, 25% ácido acético (25% v/v)) mediante un homogeneizador eletromecánico (Polytron®, Kinematica AG, Suiza). Los homogenatos fueron incubados a 4°C hasta el día siguiente

y centrifugados a 2000 g, 4°C por 10 min. Se obtuvo el sobrenadante y se neutralizó con igual volumen de Tris 0.85 M. Luego de una incubación a -20°C por 1 hora, se centrifugaron las muestras a 3000g, 4°C por 30 min. Se separó el sobrenadante y se conservó a -70°C hasta la medición de hormonas por RIA.

## RIA DE HORMONAS PROTEICAS

Los niveles séricos basales de LH, FSH y de PRL fueron determinados por RIA por doble anticuerpo (Libertun 1980). Las muestras fueron evaluadas por duplicado en alícuotas de 100 µl de suero de rata para LH; 100 µl para FSH y 25 µl para PRL.

### RIA DE HORMONA LUTEINIZANTE (LH)

La hormona LH se cuantificó usando el kit de reactivos provistos por el NIDDK, NIH (EEUU).

Se utilizó 2.5 µg de LH purificada, r-LH-I10. La hormona liofilizada se disolvió en una solución de *buffer* fosfosalino compuesto por *buffer* fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M y azida sódica 0.01% pH final 7.4 (PBS) 0.01 M a una concentración final de 100µg/ mL. La marcación se efectuó en tubos de vidrio, bajo campana. Se usó $^{125}$I (Perkin Elmer, EEUU), libre de portador y apto para marcar proteínas. Las soluciones que se emplearon fueron: *buffer* fosfato 0,5 M pH 7.5; *buffer* fosfato 0,05 M pH 7.5; PBS; solución de transferencia: 100 mg de IK, 0.8 g de sacarosa y cantidad suficiente de $H_2O$ para alcanzar un volumen final de 10 mL; solución de cloramina-T: 100 mg/100 mL de *buffer* fosfato 0.05 M preparada inmediatamente antes de su uso; solución de metabisulfito de sodio: 100 mg/10 mL de *buffer* fosfato 0.05 M.

Se procedió a la separación la hormona marcada del $^{125}$I libre mediante una columna de tamiz molecular de Biogel P-10 gel (Bio- Rad Laboratories, CA, EEUU), en *buffer* fosfato 0.05 M. Los sitios activos de dicha columna fueron saturados previamente mediante el pasaje de 1mL de PBS con EDTA 0.05 M y 2% de BSA.

**Procedimiento de marcación**

A la hormona disuelta en PBS se le añadieron 10µl de *buffer* fosfato 0.5 M y luego 0.5 mCi de $^{125}$I (NEZ033H Perkin Elmer, EEUU). La oxidación se efectuó con 11.25µl de la solución de cloramina-T, bajo agitación suave durante 60 segundos. La reacción se detuvo con 6.25 µl de metabisulfito de sodio. Luego se agregaron 100 µl de la solución de transferencia (que verifica si hubo un exceso de agente oxidante), y el contenido del tubo de marcación fue pasado por la columna de separación. Para la corrida se utilizó *buffer* fosfato 0.05 M. Se recogieron aproximadamente 500 µl de eluído por tubo, y se registró la radioactividad de 10µl de cada uno de los tubos en un contador gamma Packard para determinar dónde se encontraba el pico de hormona marcada. Con las columnas empleadas se obtuvo una buena separación de los picos de hormona marcada, que sale con el $V_0$ y de $^{125}$I, no incorporado a la proteína, que es incluido en la columna. Los tubos de marcación conteniendo la hormona marcada se reunieron en uno y se congelaron en alícuotas para su posterior uso en RIA.

**Protocolo de RIA**

El primer antisuero contra LH de rata fue NIDDK-Anti-Rat-LH-S-11 obtenido al inmunizar conejos con LH de rata altamente purificada semejante a la NIDDK-rLH-I-10. El anticuerpo se diluyó en PBS, EDTA 0.05 M con 0.25% de suero de conejo normal, pH 7.4, a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo. La dilución inicial fue de 1:274400. El estándar de referencia fue LH purificada de hipófisis de rata (NIDDK-Rat-LH-RP3), con un mínimo de contaminante de FSH y TSH. La curva de concentraciones del estándar de referencia (de 0.015 a 8 ng por tubo) y la dilución de las muestras (suero u homogenato de adenohipófisis) fueron realizadas en PBS con 1% de albúmina de huevo (*buffer* EA). La separación se logró por segundo anticuerpo, usando antisuero de oveja contra globulina de conejo diluido en PBS-polietilenglicol 6000 8%, en diluciones de trabajo establecidas previamente (dilución inicial 1:500).

Los resultados fueron expresados en términos de los estándares de LH de rata RP3. La sensibilidad del ensayo fue de 0.21 ng/mL de suero y los coeficientes de variación intra e inter-ensayos fueron de 7.2% y 11.4% respectivamente.

El protocolo de rutina fue el siguiente: se agregaron 100 µl del primer anticuerpo (diluído en PBS-EDTA-NRS 0.25%) y 100 µl de la hormona trazadora (entre 17.000 y 20000 cpm por tubo diluida en *buffer* EA) a la curva patrón y a las alícuotas experimentales preparadas en *buffer* EA (400 µl final); luego de una incubación de 24 horas a temperatura ambiente se agregaron 500 µl del segundo anticuerpo en polietilenglicol 6000 8%. Se incubaron los tubos durante 2 horas a temperatura ambiente y durante 1 hora a 4ºC. Se separó la hormona libre de la unida, por centrifugación refrigerada (4°C, Beckmman Instruments) a 2000 rpm, durante 30 minutos. El sobrenadante fue aspirado y se leyó la radiactividad asociada al precipitado, correspondiente al complejo hormona-anticuerpo en un contador gamma Packard (Palo Alto, CA, EEUU).

Los RIA para FSH y PRL fueron elaborados de manera muy similar, por lo que se describirá en los próximos, sólo aquellos puntos que difieran.

## RIA DE HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)

La hormona FSH trazadora fue NIDDK-rat-FSH-I-9. El protocolo utilizado para la medición fue similar al empleado para LH. El primer antisuero contra FSH de rata (NIDDK-Anti Rat FSH Serum-11) fue obtenido al inmunizar conejos con FSH de rata altamente purificada semejante a la NIDDK-rFSH-I-9. Se diluyó a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo, siendo la dilución inicial de 1:42000. El estándar de referencia fue FSH purificado de rata (NIDDK-Rat-FSH-RP2), con una contaminación casi nula de LH y TSH. La curva patrón se extiende de 0.12 a 15 ng por tubo. Los resultados fueron expresados en términos de los estándares de FSH de rata RP2. La sensibilidad del ensayo fue 4.8 ng/mL de suero. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayos para fueron de 8.0% y 13.2% respectivamente.

## RIA DE PROLACTINA (PRL)

La hormona trazadora fue NIDDK rPRL-I-6. El primer antisuero fue IgG anti-PRL de rata NIDDK-anti-rat-PRL-RIA-9, obtenido al inmunizar conejos con PRL de rata altamente purificada semejante a la NIDDK-rPRL-I-6. El mismo se diluyó a la

concentración previamente establecida como óptima de trabajo (entre 1:1500 y 1:2500). El estándar de referencia fue PRL de rata NIDDK-rPRL-RP-3. La curva patrón se extiende de 0.04 a 10.00 ng por tubo. Los resultados se expresaron según los estándares RP3 de rata para PRL. La sensibilidad de los ensayos fue 1.6 ng/mL y los coeficientes de variación intra e interensayos fueron 8.1% y 11.4%.

RIA DE INSULINA

Se tomaron dos alícuotas séricas de 75 µl cada una El estándar de insulina (insulina porcina humanizada gentilmente cedida por Laboratorios Beta, Buenos Aires) fue marcado con $^{125}I$ ($Na^{125}I$). Brevemente, 0,5 mCi de $Na^{125}I$ en 10 µL de *buffer* fosfato 0,5 M, pH 7.5 y 3 µL de cloramina-T en 10 µL de PBS 0,05 M fueron agregados a 5 µg del péptido estándar (disuelto en 10 µL de ácido acético 0,1 M). Esta solución se mantuvo durante 60 segundos bajo agitación suave a temperatura ambiente. Luego se agregaron, sucesivamente, otros 2 µl y 2 µl más de cloramina T, incubando 1 y 5 minutos luego de cada agregado. Transcurrido dicho período la reacción se detuvo por dilución mediante el agregado de 200 µL de metabisulfito 2 mM pH 4.5 en *buffer* fosfato 0.05M. Para separar el péptido marcado del iodo libre, se emplearon columnas de tamiz molecular Biogel P10, preparadas y equilibradas en el laboratorio. El producto de la reacción se sembró inmediatamente en esta columna y se eluyó con ácido acético 1 M, recuperando fracciones de 1.5 mL. Las fracciones con marca radiactiva que eluyeron luego del pico del $^{125}I$ libre fueron ensayadas para evaluar la unión específica en un RIA.

**Protocolo de RIA**

El antisuero contra insulina bovina generado en cobayo (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) (Diaz-Torga et al. 2001) presenta reactividad cruzada con insulina de humano y de rata/ratón. Se diluyó en PBS, EDTA 0,05 M con 0.25% de suero de conejo normal (NRS), pH 7.4 a una dilución inicial de 1:12.000 (final de 1:980.000). El estándar de referencia fue insulina porcina humanizada del Laboratorio Beta (Argentina). Los patrones de referencia (de 0.0039 a 1 ng por tubo) y la dilución de las muestras fueron realizadas en *buffer* IGF-1. Se incluyeron tubos sin hormona fría para determinar la unión inespecífica del anticuerpo. Se agregó un segundo anticuerpo contra IgG de

cobayo hecho en conejo, y la separación se logró por el agregado de un tercer anticuerpo, usando antisuero de oveja contra IgG de conejo diluido en PBS-PEG 8000 12%, NRS 1% (dilución inicial 1:500).

La sensibilidad del ensayo fue de 0.18 ng/mL y los coeficientes de variación intra e inter-ensayos fueron de 7.2% y 11.4% respectivamente.

El protocolo de rutina fue el siguiente: Se agregaron 100 µL del primer anticuerpo y 50 µL de la hormona trazadora (15000 cpm por tubo) a la curva patrón y a las muestras previamente diluidas 1:10 en *buffer* de RIA (350 µL final); luego de una incubación de 24 horas a TA se agregaron 50 µL del segundo anticuerpo y se incubó 8 hs a 4ºC. Se incubó finalmente con 500 µL del tercer anticuerpo a 4ºC hasta el día siguiente. A continuación, se separó la hormona libre por centrifugación a 2000 rpm durante 30 minutos y a 4ºC, y se aspiró el sobrenadante mediante vacío. Se registró la radiactividad asociada al precipitado, correspondiente al complejo hormona-anticuerpo, en un contador gamma Packard.

### RIA DE GLUCAGON

Se determinaron los niveles séricos y el contenido pancreático de glucagon en madres preñadas ayunadas. La determinación de glucagon se realizó con un kit comercial de RIA con glucagon marcado con $^{125}$I siguiendo el protocolo del fabricante (Glucagon RIA KIT, Millipore, MA). Se registró la radiactividad asociada al precipitado, correspondiente al complejo hormona-anticuerpo, en un contador gamma.

### RIA DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GNRH)

Se determinó el contenido de GnRH en los HT de madres y crías de ambos sexos de todos los grupos experimentales. También se cuantificaron los niveles del decapéptido luego del ensayo de pulsatilidad del mismo en hipotálamos incubados in vitro, obtenidos de madres y crías hembra.

**Procedimiento de marcación**

El estándar de GnRH (Bachem, CA, EEUU) fue marcado con $^{125}I$ de acuerdo con el método descripto por Yu y colaboradores(Yu et al. 1988). Se agregaron a 10 µg del péptido estándar (disuelto en 10 µl de ácido acético 0,1M), 1 mCi de $Na^{125}I$ en 10 µl de solución fosfosalina 0.5 M, pH 7.5 y 5 µl de cloramina-T en 10 µl de PBS 0.05 M. Esta solución se mantuvo durante 60 segundos bajo agitación suave a temperatura ambiente. Transcurrido dicho período la reacción se detuvo por dilución mediante el agregado de 200 µl de acetato de amonio 2 mM pH 4.5. Para separar el péptido marcado del iodo libre, se emplearon columnas de intercambio iónico de carboximetilcelulosa, preparadas y equilibradas en el laboratorio. El producto de la reacción se sembró inmediatamente en esta columna y se eluyó inicialmente con 15 mL de acetato de amonio 2 mM. Se tomaron cinco fracciones de eluído contenido cada una 3 mL, en las que eluyó el $^{125}I$ libre. Luego se incrementó la fuerza iónica eluyendo con acetato de amonio 100 mM pH 4.5 y recuperando fracciones de 1,5mL. Las fracciones con marca radiactiva que eluyeron luego del pico del $^{125}I$ libre fueron ensayadas para evaluar la unión específica en un RIA.

**Protocolo de RIA**

El ensayo se realizó en 500µl de volumen final, se tomaron 20 µl de muestra por duplicado proveniente de los homogenatos de HT o 220 µl de muestra proveniente de los medios de incubación de explantos de hipotálamos, 100µl de anticuerpo [HU-60 desarrollado contra GnRH, obtenido por una generosa donación del Dr. H. Urbanski (Urbanski et al. 1990), empleado en una dilución inicial de 1:20000] y 100 µl de la hormona marcada (aproximadamente 10.000 cpm), llevando a volumen final con *buffer* fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, azida sódica 15 mM, BSA 0.5 %, pH 7.6. Luego de incubar 24 horas a 4 $^{o}$C se precipitaron las inmunoglobulinas mediante el agregado de 1.5 mL de etanol 100 % helado, se mezcló vigorosamente con agitador mecánico, se incubó durante 30 minutos a 4°C y luego se centrifugó por 30 minutos a 3000 rpm y 4°C, separando de este modo el complejo hormona-anticuerpo (precipitado) de la hormona libre (sobrenadante). El sobrenadante fue descartado y se registró la radiactividad asociada al precipitado, correspondiente al complejo hormona-anticuerpo.

La sensibilidad del ensayo fue 2.5 pg/150 µl de medio, que corresponde a 0.15 pg/mg de hipotálamo (pulsatilidad de GnRH) y de 2.1 pg (contenido de GnRH); los coeficientes de variación intra e inter-ensayos fueron de 4.5% y 5.3% respectivamente. La curva estándar se extendió de 0.977 a 1000 pg por tubo.

## RIA DE HORMONAS ESTEROIDEAS

A partir de sueros de madres y crías de los diferentes tratamientos, se midieron los niveles séricos de hormonas sexuales, según metodologías del laboratorio (Libertun 1980) que se describe a continuación. Los anticuerpos contra hormonas esteroideas fueron cedidos generosamente por el Dr. G. Niswender, Universidad de Colorado (EEUU).

### RIA DE ESTRADIOL ($E_2$)

Se tomaron dos alícuotas de 300 µl de los extractos previamente mencionados.

**Estándares**: se prepararon a partir de una solución madre de estradiol (Sigma) de 7.5 µg/mL en etanol, en un rango de 1.75 a 900 pg por tubo en 300 µl de *buffer* fosfosalino gelatina.

**Antisuero**: a los tubos conteniendo la curva y las muestras, se agregaron 100 µL de anti estradiol (Niswender #244 antiestradiol-6 BSA) disuelto en *buffer* fosfosalino gelatina en una dilución de inicial de 1:12500.

**Hormona radioactiva**: todos los tubos del ensayo recibieron el estradiol tritiado (New England Nuclear, Perkin Elmer), de una actividad específica de aproximadamente 100 Ci/mmol y una pureza radioquímica del 99%, disuelto en *buffer* fosfosalino gelatina (aproximadamente 10.000 cpm/100 µL). Las muestras y la curva, con el trazador y el anticuerpo se incubaron 24 h a 4°C.

**Separación de la hormona libre del complejo hormona-anticuerpo**: la separación se logró por el agregado de una suspensión de Carbón (0.5%)- Dextrano (0.05%) en *buffer* fosfosalino, recientemente preparada. Esta suspensión adsorbe la hormona libre. Se agregaron 200 µL, se agitó con un agitador mecánico y se incubó 10 minutos a

4°C. Luego se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. Finalmente, se tomaron 500 µL del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 1.5 mL de líquido centelleante (Optiphase Hisafe 3, PerkinElmer, Inc.). Se registró la radiactividad de los viales en un contador beta (Beckman, EEUU) y se analizaron los resultados.

En el ensayo de determinacion hormonal sérica, la sensibilidad del mismo fue de 11.3 pg y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 6.8% y 11.7%, respectivamente. En el ensayo de determinacion de contenido ovárico, la sensibilidad del mismo fue de 7.03 pg/ovario y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 6.8% y 11.7%, respectivamente.

## RIA DE PROGESTERONA ($P_4$)

De los extractos mencionados anteriormente se tomaron dos alícuotas de 100 µl y se les agregó 400 µl de PBS-gelatina.

**Estándares**: se prepararon a partir de una solución madre de progesterona 1 µg/mL (Sigma) en etanol, en un rango de 12,5 a 6400 pg por tubo en de *buffer* fosfosalino gelatina.

**Antisuero**: se agregaron 200 µL de antiprogesterona (Niswender #337 antiprogesterona-1 BSA), disuelta en *buffer* fosfosalino gelatina en una dilución de 1:800 a los tubos conteniendo la curva y las muestras.

**Hormona radioactiva**: la progesterona tritiada (New England Nuclear) de una actividad específica de aproximadamente 100 Ci/mmol y una pureza radioquímica del 99%, se agregó disuelta en *buffer* fosfosalino gelatina (aproximadamente 10000 cpm/100 µl), a todos los tubos del ensayo. Las muestras y la curva, con el trazador y el anticuerpo, se incubaron 24 h a 4°C.

**Separación de la hormona libre del complejo hormona-anticuerpo:** la separación se logró por el agregado de una suspensión de Carbón (0.5%) - Dextrano (0.05%) en *buffer* fosfosalino, recientemente preparada, al igual que para estradiol. Se tomaron 700 µL del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 1.5 mL de líquido centelleante (Optiphase Hisafe 3, PerkinElmer, Inc.). Se

registró la radiactividad de los viales en un contador beta (Beckman, EEUU) y se analizaron los resultados.

En el ensayo de determinacion hormonal sérica, la sensibilidad del mismo fue de 500 pg y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7.1% y 12.5%, respectivamente. En el ensayo de determinacion de contenido ovárico, la sensibilidad del mismo fue de 0.4 ng/ovario y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7.1% y 12.5%, respectivamente.

## RIA DE TESTOSTERONA (T)

Se tomaron dos alícuotas de 100 µl de los extractos previamente mencionados y se les agregó 100 µl de PBS-gelatina por tubo.

**Estándares**: se prepararon a partir de una solución madre de testosterona (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) de 1 mg/mL en etanol, en un rango de 3.12 a 800 pg por tubo en 200 µL de *buffer* fosfosalino gelatina.

**Antisuero**: a los tubos conteniendo la curva y las muestras, se agregaron 100 µL de antisuero específico anti testosterona (Niswender #250 antitestosterona11 BSA) disuelto en *buffer* fosfosalino gelatina en una dilución inicial de 1:2000.

**Hormona radioactiva**: todos los tubos del ensayo recibieron la $^{3}$[H]-testosterona (New England Nuclear), de una actividad específica de aproximadamente 100 Ci/mmol y una pureza radioquímica del 99%, disuelto en *buffer* fosfosalino gelatina (aproximadamente 10000 cpm/100 µL). Las muestras y la curva con el trazador y el anticuerpo se incubaron 24 h a 4°C.

**Separación de la hormona libre del complejo hormona-anticuerpo** : la separación se logró de manera similar a lo descripto para $E_2$. Se tomaron 400 µL del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 1 .5 mL de líquido centelleante. Se registró la radiactividad de los viales en un contador beta.

En el ensayo de determinacion hormonal sérica, la sensibilidad del mismo fue de 12.5 pg y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7.8% y 12.3%, respectivamente. En el ensayo de determinacion de contenido ovárico, la sensibilidad

del mismo fue de 0.4 ng/ovario y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7.1% y 12.5%, respectivamente.

## PRUEBA DE GNRH *IN VIVO*

Se estudió la respuesta hipofisaria *in vivo* a GnRH en madres y crías hembra (en estro) y crías macho, tal como fue descripto por Fernández y col(Fernandez et al. 2010). Brevemente, se anestesiaron las ratas a través de una inyección intraperitoneal (i.p) de ketamina/xilacina (60/10 mg/kg de peso corporal), se recolectó una muestra de sangre por la vena yugular (0 min) y luego se les inyectó por la misma vía, GnRH (100ng/ 100µl de solución salina, Laboratorio Península, Belmont, CA, EEUU). Luego, se tomaron muestras a los 15 y 50 minutos post-inyección. En los sueros correspondientes a cada tiempo, se determinaron los niveles de LH y FSH por RIA.

## EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN PULSÁTIL DE GNRH

Los estudios de pulsatilidad se realizaron *in vitro* como se describió previamente.

Brevemente, para los ensayos de pulsatilidad de GnRH, se sacrificaron ratas madres y crías hembras en estro y se recolectó inmediatamente el HT, se pesó e incubó en microtubos de 1.5 mL que contenían 300 µl de *buffer* bicarbonato Krebs-Ringer pH 7.4 (NaCl 115 mM, KCl 4,7 mM, $KH_2PO_4$ 1.2 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, $CaCl_2$ 2.56 mM, $NaHCO_3$ 20mM) con 4,5 mg/mL glucosa y 16 mM HEPES preparado en el momento, a 37ºC. Luego de 30 minutos de preincubación, el medio de cada tubo se recolectó a intervalos de 8.5 minutos durante 6 horas en *buffer* fosfosalino con bacitracina (Sigma) 2.5 mM (para evitar la degradación del GnRH) y se reemplazó por medio fresco. GnRH se midió en el medio mediante RIA en alícuotas de 220 µl.

Finalmente, los pulsos de secreción de GnRH fueron identificados y sus parámetros fueron determinados por el algoritmo Cluster8 desarrollado por Veldhuis and Johnson (1986) (Veldhuis & Johnson 1986). Se utilizó una configuración de cluster 2 x 2 y un estadístico de 2 para los picos ascendentes y descendentes, para mantener la tasa de

error por falsos positivos y falsos negativos por debajo del 10 % como fuera sugerido por Martínez de la Escalera y col.(Martinez de la Escalera et al. 1992).

## DETERMINACIONES METABÓLICAS

### GLUCEMIA

Los niveles de glucosa en sangre de la cola se midieron con el medidor electrónico de glucosa One touch® Ultra™ y las tiras reactivas correspondientes (Lifescan, Scotland Ltd, generosamente donados por Johnson & Johnson, Argentina).

### TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (TTG)

Para el test de tolerancia a la glucosa (TTG), madres y crías de ambos sexos se ayunaron por 15-18hs. Antes de comenzar en ensayo durante la mañana (comenzando 9.00-10.00hs), se pesaron y separaron los animales en jaulas individuales y se los dejó por 2hs aproximadamente para adaptarse al nuevo ambiente, para disminuir los efectos que puede producir el estrés. Luego se les midieron los niveles de glucosa en sangre de la cola (tiempo 0 min). Se inyectó glucosa (2 g/ kg de peso corporal, i.p) a ratas de todos los tratamientos (Bonaventura et al. 2013) y se evaluó la glucemia a distintos tiempos: 30, 60, 90 y 120 min post-inyección de glucosa.

### TEST DE TOLERANCIA A LA INSULINA (TTI)

A madres y crías de ambos sexos con 2-4 hs de ayuno previas se les midieron los niveles de glucosa en sangre de la cola a diferentes tiempos: 0, 20, 40 y 60 min post-inyección intraperitoneal de Insulina porcina humanizada (1U/kg de peso corporal, Laboratorios Beta).

### INDICE HOMA DE RESISTENCIA A INSULINA (HOMA-IR)

El HOMA (del inglés, “Homeostasis model assessement” o evaluación del modelo homeostático) se ha transformado en un método práctico y sencillo para determinar la presencia de insulino resistencia (HOMA-IR), debido a su buena correlación con el clamp euglucémico hiperinsulinémico. El valor del HOMA no mide la cantidad de glucosa metabolizada por unidad de peso, más bien explora las características espontáneas homeostáticas de un sistema metabólico, deduciendo qué grado de sensibilidad a la insulina es compatible con estas características homeostáticas. Este índice se calcula con la glucemia e insulinemia basal medidas luego del ayuno. HOMA-IR: insulina en ayuno (µU/mL) x glucosa en ayuno (mmol/L)/22.5(Matthews et al. 1985). En cada caso, se calculó el HOMA-IR.

## DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN HÍGADO

El día del sacrificio de las ratas (madres y crías hembra y macho), se recolectaron muestras de hígado para la determinación de As total en las mismas. Este análisis lo llevo a cabo el laboratorio “Sistemas Analíticos - Ensayos y análisis químicos” (Buenos Aires), a través de una mineralización vía húmeda y medición por espectrofotometría con dietilditiocarbamato de plata según el método USP 35(United States Pharmacopeia Convention 2012).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados son presentados como media ± error estándar (ES) y se consideraron significativos con p‹ 0.05. Según el caso, se utilizó un Chi- cuadrado o análisis de la varianza (ANOVA) de uno o dos factores, o dos factores con medidas repetidas para analizar el set de datos (Statistica, version 7; Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) con un test a posteriori y transformación de datos cuando la prueba de homogeneidad de varianzas lo requirió.

# CAPÍTULO I – ESTUDIOS EN MADRES

## I.A. INTRODUCCIÓN I

### ENDOCRINOLOGÍA DURANTE LA PREÑEZ

La preñez produce importantes demandas fisiológicas, generando una coordinación entre las necesidades de los fetos en desarrollo y los requisitos de mantener la salud de la madre. Para hacer frente a estas nuevas demandas, las hormonas del embarazo inducen una serie coordinada de adaptaciones fisiológicas en la madre y el feto. Estas adaptaciones incluyen cambios en los sistemas cardiovascular y respiratorio, en la función inmune, cambios de comportamiento, y extensos cambios en los mecanismos neuroendócrinos que rigen los procesos homeostáticos(Russell et al. 2001).

En la **Figura 19** se muestra la variación del ambiente hormonal y la ingesta de alimento durante el ciclo estral, seguido por la preñez y lactancia en roedores.

Brevemente se puede observar que luego del apareamiento, se producen picos de PRL, que proporcionan el soporte luteotrófico para la producción de $P_4$ por el cuerpo lúteo, y permiten que se mantengan niveles altos de esta hormona durante toda la preñez. En la rata, la placenta se forma alrededor de los 7-8 días de preñez y secreta una hormona denominada **lactógeno placentario** o **somatotropina coriónica** en niveles relativamente constantes, lo que resulta en la inhibición de la secreción endógena de PRL a través de una retroalimentación negativa. Los niveles de estradiol aumentan gradualmente, y justo antes del parto, el cambio en la relación entre el aumento de estradiol y la disminución de la progesterona, que además favorece la contractilidad uterina y la acción de la oxitocina, produce un pico en los niveles de PRL, que se mantienen constantemente elevados durante la lactancia debido al estimulo de succión de las crías.

Durante la lactancia, en la rata la ingesta de alimentos es aumentada considerablemente para satisfacer las altas demandas metabólicas del lactante joven.

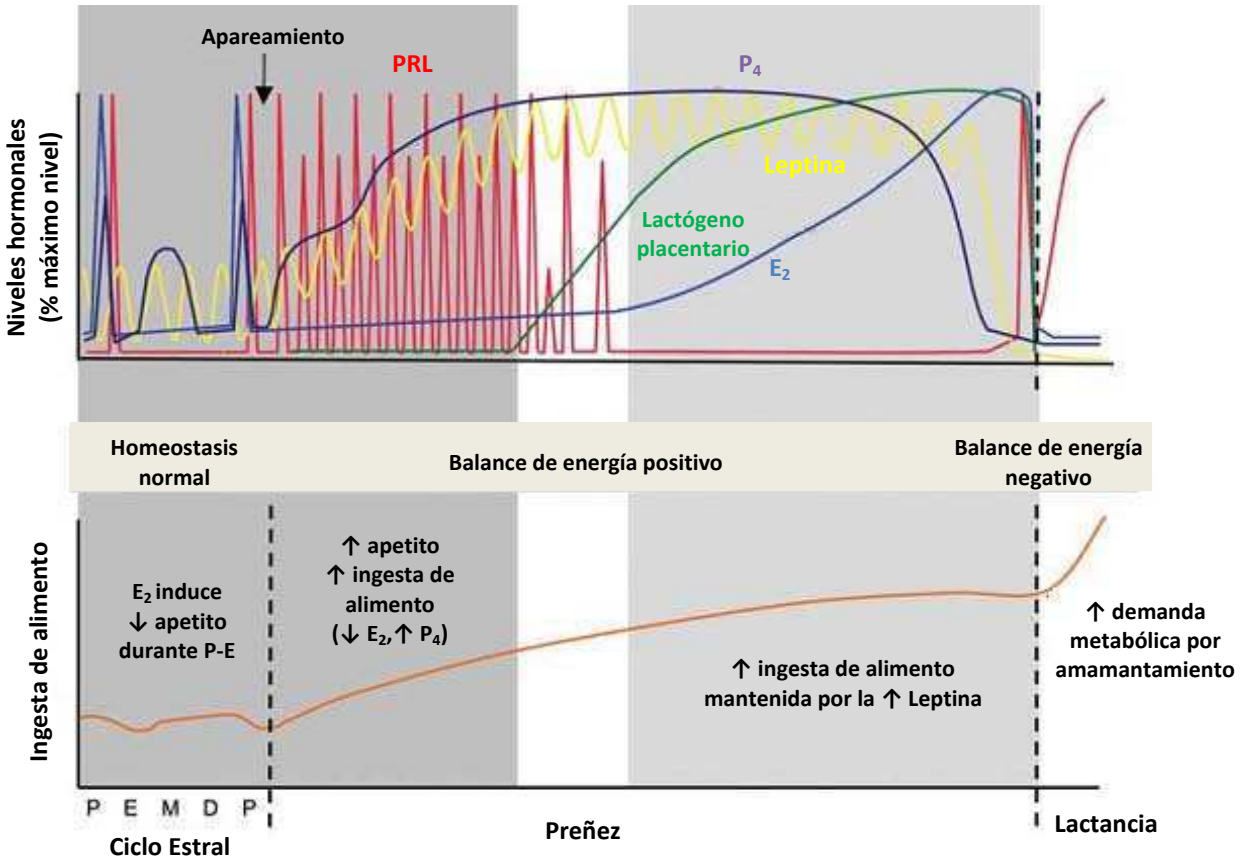



**Figura 19.** Representación esquemática de los cambios hormonales y la ingesta de alimento durante el ciclo estral, la preñez y lactancia en la rata. Los niveles se expresan como un porcentaje de los niveles máximos. Modificado de Augustine (Augustine et al. 2008).

## IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

Conforme el cigoto prosigue en su trayecto a través del oviducto hacia el útero, experimenta numerosas divisiones mitóticas hasta convertirse en blastocito. De esta manera entra en la cavidad uterina. El embrión se implanta o anida cuando adquiere una posición fija y establece contacto físico con el organismo materno(Gartner L P and Hiatt J L 1997). En este proceso, se produce a penetración profunda del blastocito en la pared del endometrio, generando la erosión del mismo y de los vasos sanguíneos maternos.

Con el crecimiento y el desarrollo ulteriores empieza a formarse la **placenta**, con la separación resultante entre la sangre del embrión en desarrollo y la proveniente de la madre. La placenta es un órgano endócrino pluripotente, autónomo y muy complejo,

no sólo por la diversidad de sustancias liberada, sino por la complejidad de sus propios sistemas de regulación. Además este órgano posee la capacidad secretora para suprimir la hegemonía hipofisaria sobre los sistemas endócrinos fundamentales(Cingolani and Houssay 2000).

La implantación es uno de los pasos críticos en el proceso de la preñez: sólo puede iniciarse cuando el embrión y el endometrio han alcanzado un estado preciso de sincronización; se habla de una ventana temporal de receptividad, fuera de la cual la implantación no puede tener lugar. El período de receptividad uterina para la implantación es breve, solo unos días después de la ovulación en la mujer; la receptividad uterina está determinada por la acción de los esteroides ováricos sobre el endometrio; un período refractario le sigue a la fase de receptividad(Cingolani and Houssay 2000).

## CAMBIOS METABÓLICOS EN LA PREÑEZ

Como hemos mencionado, durante el embarazo se generan muchos cambios en el metabolismo de la madre. El aumento de la resistencia a la insulina es uno de ellos. La placenta le suministra al feto en crecimiento los nutrientes y produce una variedad de hormonas para mantener el embarazo. Algunas de estas hormonas, como lactógeno placentario humano (HPL) o somatomamotropina coriónica humana, bloquean el efecto de la insulina a partir de la semana 20 y 24 de embarazo. Esto conduce a niveles más altos de glucosa en la sangre de la madre después de una comida, lo que permite el crecimiento fetal.

Normalmente, las células β de la madre pueden producir la insulina adicional necesaria para superar la insulino-resistencia del embarazo. A medida que la placenta crece, se producen más hormonas y la insulino-resistencia aumenta. Cuando la producción de la insulina materna no es suficiente para superar el efecto de las hormonas placentarias, se produce como resultado la diabetes mellitus gestacional (DMG).

Como mencionamos anteriormente, la DMG se define como la intolerancia a los carbohidratos (con diferentes grados de severidad) siendo su aparición o primer

reconocimiento durante embarazo (Metzger and Coustan 1998). La DMG puede diagnosticarse utilizando una prueba de tolerancia a la glucosa, utilizando una carga de glucosa oral de 100 o 75 g. Si al utilizar 75 g cualquiera de las mediciones de glucemia en ayuno son: basal ≥ 5.1 mmol/L (91.88 mg/dL), post administración de glucosa ≥ 10 mmol/L (≥ 180.16 mg/dL a la hora) o ≥ 8.5 mmol/L (≥ 153.14mg/dL a las dos horas), sería un diagnóstico positivo para DMG (Cheung K.W. and Wong S.F. 2012). Es decir que dos veces más de las concentraciones de glucosa en plasma venoso deben ser alcanzados o superados para obtener un diagnóstico positivo.

Las principales complicaciones de la DMG es el aumento del tamaño del feto, lo que puede complicar el parto, y la hipoglucemia en el bebé inmediatamente después del parto. Las mujeres con DMG tienen generalmente niveles normales de glucemia durante el primer trimestre de embarazo. A diferencia de los pacientes con diabetes de tipo I, esto resulta una ventaja ya que la hiperglucemia en este período puede causar defectos congénitos al nacimiento (Dean L and McEntyre J 2004).

## ARSÉNICO Y PREÑEZ

Estudios epidemiológicos y datos experimentales indican que el As ejercería un rol diabetogénico, pero la patogénesis de la diabetes inducida por este metaloide se desconoce, así como también el mecanismo biológico por el cual se asocia la exposición crónica a As y el incremento en el riesgo de contraer diabetes(Paul et al. 2007b). Varios autores sugieren que el As podría incrementar el riesgo de la diabetes tipo II a través de múltiples mecanismos, afectando varios eventos regulatorios, que en su conjunto dispararían la enfermedad (Diaz-Villasenor et al. 2007). Por otra parte la diabetes gestacional es similar a la diabetes tipo II en relación a su patogénesis y los síntomas clínicos, pero ocurre en mujeres durante la preñez y normalmente mejora o desaparece luego del parto.

Los efectos tóxicos del As en el sistema reproductivo de hembras no han sido bien caracterizados, particularmente en áreas donde la contaminación con As en el agua de bebida excede el limite admisible (0.01 ppm). Hasta la fecha, existe muy poca información sobre el mecanismo de acción del As en el eje reproductivo, aunque se ha

sugerido que los efectos deletéreos en el eje reproductivo se deban a una disrupción de la vía de señalización en las hormonas esteroideas (Chatterjee and Chatterji 2010). Como el As podría actuar como un estrógeno ambiental, la disrupción de la señalización del receptor de estrógenos (RE) puede ser la responsable de los efectos reproductivos observados en mujeres expuestas a As. Dado que el As interactúa con hormonas esteroideas, particularmente con $E_2$, parecería que la exposición a este metaloide podría tener efectos en la salud materna así como también en la salud general de la mujer (Vahter 2009).

## I.B. OBJETIVO CAPÍTULO I

El objetivo de este capítulo es dilucidar los efectos deletéreos de la exposición al As en agua de bebida, en el eje reproductivo y metabólico en ratas durante la preñez y el postparto.

# I.C. MATERIALES Y MÉTODOS I

## MODELO EXPERIMENTAL

En la **Figura 20** se ilustra un resumen del diseño experimental utilizado para las madres. Todas fueron pesadas a lo largo de la preñez, el día del parto y al mes y dos meses postparto.

Se evaluaron los efectos de la exposición a As en el agua de bebida desde el DG 1, en las distintas etapas asignadas como preñez (DG 1 al DG 23) y postparto (día postparto 60 (DPP60) en adelante). Para ello se utilizaron dos grupos de animales:

**PREÑEZ**: Un grupo de madres de cada tratamiento, fueron pesadas y sacrificadas al DG 18 por decapitación, recolectando la sangre troncal, los ovarios y el páncreas para la evaluación de niveles hormonales. Se evaluarán diferentes parámetros que detallaremos a continuación sobre la performance reproductiva y el estado metabólico de las mismas.

**POSTPARTO**: al otro grupo de madres se les permitió que continúen el curso de la preñez. Durante el mismo se pesaron las ratas una vez por semana y se realizó un TTG. El día del parto se tomó registro del peso de las madres, la duración de la gestación y se determinó la cantidad de crías vivas/muertas y el sexo de las mismas.

El día en que se destetaron sus crías (DPP21), las madres se dividieron por jaulas según su tratamiento. Aproximadamente al mes, se evaluó el ciclo estral y fueron sometidas a una prueba de GnRH *in vivo* y a estudios metabólicos. Este grupo de animales fueron pesados y sacrificados por decapitación en la mañana del estro, a partir de los 2 meses postparto. Se recolectó la sangre troncal para la evaluación de niveles hormonales y se tomaron muestras de hígado para la determinación de contenido de As total y para evaluar el nivel de estrés oxidativo. Los hipotálamos (HT) fueron pesados y utilizados para la evaluación de la liberación pulsátil de GnRH o congelados para medir el

contenido GnRH por RIA. Los ovarios fueron pesados y congelados para evaluar el grado de estrés oxidativo, y los niveles de hormonas esteroideas.

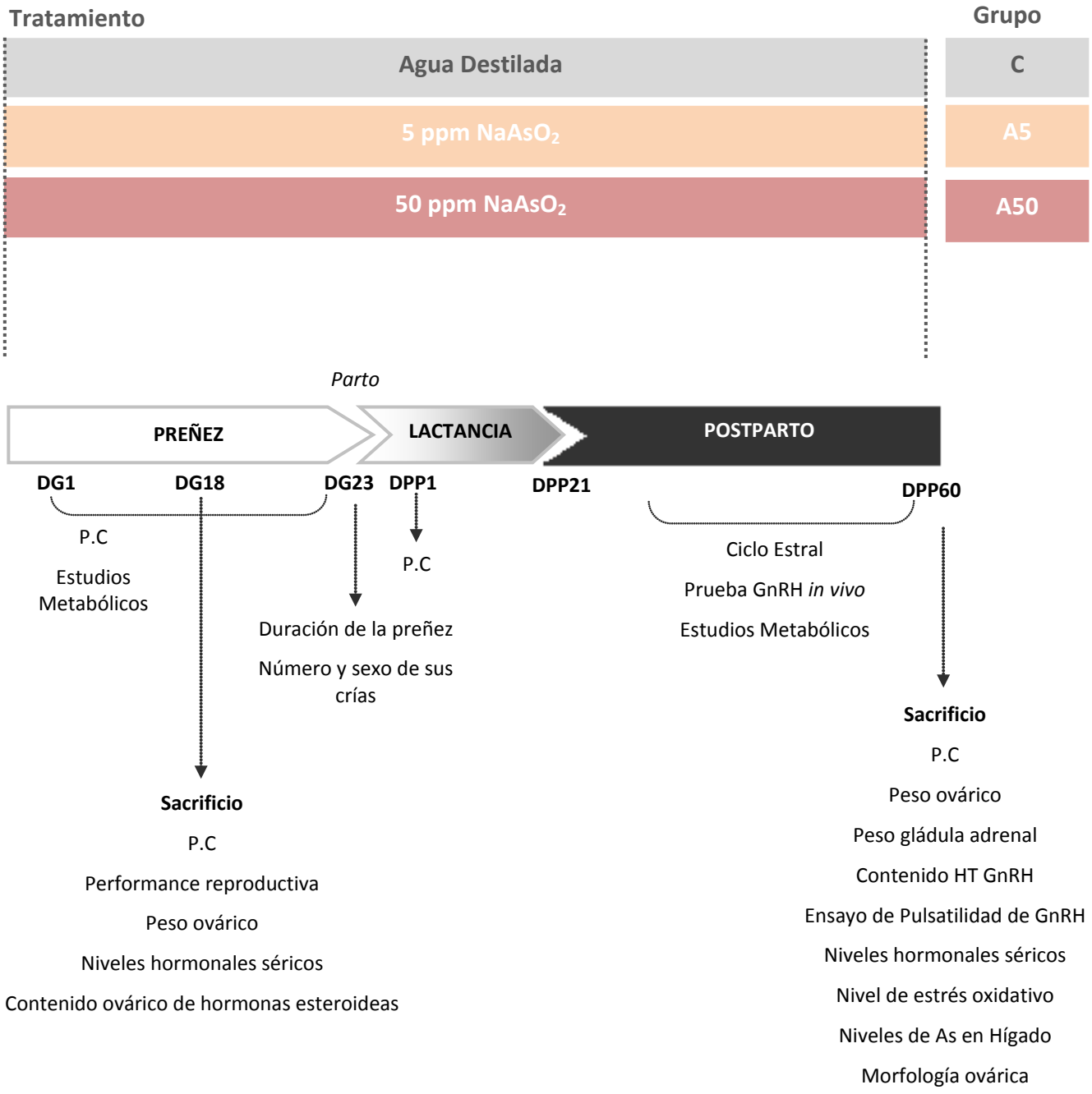



**FIGURA 20.** Ilustración del modelo experimental utilizado para madres.

## ESTUDIOS REPRODUCTIVOS

### PERFORMANCE REPRODUCTIVA

Al DG 18, se sacrificaron las madres preñadas de los distintos tratamientos. Los ovarios fueron disecados, pesados y se cuantificó el número de cuerpos lúteos (CLs) por visualización directa. Luego estos órganos fueron congelados (-70°) para la determinación del contenido de esteroides sexuales. También se disecaron y pesaron las glándulas adrenales.

Por otra parte, se removieron los dos cuernos uterinos y se visualizaron los sitios reabsorbidos y los sitios de implantación. Los sitios reabsorbidos se definen como el sitio endometrial con una masa amorfa sin feto. El número de sitios de implantación se define como el resultado del número total de placentas con fetos + el número total de sitios reabsorbidos (Varayoud et al. 2011).

Luego separamos los fetos de las placentas. Ambos fueron pesados individualmente y las placentas fueron medidas con un calibre en su diámetro mayor.

### NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDEAS

Al día de sacrificio (DG 18 y 2 meses postparto), se determinaron los niveles séricos basales de $E_2$, $P_4$ y T en por RIA, luego de una extracción con éter etílico tal como se describió previamente. También se evaluó el contenido ovárico de los esteroides sexuales en la etapa de preñez.

### NIVELES DE HORMONAS PROTEICAS

En madres al DG 18 y a los dos meses postparto se determinaron los niveles séricos de LH, FSH, PRL por RIA. Los detalles del procesamiento de las muestras y del ensayo fueron descriptos anteriormente. Los resultados se muestran como los niveles hormonales promedio para cada grupo experimental.

## CICLO ESTRAL

A partir de aproximadamente un mes postdestete, se evalúo el estadío del ciclo estral en las madres de todos los tratamientos todos los días durante un mes, examinando el frotis vaginal bajo un microscopio óptico. Luego se determinó el porcentaje de días en ciclos normales y en anestro. Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de días ciclando o en anestro, por tratamiento.

## CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE GNRH

Se midió el contenido hipotalámico de GnRH en madres sacrificadas a los dos meses postparto por RIA, tal como se describió en materiales y métodos generales. Los resultados se expresan como los niveles promedio de GnRH/ HT.

## ESTUDIO DE LIBERACIÓN PULSÁTIL DE GNRH

A los dos meses postparto se evaluó la liberación pulsátil de GnRH hipotálamico, tal como fue descripto en la sección de materiales y métodos generales. Se analizó la frecuencia de la pulsatilidad de GnRH secretado (pulsos de GnRH/hora), la masa de GnRH secretada/ pulso, el intervalo inter-pulso, la duración y la amplitud del pico de GnRH para cada tratamiento.

## RESPUESTA HIPOFISARIA A GNRH *IN VIVO*

Se determinó la respuesta hipofisaria *in vivo* a GnRH en madres un mes postparto según se describió en materiales y métodos generales. Los resultados se expresan como los niveles de LH y FSH promedio a lo largo del tiempo para cada tratamiento.

## MORFOLOGÍA E HISTOLOGÍA OVÁRICA

Ovarios de madres al momento del sacrificio (dos meses postparto), controles y tratadas, fueron fijados en paraformaldehído 4% e incluidos en parafina. Luego se enviaron a realizar los cortes al servicio de microscopía del IBYME. Para prevenir contar dos veces la misma estructura, cortes de 5 µm de espesor fueron colocados con intervalos de 50 µm entre ellos sobre portaobjetos cargados positivamente, de

acuerdo al método descripto por Woodruff y col. (Woodruff et al. 1987)y se secaron en una placa térmica a 30 ºC para luego guardarlos a temperatura ambiente. A partir de los mismos se realizó una coloración topográfica de hematoxilina-eosina para analizar la histología ovárica.

Los folículos fueron clasificados como folículos primarios (FP), folículos preantrales (FPA) o folículos antrales (FA) de acuerdo a la presencia o ausencia de antro, o folículos preovulatorios (FPO). Los folículos atrésicos (FAt) fueron definidos como aquellos en los cuales se observó la presencia de más de 10 núcleos picnóticos por folículo y en los más pequeños, el criterio de atresia fue la presencia de ovocitos degenerado, formación de antro precoz, o ambos criterios (Sadrkhanloo et al. 1987; Andreu et al. 1998). El número de cuerpos lúteos (CL), cuerpos lúteos en regresón (CLreg), FP, FPA, FA, FPO y FAt fue determinado en 3 secciones de ovario por cada ovario, 5-6 ovarios por cada tratamiento.

## ESTUDIOS METABÓLICOS

### TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (TTG)

Al DG 16-17 y un mes postparto se sometió a las madres a un TTG como se describió en materiales y métodos generales. Los resultados se expresan como glucemia a lo largo del tiempo.

### TEST DE TOLERANCIA A LA INSULINA (TTI)

Se realizó un TTI a las madres de todos los tratamientos, al mes postparto. Brevemente, en ayuno se midieron los niveles de glucemia a distintos tiempos: 0, 30, 60, 90 y 120 min post-inyección de insulina (1U/kg de peso corporal, Laboratorios Beta). Los resultados se expresan como glucemia a lo largo del tiempo.

### NIVELES DE HORMONAS PROTEICAS

También se evaluaron al DG 18 los niveles séricos de Insulina y Glucagon así como también el contenido pancreático de estas hormonas por RIA. Los detalles del

procesamiento de las muestras y del ensayo fueron descriptos anteriormente. Los resultados se muestran como los niveles hormonales promedio para cada grupo experimental.

### INDICE HOMA DE RESISTENCIA A INSULINA (HOMA-IR)

Calculamos el índice HOMA de resistencia a Insulina (HOMA-IR) en madres ayunadas al DG 16-17.

## ESTRÉS OXIDATIVO

Se evaluó el grado de estrés oxidativo presente en muestras de hígado y ovarios de madres controles y expuestas a arsenito de sodio en el momento del postparto.

Para ello se evaluó el grado de peroxidación lipídica, mediante el ensayo de sustancias reaccionantes ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS). También la se determinó la actividad de la enzima catalasa y los niveles de glutatión (GSH), como vías antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, respectivamente (Ventura et al. 2014).

**Preparación de las muestras:** los ovarios fueron cortados por la mitad y pesados. Se tomaron dos muestras de hígado y también se pesaron. Una de las mitades del ovario y una porción de hígado fueron procesados para la medición de la actividad de la catalasa y el ensayo de TBARS: se homogenizaron en 1 mL de *buffer* fosfato ($KH_2PO_4/K_2HPO_4$ 50 mM pH 7.4). Las porciones restantes de estos órganos se destinaron a la medición de grupos tioles totales. Para ello fueron homogenizadas en 1 mL $HClO_4$ 0.5 N.

### PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los lípidos son una de las moléculas más susceptibles a la modificación por oxidación. Una de las formas más comunes de medir peroxidación lipídica es detectando la cantidad de subproductos generados a partir de la degradación, como se analiza mediante el ensayo de TBARS (Sustancias Reactivas al Ácido tiobarbitúrico). Para ello, se tomaron 0.3 mL de cada muestra y se mezclaron con *buffer* de reacción [15% (volumen/volumen) de ácido tricloroacético, ácido clorhídrico 0.25 N y 0.375%

(peso/volumen) de ácido 2-tiobarbitúrico]. Se calentó durante 15 min a 90 °C. El complejo formado con el ácido 2-tiobarbitúrico se extrajo con 3 mL de butanol y se cuantificó fluorimétricamente (λex = 515 nm; λem = 555 nm). Los resultados se expresan mol de TBARS por gramo de tejido. Estándar MDA se preparó a partir de propano 16.4 M 1,1,3,3-tetraetoxi.

## ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA

La actividad de la enzima catalasa (CAT) se midió espectrofotométricamente por el seguimiento de la desaparición de $H_2O_2$ a 240 nm. Para ello, una parte de los homogenatos obtenidos fueron centrifugados a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue utilizado para la determinación de la actividad de CAT. La mezcla de la reacción para el ensayo contenía 50 mM de *buffer* fosfato (pH 7.8), 25 mM de $H_2O_2$ (MERK, Darmstadt, Alemania) y 50 µl de la muestras, en un volumen final de 1 mL. Una unidad de CAT se definió como la desaparición de 1 mol de $H_2O_2$/min (ε=43,6 $M^{-1}$ $cm^{-1}$). Los resultados se expresan como unidades internacionales de CAT por g de tejido.

## CONTENIDO DE GSH

Para ello, una parte de los homogenatos obtenidos fueron centrifugados a 600 g durante 10 minutos a 4°C luego, se neutralizaron con $Na_3PO_4$ 0.44 M hasta pH=7. Se tomaron 20 µl de muestra y se mezclaron con 0,8 mL de *buffer* de reacción (*buffer* Fosfato 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4). Se midió la absorbancia a 412 nm ($Abs_1$). Luego se agregaron 100 µl de Solución de DTNB [6 mM DTNB (Sigma Chemical Co., MO, EE.UU.) en bicarbonato de sodio al 0,5% peso/volumen]. Las muestras se incubaron durante 1 minuto y se midió nuevamente la absorbancia a 412 nm ($Abs_2$). El contenido de GSH se calculó como: GSH = ($Abs_2$ - $Abs_1$) / ε x Vs x Cp. Siendo ε = 13.6 $mM^{-1}cm^{-1}$; Vs: volumen de muestra; Cp: concentración de proteínas. Los resultados se expresan como µmol de grupos -SH por g de tejido.

## DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN HÍGADO

Muestras de hígados de madres en la etapa del postparto (2 meses postparto) fueron recolectados para la determinación del contenido de As total en este órgano. Este análisis lo llevo a cabo el laboratorio “Sistemas Analíticos - Ensayos y análisis químicos” (Buenos Aires), bajo la técnica mencionada previamente en materiales y métodos generales. Los resultados son expresados como el promedio de niveles de As total por kg de tejido.

## I.D. RESULTADOS - DURANTE LA PREÑEZ

### PESO CORPORAL

Dado que la exposición crónica a $As_i$ ha sido asociada a la pérdida del peso corporal, evaluamos si la exposición a este metaloide produce estas alteraciones en nuestro modelo experimental. Para ello el peso corporal (PC) fue monitoreado en las hembras preñadas desde el DG 1 hasta el día del parto (DG 23). En la **Figura 21** podemos observar los resultados encontrados. Las madres A50 no ganaron tanto peso durante la preñez en comparación con las hembras C o A5, mostrando al DG 21 significativamente menor peso que los otros grupos experimentales. El tratamiento con A5 no modificó en peso corporal de las hembras preñadas.

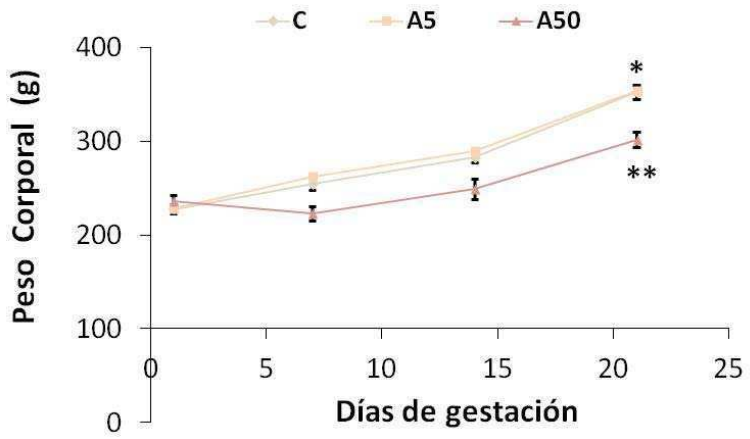



**Figura 21.** Efectos de la exposición a As en el peso corporal durante la preñez. Los resultados se expresan como la media del PC (g) ± ES en función del tiempo (días). ANOVA de dos factores con medidas repetidas. Interacción: $p<0.00005$; efecto principal tiempo $p<0.00005$; efecto principal tratamiento $p<0.05$. *día 1 *versus* (vs.) día 21 para todos los tratamientos, $p<0.0005$. **A50 vs. C y A5 al día 21, $p<0.005$. n=11-14.

El grupo de animales A50 sacrificado al DG 18 también mostró menor peso en este día respecto a sus pares control: **C**= 344.15 ± 5.98; **A5**: 332.58 ± 12.53; **A50**: 318.59 ±16.41* (ANOVA de un factor. * A50 vs. C y A5, $p<0.05$. n=13-14).

## ESTUDIOS REPRODUCTIVOS

### PERFORMANCE REPRODUCTIVA

Algunos estudios sugieren que el As a bajos niveles de exposición podría resultar en efectos adversos durante la preñez. Por este motivo evaluamos si la exposición a As en el agua de bebida durante la gestación puede alterar la performance reproductiva de nuestras ratas. Para ello, en madres sacrificadas al DG 18 cuantificamos la cantidad de sitios de implantación y sitios reabsorbidos en el útero, número de cuerpos lúteos (CLs) en el ovario, cantidad de fetos vivos y sus pesos.

En la **Figura 22** se puede observar una imagen representativa de los úteros de cada grupo experimental recolectados al DG 18. En ella se visualizan los sitios reabsorbidos y los sitios de implantación.

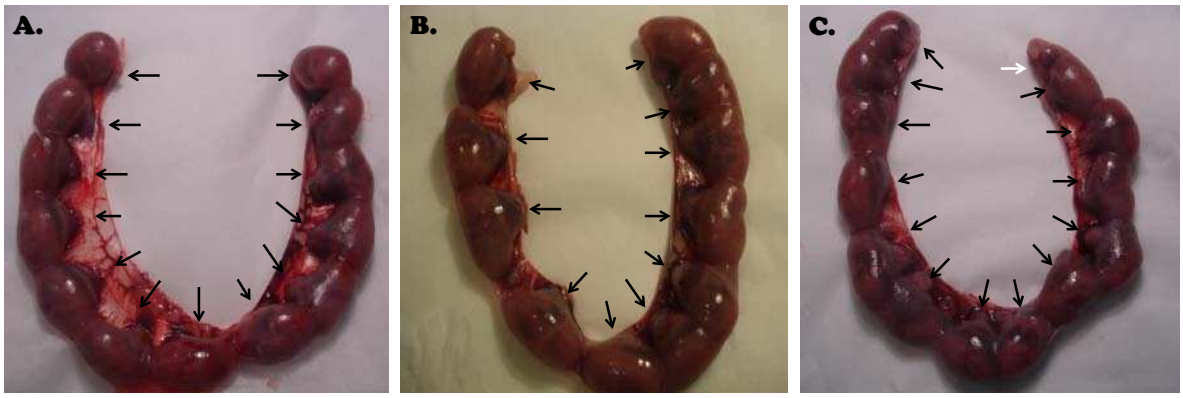



**Figura 22.** Efectos de la exposición a As en la performance reproductiva al DG 18. Imágenes representativas de los úteros de madres C (**A.**), A5 (**B.**) y A50 (**C.**). Cada flecha negra indica un sitio de implantación y cada flecha blanca un sitio reabsorbido.

El tratamiento con arsenito de sodio desde el primer día de gestación no afectó la implantación de los embriones, ya que no se encontraron diferencias en la cantidad de sitios de implantación ni en la cantidad de cuerpos lúteos presentes en el ovario (**Figura 23 A y C**). Tampoco se encontraron diferencias en el número de sitios reabsorbidos ni en el número de fetos vivos (**Figura 23 B y D**), por lo que la exposición As en este modelo no afecto la sobrevida de los fetos. El peso corporal de los fetos a

esta edad gestacional fue similar entre grupos experimentales: **C**: 1.13 ± 0.09; **A5**: 1.17 ± 0.11; **A50:** 1.20 ± 0.09 (ANOVA de un factor, NS. n=8-10).

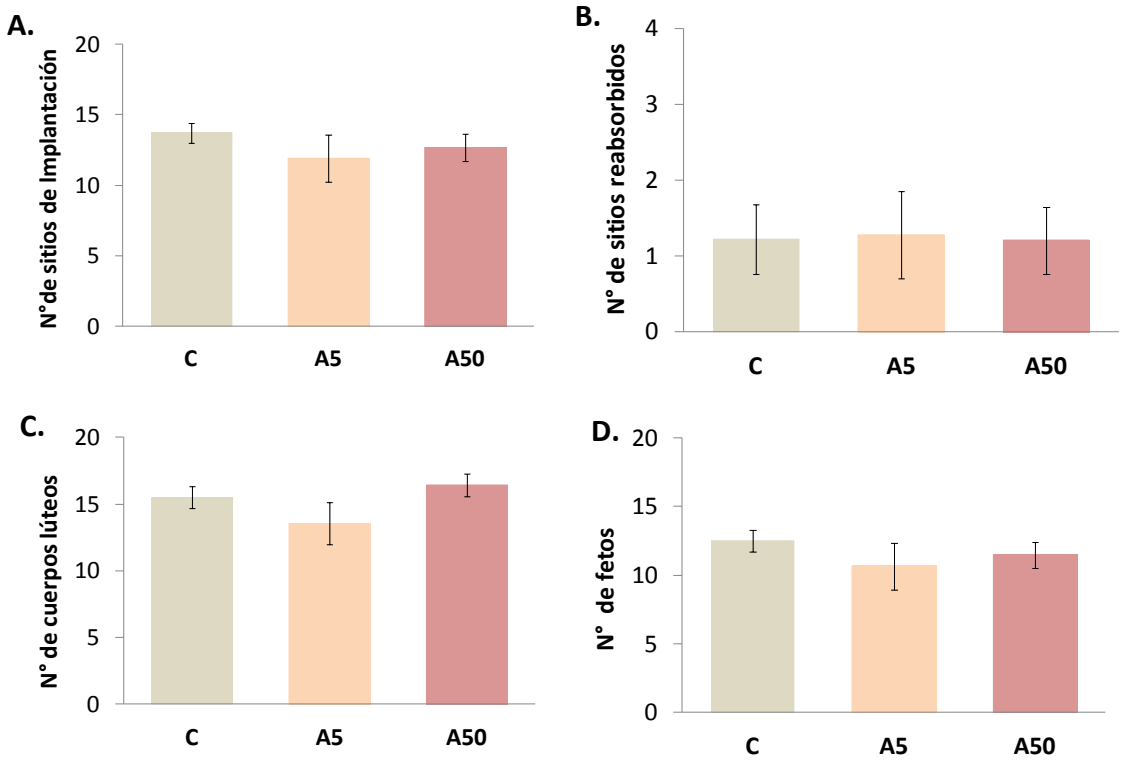



**Figura 23.** Efectos de la exposición a As en el número de sitios de implantación (**A.**), de sitios reabsorbidos (**B.**), número de CLs (**C.**) y cantidad de fetos vivos (**D.**) al DG 18. Los resultados se expresan como la media ± ES para cada tratamiento. n=11-15. **A, B, C y D:** ANOVA de un factor. NS.

## NIVELES SÉRICOS DE HORMONAS ESTEROIDEAS

La $P_4$ y los estrógenos son esenciales para establecer y mantener la preñez y el desarrollo embrionario en mamíferos. En los roedores, la esteroidogénesis ovárica es necesaria a lo largo de la preñez, ya que la placenta madura del roedor solo puede producir $P_4$ y convertirla en andrógenos por la expresión de la enzima P450c17 (Ben Zimra et al. 2002). Por ello nos propusimos determinar los niveles basales séricos de las hormonas sexuales a partir de los sueros de sangre troncal obtenidos al DG 18. Las madres A50 presentaron aumentados tanto los niveles de $E_2$ como los de T (**Figura 24 A y C**) respecto a sus pares C, mientras que las madres A5 no diferían de éstos. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de $P_4$ (**Figura 24 B**) entre los distintos grupos experimentales.

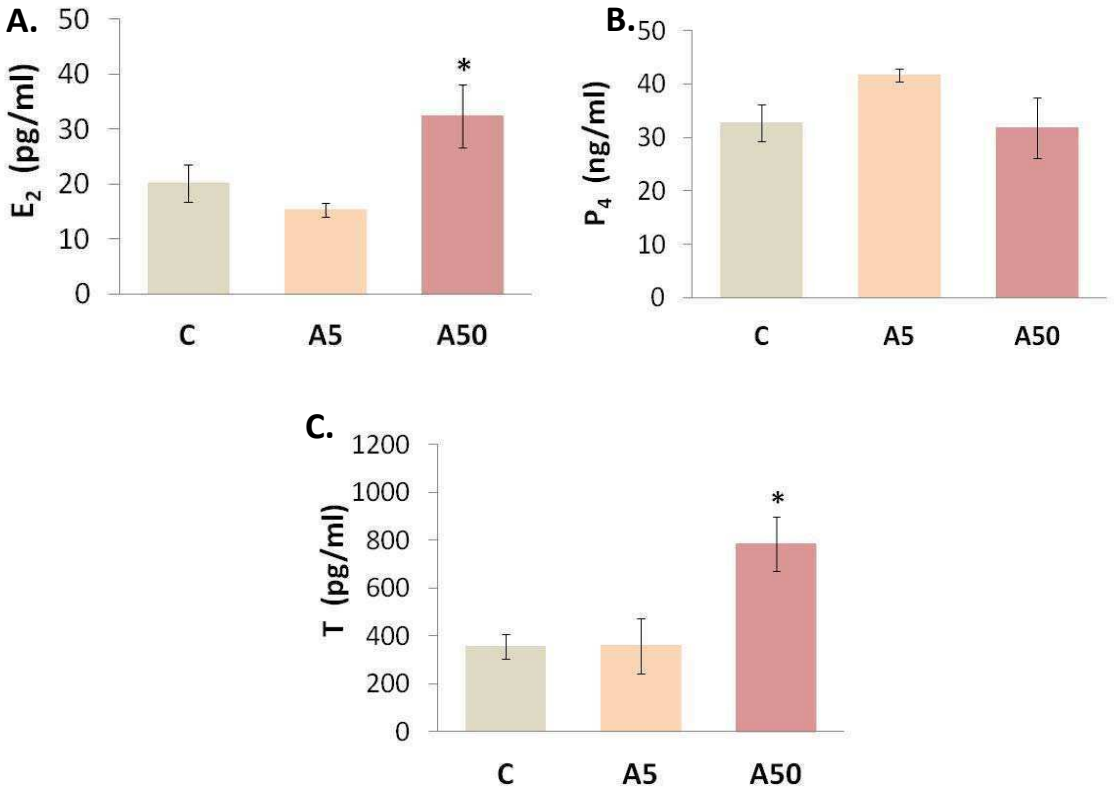



**Figura 24.** Efectos de la exposición a As en los niveles basales séricos de: $E_2$ (**A.**), $P_4$ (**B.**) y T (**C.**) al DG 18. Los resultados se expresan como el nivel medio de cada hormona esteroidea (pg/mL o ng/mL) ± ES n=8-13. **A.** ANOVA de un factor, *A50 vs. C y A5, p‹ 0.05. **B.** ANOVA de un factor. NS. **C.** ANOVA de un factor, *A50 vs. C y A5, p‹0.05.

## PESO OVÁRICO Y PLACENTARIO

Para descartar que las diferencias mencionadas en los niveles de $E_2$ y T al día del sacrificio (DG 18) fueran debidas al peso de los ovarios, los comparamos entre los grupos. A su vez, como el peso corporal difiere entre animales C y tratados, se relativizaron los pesos ováricos al peso corporal de cada animal. La exposición a la mayor dosis de As aumentó el peso ovárico de las madres A50, siendo entonces una de las posibles causas del aumento del $E_2$ y T séricas (**Figura 25**).

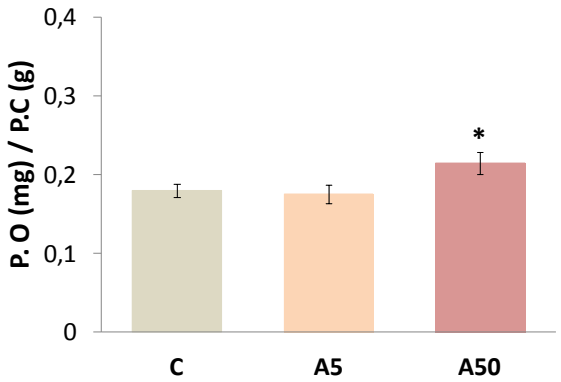



**Figura 25.** Efectos de la exposición a As en el peso ovárico al DG 18. Los resultados se expresan como el peso ovárico (P.O) /P.C medio (g) ± ES en función del tiempo (días). ANOVA de un factor. NS. n=9-14.

Además, se ha descripto que el As se acumula en la placenta. Aunque la forma y las consecuencias de tal acumulación no han sido el foco de mucha investigación, es probable que el As pueda dar lugar a efectos tóxicos en el tejido placentario, por ejemplo, a través de estrés oxidativo (Massrieh et al. 2006), y posiblemente también al deteriorar el transporte de nutrientes al feto. Por ello, las placentas fueron disecadas, pesadas y medidas a lo largo de su eje mayor. Sin embargo, no se hallaron diferencia entre tratamientos (**Figura 26**).

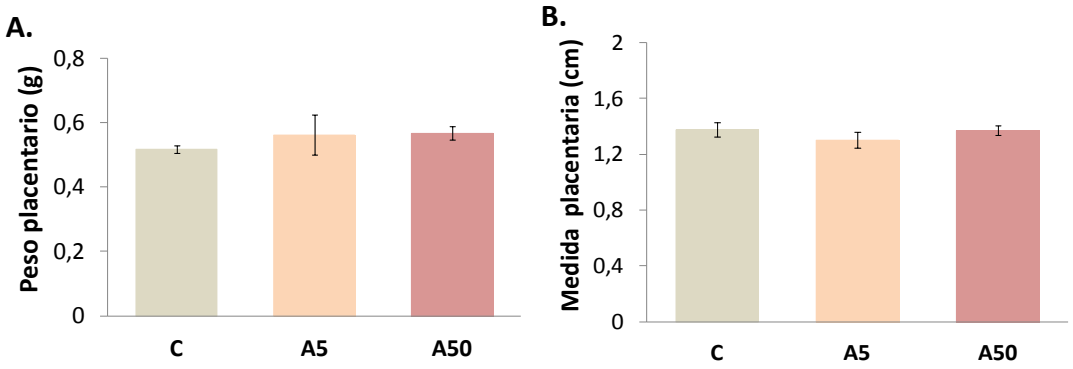



**Figura 26.** Efectos de la exposición a As en el peso (**A.**) y longitud (**B.**) placentaria al DG 18. n=4-5. .**A.** Los resultados se expresan como el peso medio de la placenta (g) ± ES. ANOVA de un factor. NS. **B.** Los resultados se expresan como la medida media de la placenta (cm) ± ES. ANOVA de un factor. NS.

## CONTENIDO OVÁRICO DE HORMONAS SEXUALES

Como hemos encontrado aumentados los niveles séricos de $E_2$ y de T, evaluamos el contenido ovárico de las hormonas esteroideas para determinar el posible origen de las mismas. Las madres A50 presentaron disminuido el contenido ovárico de $E_2$ (**Figura 27 A**), aunque el contenido total por ovario no varió respecto a los controles (resultados no mostrados). No se hallaron diferencias entre tratamientos en el contenido ovárico de $P_4$ y T (**Figura 27 B y C**).

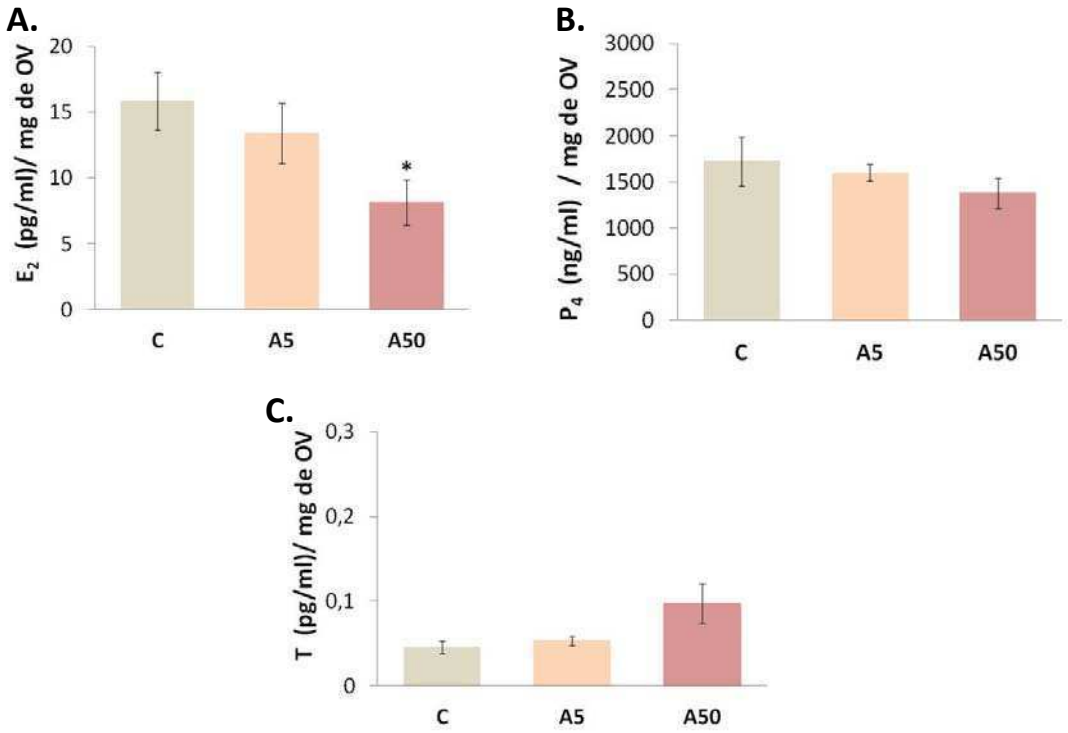



**Figura 27.** Efectos de la exposición a As en el contenido ovárico de: $E_2$ (**A.**), $P_4$ (**B.**) y T (**C.**) al DG 18. Los resultados se expresan como el nivel medio de cada hormona/ mg de ovario (OV) ± ES. n=7-13. **A.** ANOVA de un factor, * A50 vs. C y A5, p‹ 0.05. **B.** ANOVA de un factor. NS. **C.** ANOVA de un factor, NS.

## PESO DE LA GLÁNDULA ADRENAL

Algunos estudios describen alteraciones en la glándula adrenal y sus secreciones producto de la exposición a As (Chattopadhyay et al. 1999; Chattopadhyay and Ghosh 2010b; Goggin et al. 2012). Por este motivo, también fueron disecadas y pesadas las glándulas adrenales de todos los grupos experimentales. Los valores del peso glandular fueron relativizados al peso corporal de cada animal, sin encontrar alteraciones por la exposicion a As (**Figura 28**).

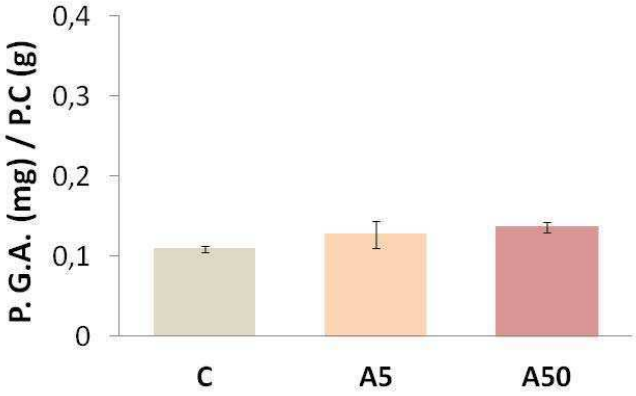



**Figura 28.** Efectos de la exposición a As en el peso de la glándula adrenal al DG 18. Los resultados se expresan como el peso medio de la glándula adrenal (P.G.A, mg) /P.C medio (g) ± ES. ANOVA de un factor. NS. n=4-5.

## NIVELES SÉRICOS DE GONADOTROFINAS Y PROLACTINA

Tanto los estrógenos como la $P_4$ estimulan o inhiben la liberación de gonadotrofinas dependiendo de la concentración y duración de la exposición de la hipófisis a los esteroides, y de las circunstancias fisiológicas o experimentales. Por consiguiente, evaluamos los niveles séricos basales de las gonadotrofinas (LH y FSH), sin encontrar diferencias significativas entre madres C y tratadas con As (**Figura 29**).

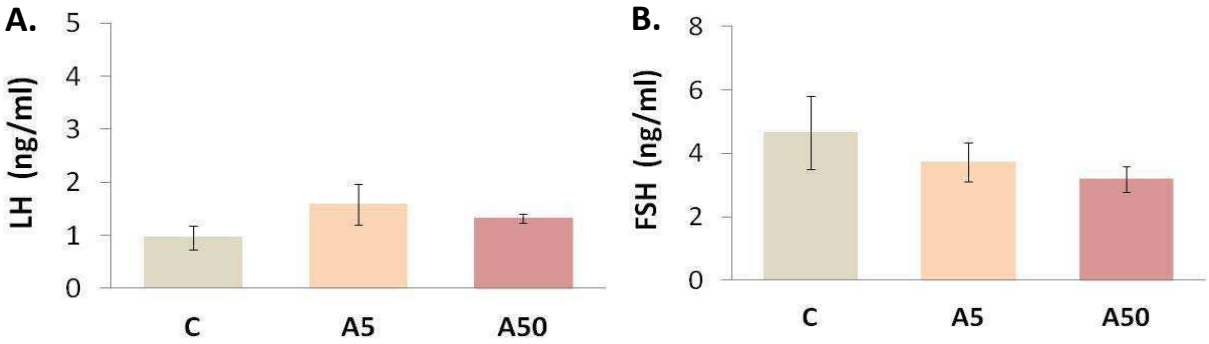



**Figura 29.** Efectos de la exposición a As en los niveles basales séricos de las gonadotrofinas: LH (**A.**) y FSH (**B.**) al DG 18. Los resultados se expresan como el nivel medio de cada gonadotrofina (ng/mL) ± ES. n=5-7. **A y B** ANOVA de un factor. NS.

Los niveles séricos de PRL también fueron evaluados debido a su gran importancia en la funcionalidad del eje gonadotrófico, ya que en la etapa gestacional proporciona el soporte luteotrófico para la producción de $P_4$ por el cuerpo lúteo, y permiten que se mantengan niveles altos de esta hormona durante toda la preñez. Como se observa en la **Figura 30**, no hallamos alteraciones en los niveles hormonales de PRL luego del tratamiento con As.

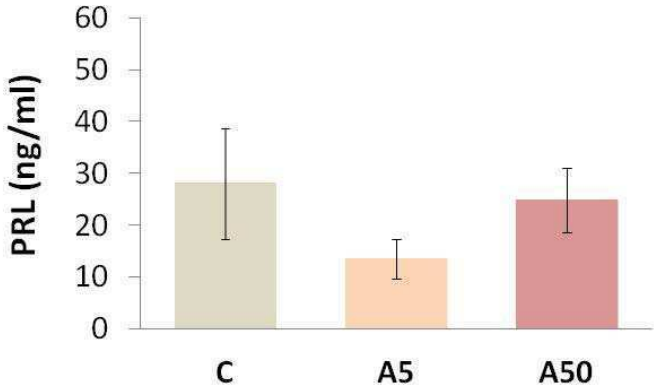



**Figura 30.** Efectos de la exposición a As en los niveles basales séricos de PRL. Los resultados se expresan como el nivel medio de PRL (ng/mL) ± ES. n=5-9. ANOVA de un factor. NS.

## ESTUDIOS METABÓLICOS

### TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (TTG)

Algunos estudios han asociado la exposición a As con desórdenes metabólicos como la diabetes. Por este motivo evaluamos en madres preñadas, diferentes parámetros metabólicos que podrían darnos un indicio de los posibles efectos adversos del As para contribuir al desarrollo de este tipo de afecciones.

En primer lugar, a todas las madres de los diferentes tratamientos les realizamos al DG 16-17 un TTG. Como se muestra en la **Figura 31**, el As indujo intolerancia a la glucosa en ratas preñadas de manera dosis dependiente. La disminución en la depuración de la glucosa fue más pronunciada en las madres A50, alcanzando la diferencia estadística en los tiempos 30 y 60 min, mientras que las madres A5 difieren del grupo C solo a los 30 min.

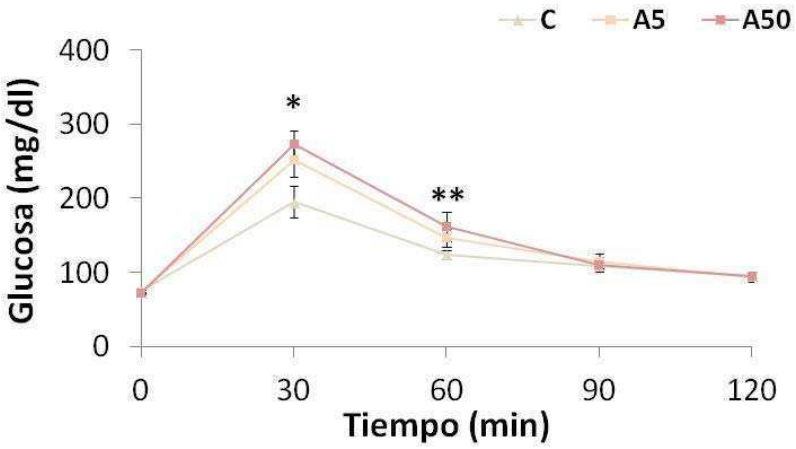



**Figura 31.** Efectos de la exposición a As en el metabolismo de la glucosa al DG 16-17. Los resultados se expresan como el nivel medio de glucemia (mg/dL) ± ES a lo largo del tiempo (min). **A.** ANOVA de dos factores con medidas repetidas. Interacción: $p<0.005$; factor principal tiempo $p<0.00005$; factor principal tratamiento $p<0.05$. * A50 y A5 vs. C a los 30 min, p‹ 0.05. ** A50 vs. C a los 60 min, p‹ 0.05. n=11-12.

## NIVELES DE INSULINEMIA Y GLUCEMIA EN AYUNO

Por otra parte, en los sueros de las ratas ayunadas recolectados al tiempo 0, se determinaron los niveles basales de insulina y glucosa, sin encontrar diferencias significativas entre los grupos (**Figura 32**).

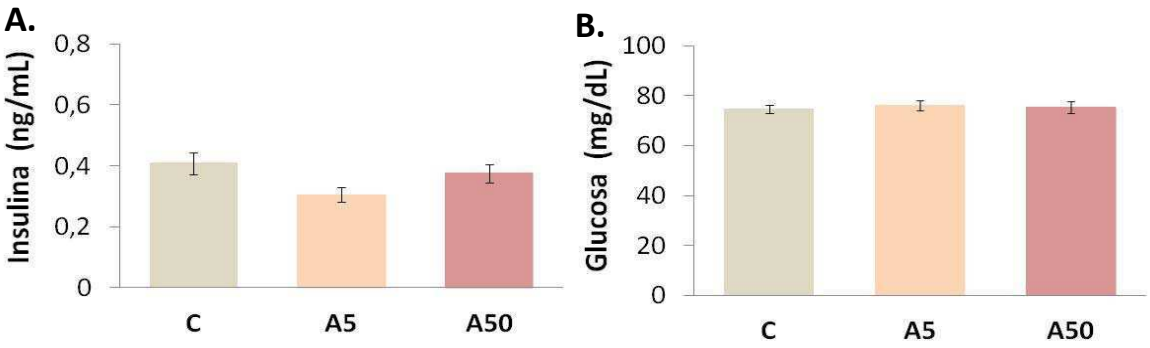



**Figura 32.** Efectos de la exposición a As en los niveles de insulina (**A.**) y glucosa (**B.**) séricas en ayuno, al DG 16-17. ANOVA de un factor. n=17-18. **A.** Los resultados se expresan como el nivel medio de insulina (ng/mL) ± ES. NS. **B.** Los resultados se expresan como la media de glucemia (mg/dL) ± ES. NS.

## HOMA-IR

A partir de los valores de insulina y glucemia en ayunas se calculó el índice HOMA-IR. Este índice es un parámetro que indica insulino resistencia, a mayor valor de este índice, mayor es la resistencia periférica a insulina. La **Figura 33** muestra un menor índice HOMA-IR para las madres A5, lo cual indica un aumento en la sensibilidad a la insulina en este grupo. Las madres A50 no presentaron alteraciones comparándolas con sus pares control.

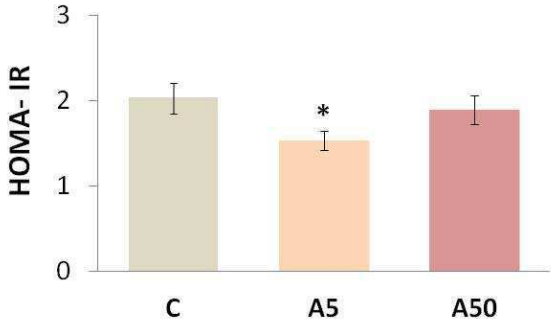



**Figura 33.** Efectos de la exposición a As en el índice HOMA-IR a al DG 16-17. Los resultados se expresan como la media de HOMA-IR ± ES. ANOVA de un factor. *p‹ 0.05 A5 vs. C y A50. n=16-17.

## NIVELES SÉRICOS DE INSULINA Y GLUCAGON

A partir de la sangre troncal recolectada al día del sacrificio (DG 18), en ratas no ayunadas, se midieron los niveles séricos de insulina y glucagon basal, sin encontrar diferencias entre tratamientos (**Figura 34**).

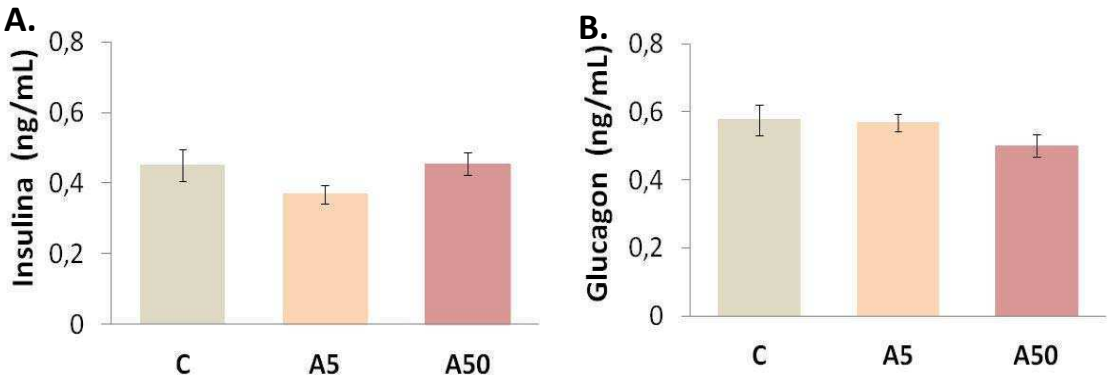



**Figura 34.** Efectos de la exposición a As en los niveles séricos basales de insulina (**A.**) y glucagon (**B.**) al DG 18. Los resultados se expresan como el nivel medio de cada hormona (ng/mL) ± ES. **A.** ANOVA de un factor. NS. n=9-12. **B.** ANOVA de un factor. NS. n=8-9.

## CONTENIDO PANCREÁTICO DE INSULINA Y GLUCAGON

Si bien los niveles séricos de insulina y glucagon no se modificaron con la exposición a As, puede existir una alteración en la producción de las mismas. El día del sacrificio (DG 18) los páncreas de madres preñadas de los diferentes tratamientos fueron recolectados para medir el contenido de insulina y glucagon en este órgano.

En la **Figura 35** se puede observar que el contenido pancreático de insulina se encuentra incrementado en las madres A5 y A50 respecto a las madres C, mientras que el contenido de glucagon no fue alterado con el tratamiento con As.

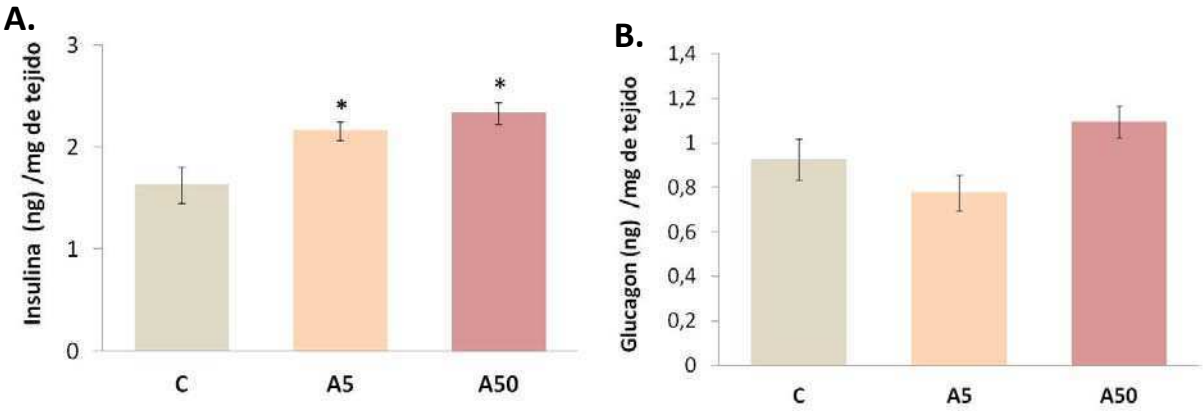



**Figura 35.** Efectos de la exposición a As en el contenido pancreático de insulina (**A.**) y glucagon (**B.**) al DG 18. Los resultados se expresan como el nivel medio de cada hormona (ng) / mg de páncreas ± ES. n=4-5. **A.** ANOVA de un factor. * A5 y A50 vs. C, $p<0.05$. **B.** ANOVA de un factor. NS.

# I.E. RESULTADOS - DURANTE EL POSTPARTO

## PESO CORPORAL

Dado que durante la etapa de gestación se observó un bajo peso corporal en las madres expuestas a As, se hizo un seguimiento durante la etapa de postparto para evaluar si esta alteración se mantenía en el tiempo. Para ello, las madres de los distintos tratamientos fueron pesadas el día posterior al parto y dos meses postparto. Al día de PP1, las madres A50 permanecieron con bajo peso, el cual se normalizó luego de dos meses postparto (**Figura 36**).

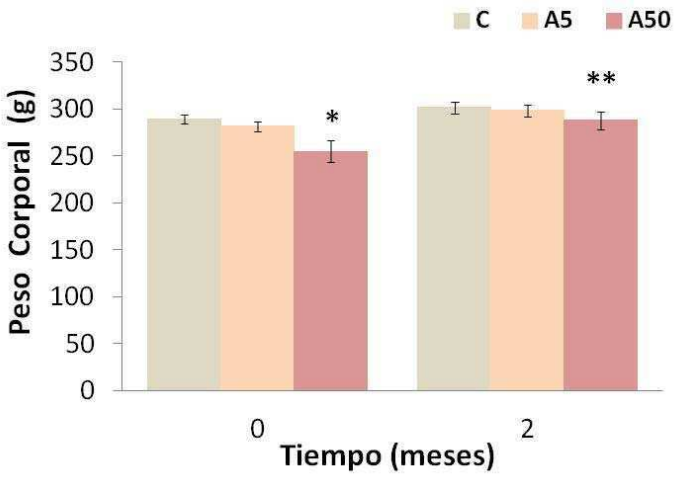



**Figura 36.** Efectos de la exposición a As en el peso corporal en el postparto. Los resultados se expresan como la media del P.C (g) ± ES. ANOVA de dos factores con medidas repetidas. Interacción: $p<0.05$; efecto principal tiempo $p<0.00005$; efecto principal tratamiento $p<0.005$. *$p<0.05$ A50 vs. A5 y C al DPP1 (0 meses). **$p<0.0005$ mes 0 vs. mes 2 para A50. n= 8-12.

## ESTUDIOS REPRODUCTIVOS

### PERFORMANCE REPRODUCTIVA

Por otra parte evaluamos los posibles efectos del As sobre la performance reproductiva al día del parto: la duración de la gestación, el tamaño de la camada, la proporción de crías vivas/muertas o de hembras/machos por camada fueron determinados para cada grupo experimental. La duración de la gestación fue similar entre tratamientos y como era de esperar, tras los resultados obtenidos sobre la

performance reproductiva al DG 18, no se observaron diferencias en la cantidad de crías por madre, ni en la proporción de crías vivas o muertas. La relación de sexos en las crías no difirió entre grupos (**Figura 37**).

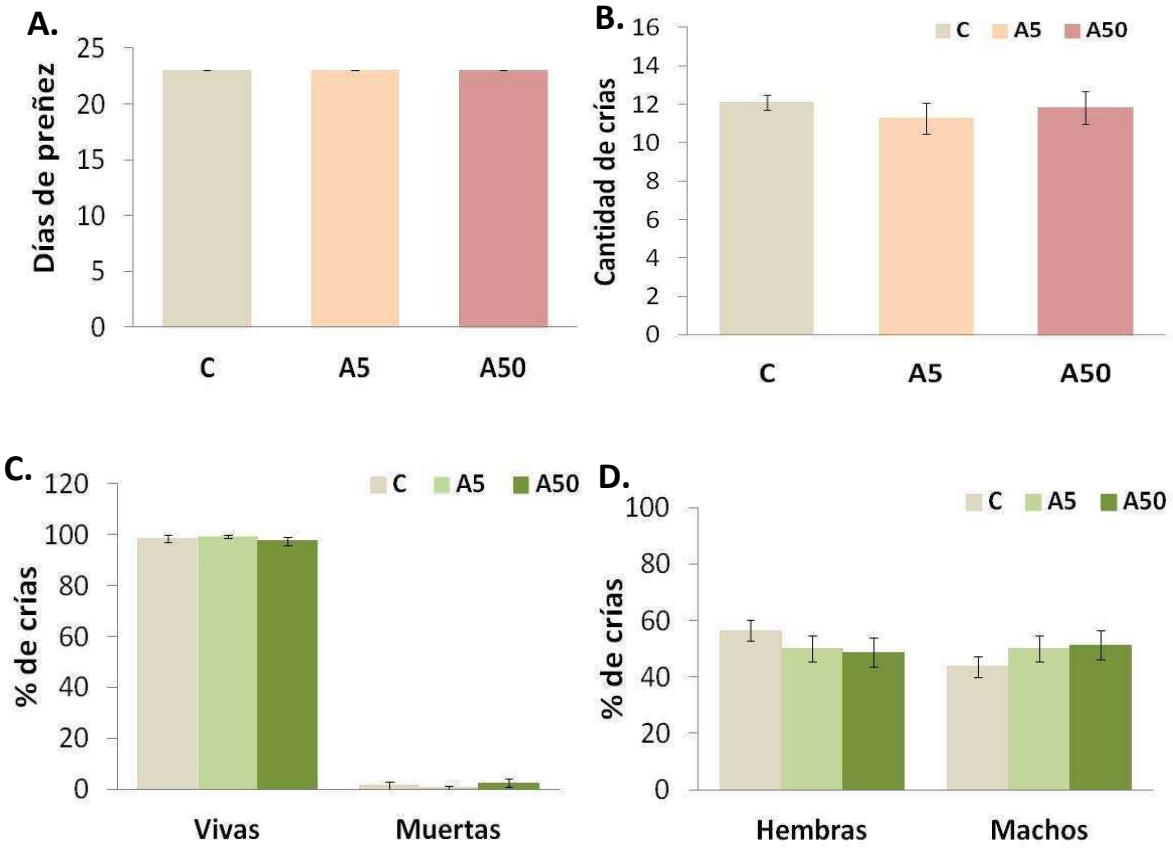



**Figura 37.** Efectos de la exposición a As en la duración de la gestación (**A.**), el tamaño de la camada (**B.**) y la proporción de crías vivas/muertas (**C.**) y hembras/machos (**D.**). Los datos son expresados como la duración (días) media de gestación ± ES. **A.** ANOVA de un factor. NS. n= 9-12.**B.** ANOVA de un factor. NS. n= 9-12. **C.** Chi Cuadrado. NS. n= 9-12. **D.** Chi Cuadrado. NS. n= 9-12.

## CICLO ESTRAL

Al mes del destete de las crías, evaluamos como las madres de los diferentes tratamientos reanudan su ciclicidad. Evaluando el estadío del ciclo, mediante frotis vaginal, durante un mes, se determinó la cantidad de días que las madres presentan ciclos normales o que se encuentran en anestro.

Los animales tratados con As presentaron un incremento en la cantidad de días en anestro, siendo aproximadamente del 4% en ratas C, y del 21% y 12% en ratas A5 y A50 respectivamente (**Figura 38**).

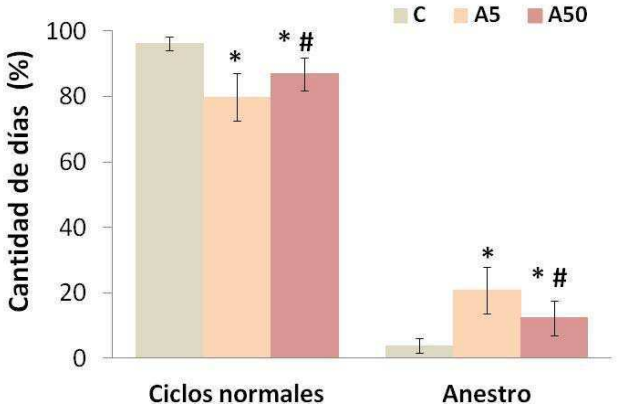



**Figura 38.** Efectos de la exposición a As en el ciclo estral al mes postparto. Los datos son expresados como la media en la cantidad de días (%) ± ES. Chi Cuadrado. *A5 y A50 vs. C, $p< 0.005$; # A50 vs. A5, $p<0.005$. n= 5.

## NIVELES SÉRICOS DE HORMONAS SEXUALES

Durante la preñez, la exposición a la mayor dosis de As elevó los niveles séricos de $E_2$ y T. Nos propusimos entonces, evaluar si estas alteraciones permanecen una vez que se restablecen los ciclos ováricos en las madres, y si son éstas una de las causas por las que no lo hacen correctamente.

Se determinaron los niveles séricos basales de las hormonas esteroideas sexuales en sueros obtenidos tras el sacrificio, a los dos meses postparto. Como se muestra en la **Figura 39 C**, los niveles séricos de T se normalizaron al postparto. Los niveles de $P_4$ se mantuvieron similares a los niveles de las madres C (**Figura 39 B**). Paradójicamente, los niveles de $E_2$ que se encontraban elevados al DG 18 en madres A50, decrecen en el postparto, siendo significativamente menores a los C tanto en madres A5 como en las A50 (**Figura 39 A**).

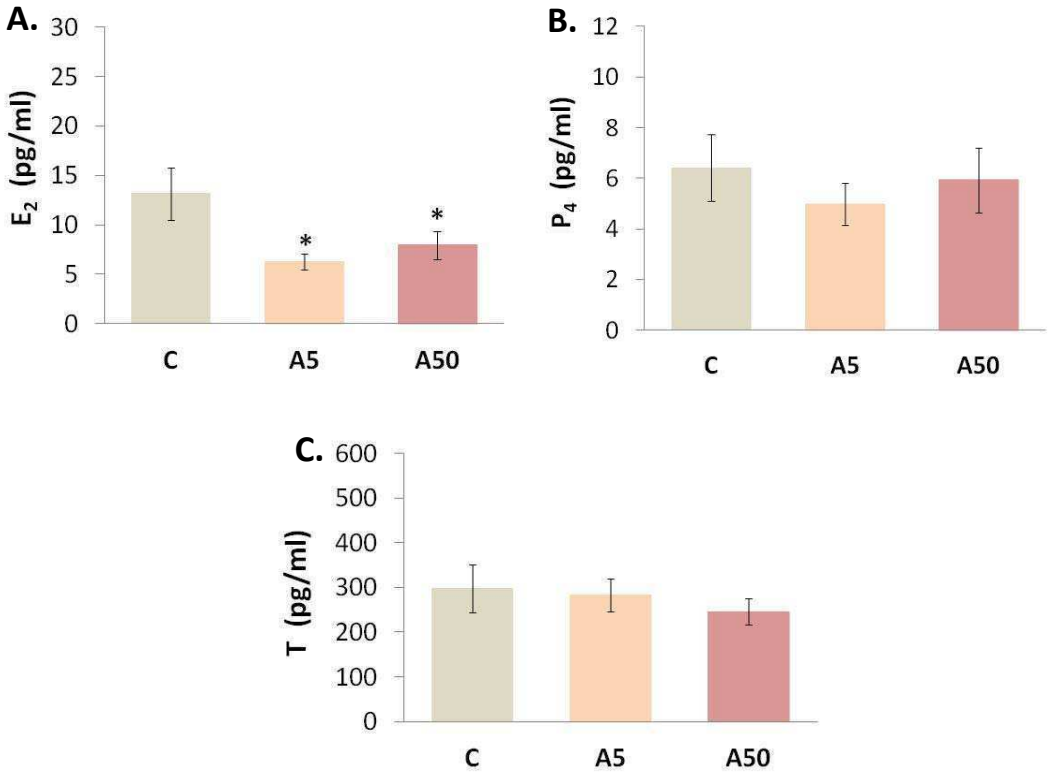



**Figura 39.** Efectos de la exposición a As en los niveles basales séricos de: $E_2$ (**A.**), $P_4$ (**B.**) y T (**C.**) en el postparto. Los resultados se expresan como el nivel medio de cada hormona esteroidea (pg/mL) ± ES. n=8-13. **A.** ANOVA de un factor, *A50 y A5 vs. C, p‹ 0.05. **B.** ANOVA de un factor. NS. **C.** ANOVA de un factor, NS.

## NIVELES SÉRICOS DE GONADOTROFINAS

Debido a la alteración encontrada en los niveles de $E_2$ en las madres A50, evaluamos los niveles séricos de las gonadotrofinas en esta etapa. A diferencia de los resultados obtenidos durante la preñez (sin diferencias en los niveles de LH o FSH entre tratamientos), encontramos un marcado incremento en los niveles de FSH en las madres A50 (**Figura 40 B**). Los niveles basales séricos de LH no difirieron entre tratamientos (**Figura 40 A**).

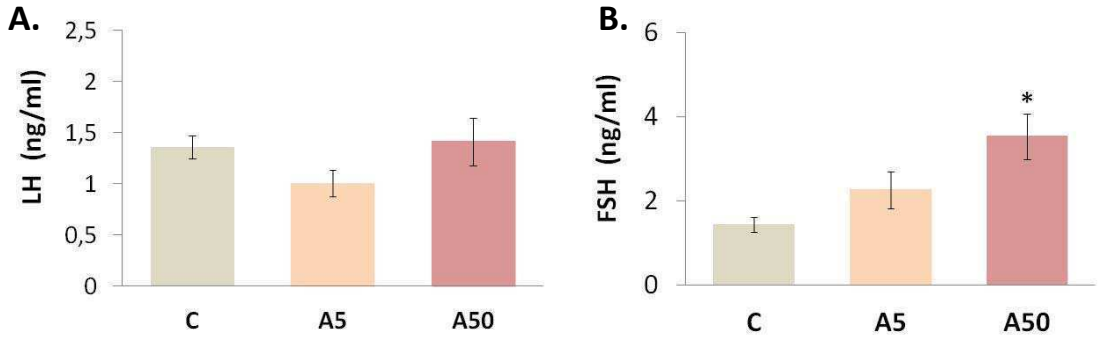



**Figura 40.** Efectos de la exposición a As en los niveles basales séricos de las gonadotrofinas: LH (**A.**) y FSH (**B.**) un mes postparto. Los datos son expresados como los niveles medios de cada gonadotrofina (ng/mL) ± ES. n=5-7. **A.** ANOVA de un factor. NS. **B.** ANOVA de un factor. *A50 vs. C, p‹ 0.05.

## CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE GNRH

Teniendo en cuenta que la liberación de las gonadotrofinas está regulada por la cantidad liberada en forma pulsátil de GnRH y las alteraciones halladas en los niveles basales de FSH en la etapa de postparto, decidimos evaluar el contenido hipotalámico del decapéptido para tener una primera aproximación de la funcionalidad del hipotálamo.

En la **Figura 41** se muestran los resultados obtenidos**.** Si bien existe una tendencia a que la exposición a As disminuya el contenido hipotalámico de GnRH, ésta no alcanzó significancia estadística.

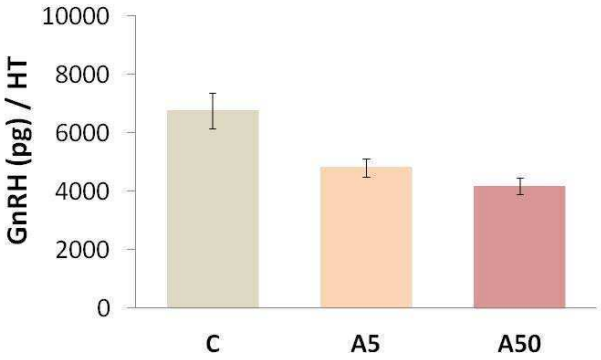



**Figura 41.** Efectos de la exposición a As en el contenido hipotalámico de GnRH en el postparto. Los datos son expresados como el nivel medio de GnRH (pg) / hipotálamo (HT) ± ES. ANOVA de un factor. NS. n= 8-10.

## EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN PULSÁTIL DE GNRH

La acción diferencial de GnRH en la secreción de las gonadotrofinas se puede explicar por la capacidad diferencial de respuesta de cada subunidad a la frecuencia de pulsos. Pulsos de GnRH de alta frecuencia (mayores a un pulso por hora) favorecen la síntesis de LH, mientras que pulsos de baja frecuencia (menores a un pulso por 2 o 3 horas) favorecen la síntesis de FSH.

Para tener una visión más fisiológica, procedimos a evaluar la frecuencia de pulsatilidad de GnRH a partir de explantos hipotalámicos incubados *in vitro* provenientes de madres de los distintos tratamientos a los dos meses post-parto. En la **Figura 42** se observan de forma representativa, los perfiles de secreción obtenidos para cada tratamiento.

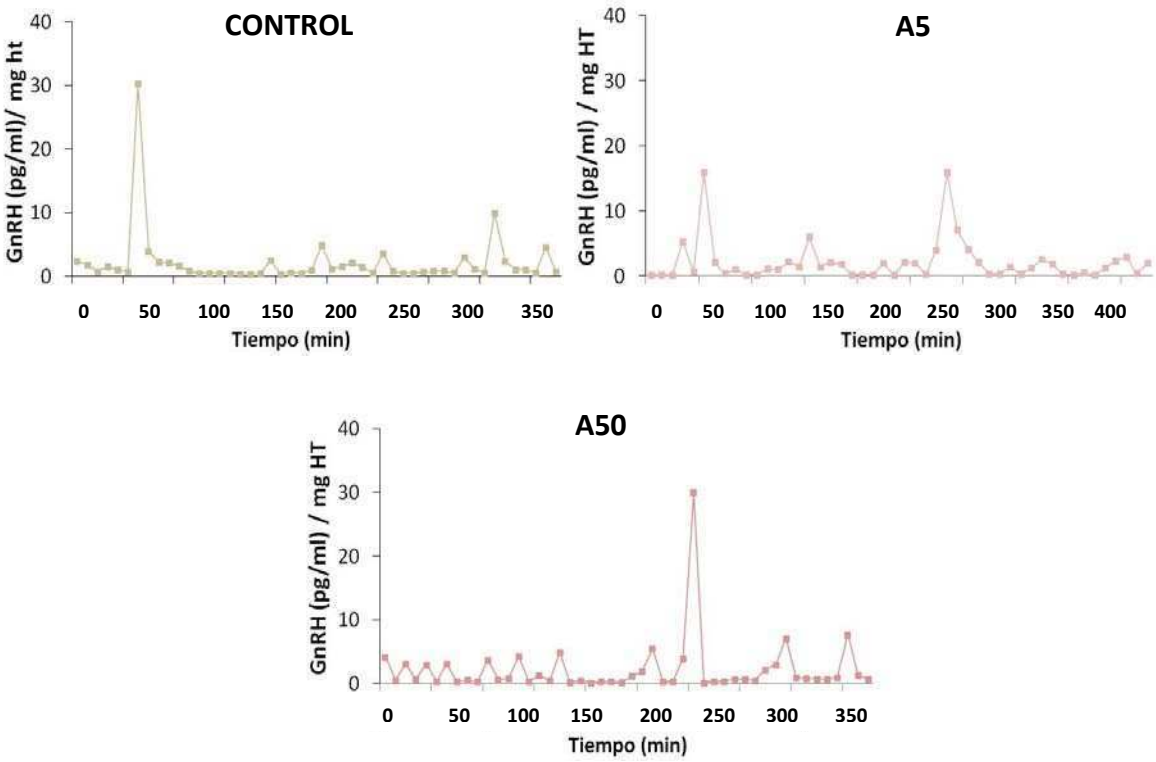



**Figura 42.** Efectos de la exposición a As en la liberación pulsátil de GnRH. Perfiles representativos de la secreción pulsátil de GnRH (pg/mg HT) a lo largo del tiempo (min), a partir de explantos hipotalámicos incubados *in vitro*.

La frecuencia de secreción pulsátil (cantidad de pulsos/hora) de GnRH fue similar entre tratamientos, al igual que la masa de GnRH secretada por pulso (**Figura 43**). Esto último coincide con la similitud en los niveles de contenido del decapéptido en el hipotálamo hallados previamente. Tampoco se encontraron alteraciones tras la exposición a As en los otros parámetros analizados: intervalo inter-pulso, duración del pico de GnRH o amplitud del mismo (**Figura 43**).

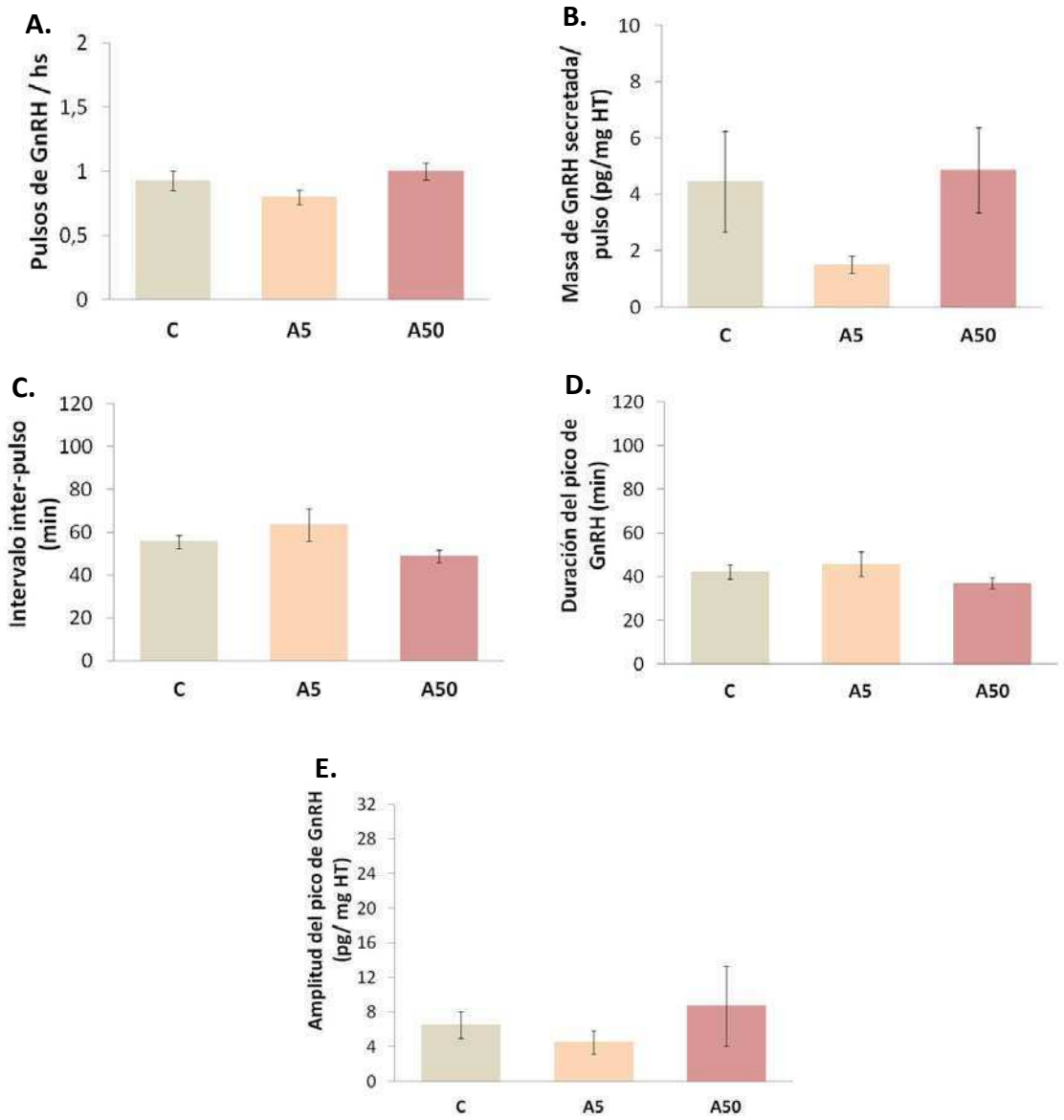



**Figura 43.** Efectos de la exposición a As en la liberación pulsátil de GnRH. N= 6-7. **A.** Frecuencia de la pulsatilidad de GnRH secretado (pulsos de GnRH/hora). ANOVA de un factor. NS. **B.** Masa de GnRH secretada/ pulso (pg/ mg de HT). ANOVA de un factor. NS. **C.** Intervalo inter-pulso (min). ANOVA de un factor. NS. **D.** Duración del pico de GnRH (min). ANOVA de un factor. NS. **E.** Amplitud del pico de GnRH (pg/ mg de HT). ANOVA de un factor. NS.

## RESPUESTA HIPOFISARIA A GNRH *IN VIVO*

Por otra parte, aproximadamente un mes posterior al destete de sus crías, se evaluó la respuesta hipofisaria a GnRH *in vivo* que nos permite evaluar la funcionalidad hipofisaria. En la **Figura 44** se muestran los resultados obtenidos, expresados como el porcentaje de incremento en los niveles de las gonadotrofinas a los 15 y 50 min después de la administración de GnRH.

Las madres expuestas a As mostraron una marcada disminución en la secreción de FSH estimulada por GnRH. Mientras que los animales control presentaron un aumento del 283% y 310% a los 15 y 50 min respectivamente, las madres A5 y A50 evidenciaron un bajo aumento en los niveles de FSH de manera dosis dependiente (A5: 135% y 196%; A50: 107% y 144%), logrando una significancia estadística solo en los animales A50, sugiriendo una alteración en la capacidad de respuesta hipofisaria en este grupo. La secreción de LH, en cambio, aumentó de manera tiempo dependiente sin diferencias entre los grupos.

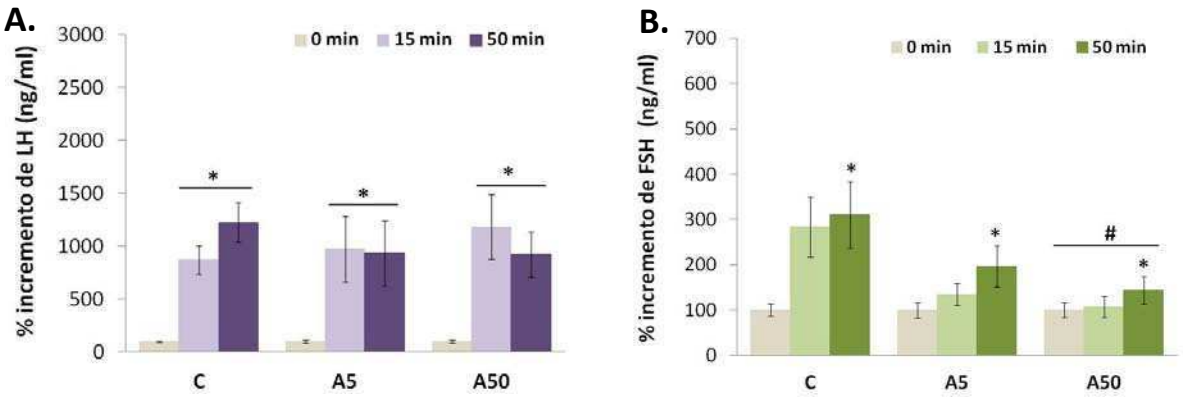



**Figura 44.** Efectos de la exposición a As en la secreción de LH (**A.**) y FSH (**B.**) en respuesta a GnRH, un mes postparto. ANOVA de dos factores con medidas repetidas. Los datos son expresados como los niveles medios de incremento de cada gonadotrofina (ng/mL, en %) ± ES. n=9-10. **A.** Interacción: NS; efecto principal tiempo $p<0.05$; efecto principal tratamiento NS. * 15 y 50 min vs. 0 min para todos los tratamientos, $p<0.05$. **B.** Interacción: NS; efecto principal tiempo $p<0.05$; efecto principal tratamiento $p<0.05$. * 50 min vs. 0 min para todos los tratamientos, $p<0.05$; # A50 vs. C, $p<0.05$.

## NIVELES SÉRICOS DE PROLACTINA

Los niveles séricos de PRL también fueron evaluados debido a su gran importancia en la funcionalidad del eje gonadotrófico, en la formación del cuerpo lúteo. Además la PRL es regulada positivamente por $E_2$ y éste se encontraba disminuido en esta etapa (Gonzalez et al. 2000). El tratamiento con la mayor dosis de As disminuyó significativamente los niveles de PRL en esta etapa en concordancia con los niveles disminuidos de $E_2$ (**Figura 45)**.

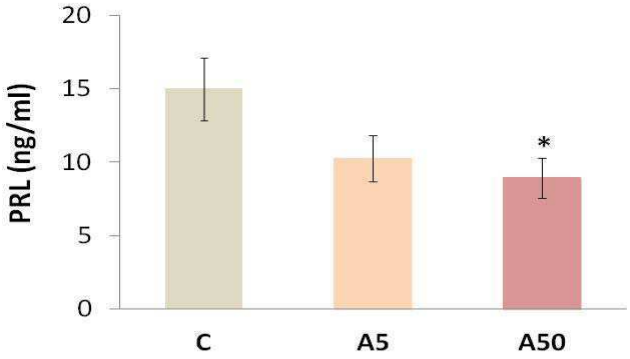



**Figura 45.** Efectos de la exposición a As en los niveles séricos basales de PRL en el postparto. Los datos son expresados como el nivel medio de PRL (ng/mL) ± ES. ANOVA de un factor. * A50 vs. C, $p<0.05$. n= 10-11.

## PESO DE LA GLÁNDULA ADRENAL

Por otra parte, se evaluó el peso de la glándula adrenal. Al igual que en la etapa de gestación no se hallaron diferencias entre tratamientos (**Figura 46)**.

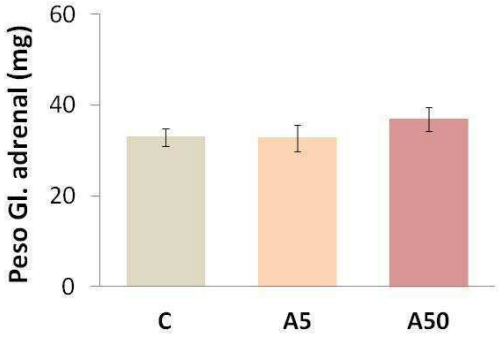



**Figura 46.** Efectos de la exposición a As en el peso de la glándula adrenal al postparto. Los datos son expresados como el peso medio (mg) ± ES. ANOVA de un factor. NS. n= 6-9.

## PESO OVÁRICO

En la etapa del postparto también se evaluó el peso ovárico. A pesar de haber encontrado una irregularidad en los ciclos estrales no se observaron diferencias significativas en el peso ovárico de las madres tratadas con As (**Figura 47**). En este caso no se relativizó el peso ovárico al peso corporal dado que no había diferencias en este último parámetro.

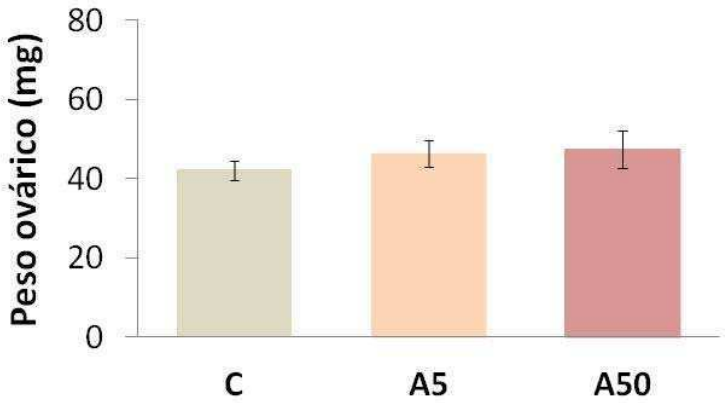



**Figura 47.** Efectos de la exposición a As en el peso ovárico al postparto. Los datos son expresados como el peso medio (mg) ± ES. ANOVA de un factor. NS. n= 12-15.

## MORFOLOGÍA OVÁRICA

Como una primera aproximación, se realizó una coloración topográfica de hematoxilina-eosina para determinar si las alteraciones en la ciclicidad y en los niveles de $E_2$ pueden correlacionarse con alteraciones en la morfología de este órgano.

En la **Figura 48** se muestran fotografías representativas de cada tratamiento.

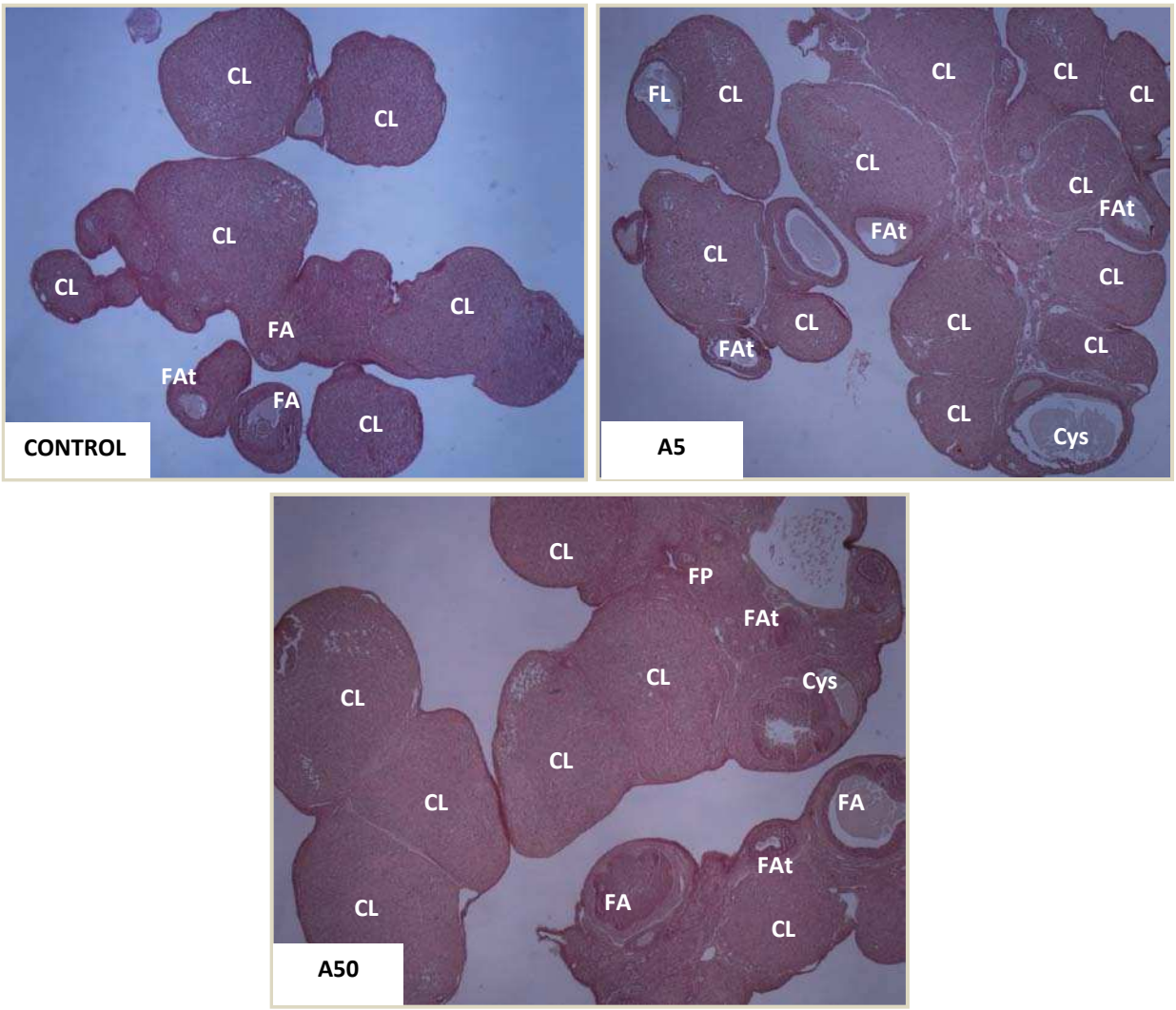



**Figura 48.** Efectos de la exposición a As en morfología ovárica al postparto. Imágenes representativas (4x) de los ovarios de madres C (**A.**), A5 (**B.**) y A50 (**C.**) coloreados con hematoxilina - eosina en dónde se observan las distintas estructuras analizadas: folículos primarios (FP), pre-antrales (FPA), antrales (FA), pre-ovulatorios (FPO), atrésicos (FAt), cuerpos lúteos (CL), cuerpos lúteos en regresión (CLreg), folículos quísticos (Cys) y folículos luteinizándose (FL).

En primer lugar, se puede observar que tanto las madres A5 como A50 presentaron folículos de gran diámetro con las siguientes características: capa delgada de granulosa (2-3 células de espesor), teca poco desarrollada, y con un gran volumen de líquido intrafolicular. De aquí en más llamaremos a este tipo de folículos "folículos quísticos" (Cys). Entre 1 y 3 folículos con estas características fueron observados por animal. Además algunos de los folículos antrales que se observaron en los animales expuestos

a la mayor dosis de As, presentaron invaginaciones en la capa de celulas de granulosa, que no se observaron en el grupo control (**Figura 49**). También se observaron folículos luteinizándose en los ovarios de madres A5.

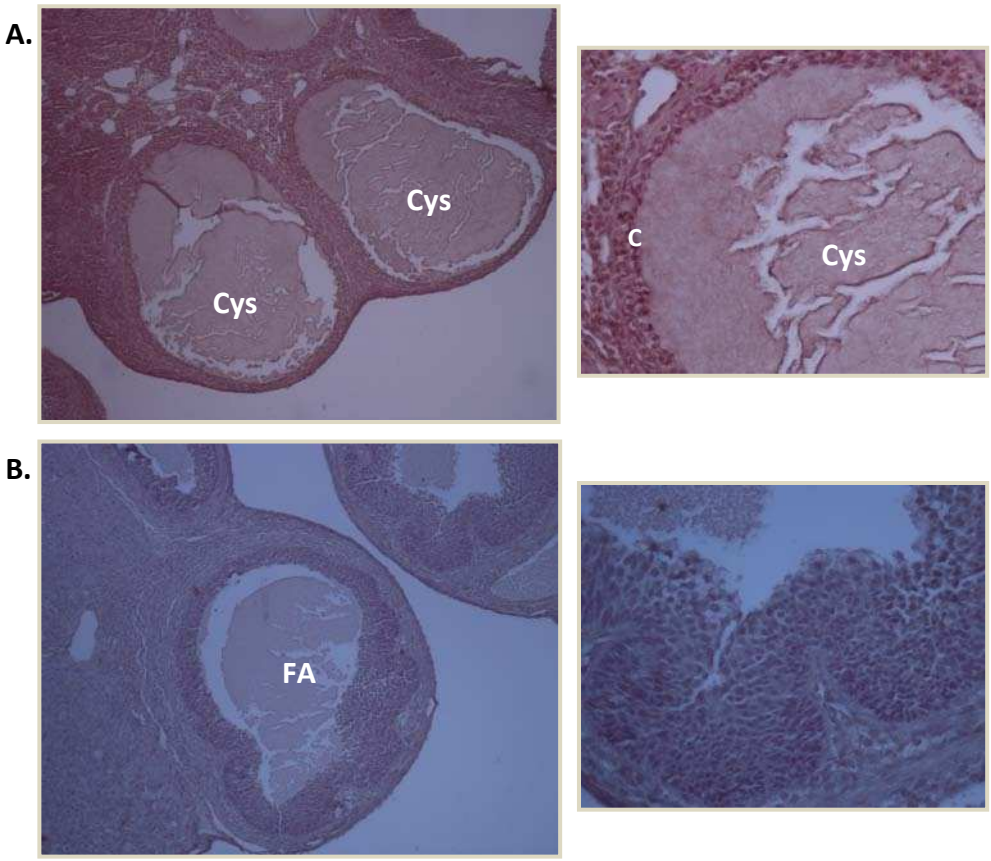



**Figura 49.** Efectos de la exposición a As en morfología ovárica al postparto. Imágenes representativas de **A.** los foliculos quísticos (Cys) y **B.** foliculos antrales (FA) con invaginaciones, cada uno a 10x (*izquierda*) y una magnificación de la imagen a 40x (*derecha*). CG: células de granulosa.

Si bien en las madres expuestas a ambas dosis se observaron folículos quísticos, al calcular el porcentaje de animales que presentaron este tipo de estructura solamente se obtuvo significancia estadística para las madres A50 (**Figura 50**).

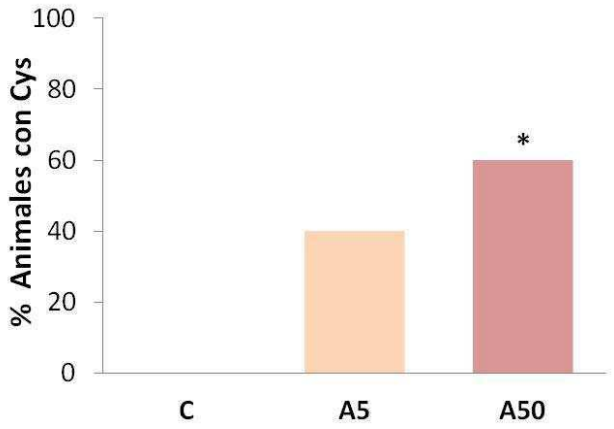



**Figura 50.** Efectos de la exposición a As en la cantidad de estructuras totales en el ovario de madres al postparto. Los datos son expresados como el porcentaje de animales que presentan folículos quísticos (Cys) medio ± ES. Chi cuadrado. * A50 vs. C, p‹0.05. N=5-6.

Luego evaluamos el número de estructuras ováricas totales, sin encontrar diferencias significativas entre los diferentes grupos (**Figura 51**).

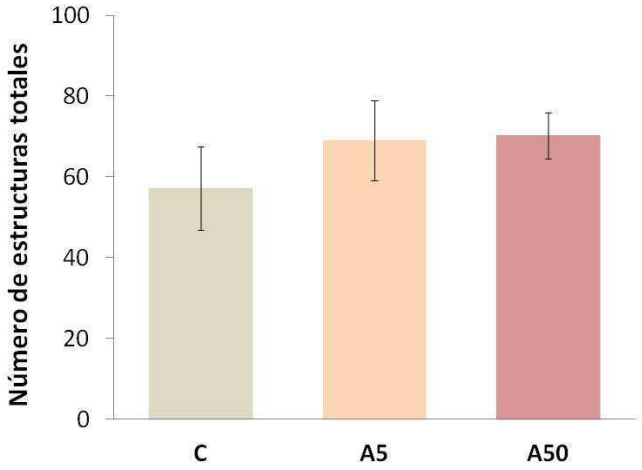



**Figura 51.** Efectos de la exposición a As en la cantidad de estructuras totales en el ovario de madres al postparto. Los datos son expresados como el número de estructuras totales medio ± ES. ANOVA de un factor. NS. N= 3 secciones/ ovario; 5-6 ovarios/ tratamiento.

También analizamos el número de folículos primarios (FP), preantrales (FPA), antrales (FA), preovulatorios (FPO), atrésicos (FAt), cuerpos lúteos (CL) y cuerpos lúteos en regresión (CLreg) (**Figura 52**). Tanto las madres A5 y A50 presentaron un

aumento significativo del porcentaje de CL, mientras que las expuestas a la mayor dosis de As muestran una tendencia a un menor crecimiento folicular, reflejado por el bajo porcentaje de FPA, FA y FPO. Sin embargo, con este número de casos no se logró significancia estadística.

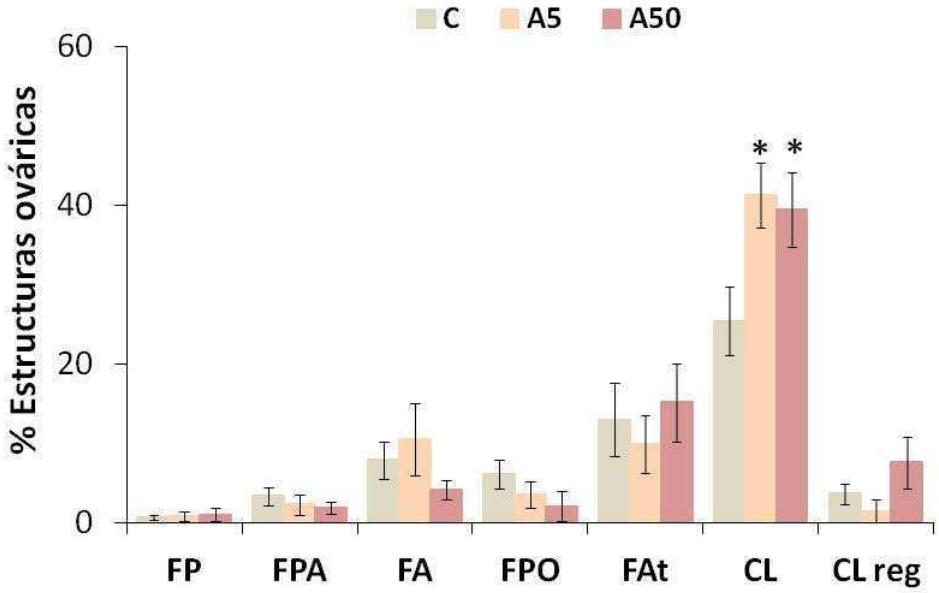



**Figura 52.** Porcentaje de estructuras ováricas en madres al postparto: folículos primarios (FP), pre-antrales (FPA), antrales (FA), pre-ovulatorios (FPO), atrésicos (FAt), cuerpos lúteos (CL), cuerpos lúteos en regresión (CLreg), quistes (Cys) y folículos luteinizandose (FL). ANOVA de un factor para cada estructura evaluada. * A50 y A5 vs. C, $p<0.05$. N=3 secciones/ ovario; 5-6 ovarios/ tratamiento.

## ESTUDIOS METABÓLICOS

### TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (TTG)

En la etapa de gestación, nuestros resultados indican que el As produjo intolerancia a la glucosa. Nos propusimos evaluar si esta alteración continúa en la etapa del postparto o se limita a un momento evolutivo como es la preñez. Un mes posterior al destete de sus crías, los animales fueron sometidos nuevamente a un TTG y la tolerancia a la glucosa se normalizó a niveles similares a los animales control (**Figura 53**). Además la glucemia basal en ayuno no difirió entre tratamientos: **C**: 84.00 ± 3.02; **A5**: 82.00 ± 2.35; **A50:** 76.91 ± 2.79 (ANOVA de un factor, NS. n=10-11).

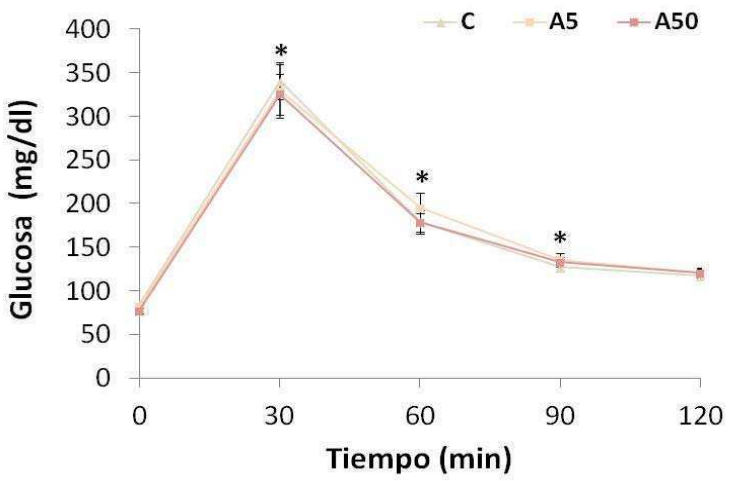



**Figura 53.** Efectos de la exposición a As en el metabolismo de la glucosa al postparto. Los resultados se expresan como el nivel medio de glucemia (ng/mL) ± ES a lo largo del tiempo (min). ANOVA de dos factores con medidas repetidas. Interacción: NS; factor principal tiempo p<0.0005; factor principal tratamiento NS. *distinto de cualquier tiempo, p‹ 0.005. n=10-11.

## TEST DE TOLERANCIA A LA INSULINA (TTI)

Además, una semana posterior al TTG, se realizó en los mismos animales un TTI sin encontrar diferencias en el metabolismo de la glucosa en respuesta a Insulina (**Figura 54**).

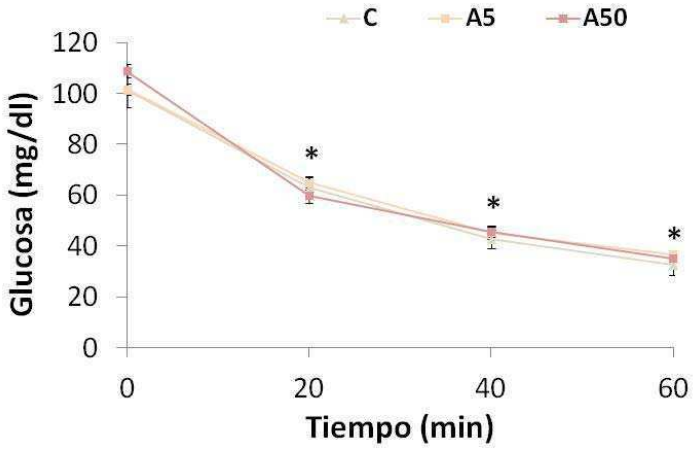



**Figura 54.** Efectos de la exposición a As en el metabolismo de la glucosa al postparto. Los resultados se expresan como el nivel medio de glucemia (ng/mL) ± ES a lo largo del tiempo (min). ANOVA de dos factores con medidas repetidas. Interacción: NS; factor principal tiempo p<0.0005; factor principal tratamiento NS. *distinto de cualquier tiempo, p‹ 0.005. n=4-6.

## ESTRÉS OXIDATIVO

El mecanismo exacto por el cual el As ejerce su efecto tóxico no está dilucidado aún. Algunos estudios sugieren que puede ejercer su toxicidad mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), conduciendo a un estrés oxidativo (Flora 2011). Siendo el hígado el sitio principal de metabolismo del As, presenta una gran interacción con diferentes especies del mismo y por lo tanto es uno de los órganos blancos donde se produce toxicidad. Además hemos encontrado alteraciones en el eje reproductivo (ciclicidad alterada, altos niveles de FSH y bajos de $E_2$) que indicarían una posible alteración en el ovario. Es por ello que evaluamos en estos órganos el grado de estrés oxidativo presente en cada uno de ellos.

Los lípidos son una de las moléculas más susceptibles a la modificación por oxidación. Una de las formas más comunes de medir peroxidación lipídica es detectando la cantidad de subproductos generados a partir de la degradación, como se analiza mediante el ensayo de TBARS (Sustancias Reactivas al Ácido tiobarbitúrico).

En la **Figura 55** se muestran los resultados obtenidos de nivel de peroxidación lipídica para cada tejido estudiado. La exposición a As no modificó la cantidad de TBARS medida respecto a sus pares control en hígado o en ovario.

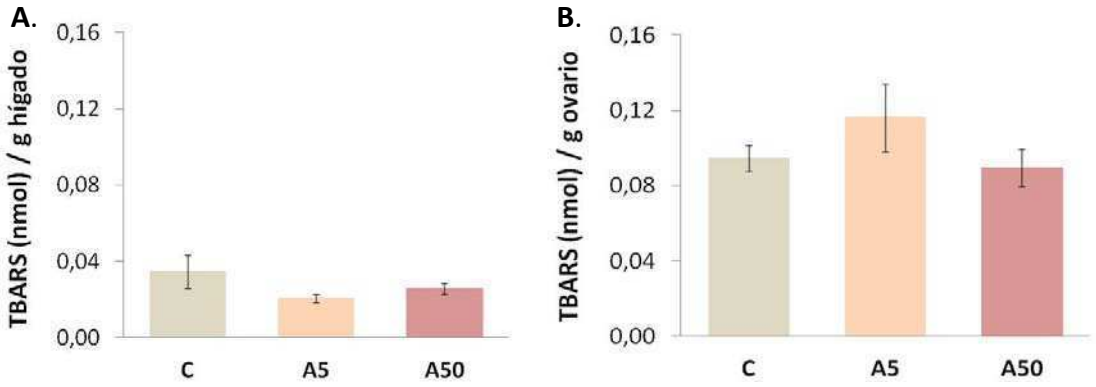



**Figura 55.** Efectos de la exposición a As en la peroxidación lipídica en hígado (**A.**) y ovario (**B.**). Los resultados se expresan como la media de TBARS (nmol) / g de órgano ± ES para cada tratamiento. n=7. **A.** ANOVA de un factor. NS. **B.** ANOVA de un factor. NS.

Para mantener la homeostasis redox, las células emplean sistemas enzimáticos y no enzimáticos antioxidantes para eliminar las ROS/RNS. Una de las vías enzimáticas antioxidantes es mediante la actividad de la enzima catalasa (CAT), que cataliza la conversión de peróxido de oxígeno ($H_2O_2$) a agua ($H_20$) y oxígeno ($O_2$). Se midió la actividad de CAT en hígado y ovario, sin encontrar diferencias entre tratamientos (**Figura 56**).

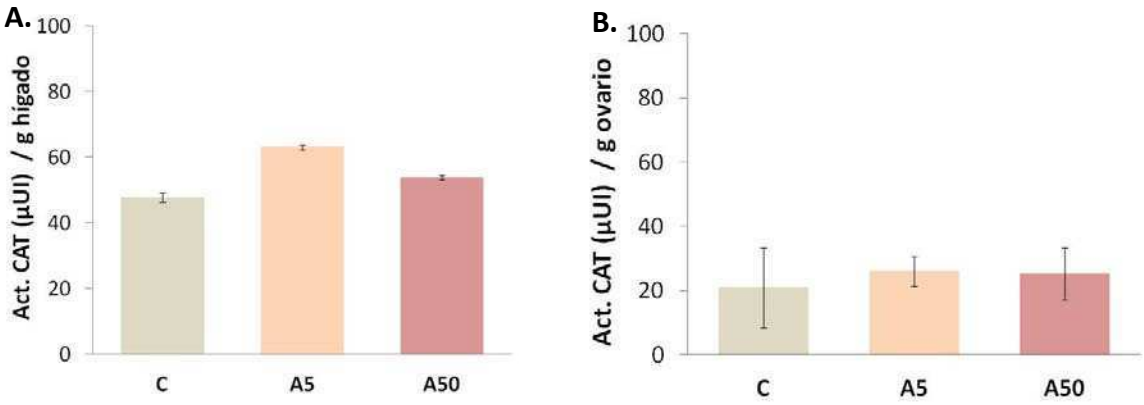



**Figura 56.** Efectos de la exposición a As en la actividad de la enzima catalasa (CAT) en hígado (**A.**) y ovario (**B.**). Los resultados se expresan como la Actividad de CAT media (µUI) / g de órgano ± ES para cada tratamiento. n=7. **A.** ANOVA de un factor. NS. **B.** ANOVA de un factor. NS.

El $H_2O_2$ también se puede convertir en $O_2$ a través de reacciones acopladas a la conversión de glutatión reducido (GSH) a oxidado (GSSG), catalizado por la enzima glutatión peroxidasa. Las reacciones que permiten el intercambio de tioles disulfuro, son consideradas una de las vías no enzimáticas más reconocidas para mantener el estado redox celular. La cantidad de GSH fue medida en hígado y ovario de madres de los diferentes grupos experimentales. Tampoco se encontraron diferencias en la cantidad de tioles totales luego del tratamiento con As (**Figura 57**).

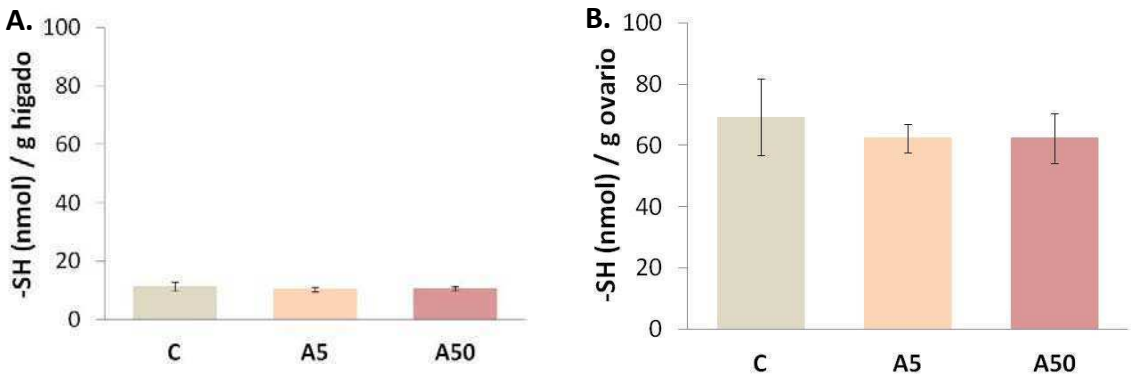



**Figura 57.** Efectos de la exposición a As en la cantidad de grupos tioles (-SH) totales en hígado (**A.**) y ovario (**B.**). Los resultados se expresan como la media de grupos -SH (nmol) / g de órgano ± ES para cada tratamiento. n=7. **A.** ANOVA de un factor. NS. **B.** ANOVA de un factor. NS.

## CONTENIDO DE ARSÉNICO TOTAL EN HÍGADO

Al momento del sacrificio, se recolectaron muestras de hígados de madres de todos los tratamientos para determinar el contenido de As total en los mismos. El tratamiento crónico con arsenito produjo un incremento en la concentración de As de forma dosis dependiente, exhibiendo un incremento de 3.4 y de 17 veces en los grupos A5 y A50 respectivamente. Estas diferencias respecto a las madres control son en efecto, subestimadas, ya que todas las muestras control presentan niveles de As por debajo del límite de detección de la técnica (**Figura 58**).

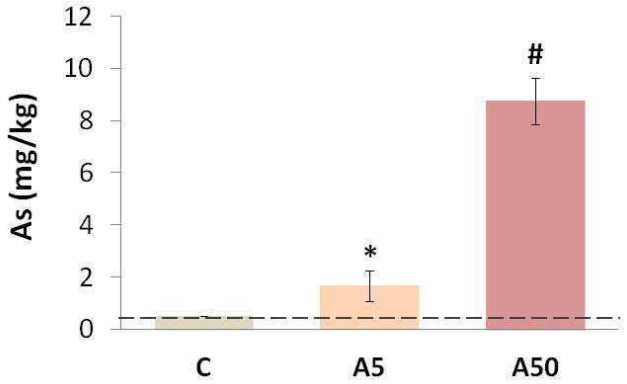



**Figura 58.** Contenido de As total en el hígado de madres al postparto. Los resultados se expresan como el contenido medio de As (mg/kg) ± ES. La línea punteada corresponde al límite de detección de la técnica: 0.05 mg/kg. ANOVA de un factor. *A5 vs. C, p‹ 0.0005; # A50 vs. C y A5, p‹ 0.0005. n=5.

## I.F. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES I

En este capítulo se evaluaron los efectos del As en el eje reproductivo y metabólico en ratas durante la preñez y la restauración de la funcionalidad reproductiva post-lactacional.

El contenido de As en el hígado fue significativamente mayor de manera dosis dependiente, alcanzando niveles de 8.7 mg/kg en el grupo expuesto a 50 ppm de arsenito de sodio, unas 17 veces por sobre los niveles observados en los controles. Es muy importante destacar que estos valores correlacionan con los niveles encontrados por otros autores (Guha Mazumder 2000). Además, los niveles de exposición en ambos tratamientos son epidemiológicamente relevantes ya que son similares a aquellos hallados en poblaciones expuestas a As en el agua de bebida: el contenido de As en hígado de una población del Oeste de Bengal, India fue de 6 mg/kg (Guha Mazumder 2000).

Los animales expuestos a 50 ppm de As mostraron disminuida la ganancia del peso corporal durante la preñez y esta diferencia no es atribuible a diferencias en el número o peso de sus crías. Esta diferencia persiste luego del parto (DPP1) y se normaliza totalmente a los dos meses postparto. El efecto de la intoxicación con As en forma crónica sobre el peso corporal varía de acuerdo al modelo experimental, pero existe un claro consenso general en los efectos que produce según el estadío de desarrollo, donde el As induce una disminución en la ganancia del peso respecto a los animales control (Izquierdo-Vega et al. 2006; Guan et al. 2012;Hopenhayn et. al, 2003) sin embargo Pal y col. no hallaron diferencias en el peso corporal de ratas *Wistar* macho (Pal and Chatterjee 2004). No encontramos ningún trabajo que evalúe los efectos de la exposición a As sobre el peso corporal durante la preñez, pero nuestros resultados coinciden con las observaciones generales, las ratas A50 ganaron menor peso que las madres control durante la preñez y lactancia, recuperando eventualmente el peso corporal normal, principalmente luego del destete de sus crías.

Pocos son los trabajos publicados donde se analizan los posibles efectos del As en la madre preñada y en sus fetos en desarrollo. Sin embargo, algunos estudios en animales sostienen la hipótesis donde se asocia al As con efectos adversos en el

embarazo, debido a su toxicidad (Hood 1972). Se ha demostrado que el As, a bajos niveles de exposición, podría incrementar la pérdida fetal, generar malformaciones congénitas, nacimientos pre -término, etc.. Por ello analizamos los efectos del As en la *performance* reproductiva, encontrando que la exposición a este metaloide no afectó el número de sitios de implantación ni en el número de cuerpos lúteos evaluados en el día 18 de preñez. Por otra parte, no se encontraron diferencias en el número de sitios reabsorbidos. Esto sugiere que el As, al menos a las dosis utilizadas en este trabajo, no altera la implantación embrionaria y tampoco afecta el desarrollo embrionario. De acuerdo a lo observado en la etapa de gestación, vimos reflejados estos resultados al día del parto: no encontramos diferencias en la cantidad de crías ni en la proporción de crías vivas/muertas. Sin embargo, He y col. han descripto menor cantidad de crías nacidas en ratonas FVB/NJ preñadas, expuestas a arsenito de sodio en el agua de bebida (20, 37.5 y 75 ppm) desde la concepción hasta el destete de sus crías (He et al. 2007), pudiendo existir diferencias según la especie estudiada. Además, todas las madres de los diferentes tratamientos llegaron a término con el período gestacional, pues no encontramos diferencias en la duración de la gestación.

Es sabido que el As puede atravesar la placenta y acumularse en este órgano, causando posiblemente efectos deletéreos. Por ello registramos el peso y longitud placentaria promedio al DG 18, sin encontrar diferencias significativas entre grupos.

En cuanto a los niveles de hormonas sexuales durante la preñez, encontramos un aumento en los niveles séricos de $E_2$ y T al DG 18 en las madres expuestas a 50 ppm. Los niveles de $P_4$ fueron similares entre tratamientos. De nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que describe los efectos del As en las hormonas sexuales en ratas preñadas. Este incremento en los niveles de $E_2$ y T no fueron acompañados por alteraciones en los niveles séricos de LH o FSH, contrariamente a lo descripto sobre los efectos del As sobre el eje reproductivo en ratas no preñadas. La ausencia de alteraciones por la exposición a As en los niveles de las gonadotrofinas en esta etapa, puede ser el resultado de los bajos niveles que existen de estas hormonas como resultado del entorno endócrino presente en la preñez, incluyendo a un nuevo órgano productor de hormonas, la placenta.

La $P_4$ y los estrógenos son esenciales para establecer y mantener la preñez y el desarrollo embrionario en mamíferos. En los roedores, la esteroidogénesis ovárica es necesaria a lo largo de la preñez, ya que la placenta madura del roedor solo puede convertir $P_4$ en andrógenos por la expresión de la enzima P450c17 (Warshaw et al. 1986). Entonces, se asume que la $P_4$ generada en el cuerpo lúteo se convierte a andrógenos en la placenta, y que a su vez, éstos le sirven al ovario como sustrato para la síntesis de estrógenos (Jackson and Albrecht 1985; Gibori et al. 1988). Es así, como durante la preñez los andrógenos son producidos principalmente por la placenta (Rembiesa et al. 1972) y un incremento fisiológico de los mismos se observa al DG 18. El tratamiento con As incrementó significativamente este aumento en los niveles de T sérica, sin modificar el contenido ovárico del mismo, por lo que esta alteración podría deberse a una modificación en la esteroidogénesis de la placenta.

En las madres A50, también los niveles séricos de $E_2$ se encuentran aumentados en la etapa de gestación, sin embargo el contenido ovárico de este esteroide está, sorpresivamente, reducido en las hembras expuestas a As. El aumento sérico de $E_2$ podría deberse entonces a una aromatización en el tejido periférico, ya que la placenta del roedor carece de aromatasa (Al Bader 2006). Sin embargo, con estos resultados, tampoco podemos descartar que exista una alteración en la esteroidogénesis ovárica.

Luego de la restauración de la ciclicidad (etapa de postparto), los niveles de $P_4$ permanecen inalterados, los de T se normalizan, mientras que los de $E_2$ mostraron una disminución marcada en las madres tratadas con As. Esta disminución en los niveles de $E_2$ es acompañada por un incremento en los niveles de FSH, efecto dosis dependiente, que alcanza significancia estadística solo en los animales A50.

De acuerdo con la disminución en los niveles séricos de $E_2$, los animales expuestos a As mostraron un incremento en el porcentaje de días en anestro, indicando que este metaloide altera la ciclicidad en ratas hembra en este período particular del recomienzo del desarrollo folicular que permaneció practicamnte arrestado durante la lactancia. Resultados similares han sido descriptos por otros autores en distintos modelos experimentales: Chattopadhyay y col. describe un diestro persistente debido a bajos niveles de $E_2$ en ratas adultas tratadas con 0,4 ppm de arsenito de sodio.

Los bajos niveles de $E_2$ y altos de FSH, son compatibles con una **falla ovárica prematura**, causada por el efecto tóxico del As. Las alteraciones en los ciclos estrales también coinciden con esta hipótesis, ya que una de las primeras alteraciones descriptas para esta patología y/o en la menopausia, son las alteraciones en la ciclicidad.

Su y col. encontraron resultados similares a los nuestros, bajos niveles de $E_2$ y altos de FSH en ratas Sprague Dawley de 11 meses de edad sin tratamiento, una edad en la cual las ratas entran en senescencia (Su et al. 2013).

Para determinar si las alteraciones en la ciclicidad y en los niveles de $E_2$ pueden correlacionarse con alteraciones en la morfología de este órgano, evaluamos la cantidad y tipo de estructuras ováricas presentes en ovarios de ratas control y expuestas a As. Las madres expuestas a ambas dosis de As presentaron un aumento significativo del porcentaje de CL. En las madres A50 se observa una tendencia a un menor crecimiento folicular, reflejado por el bajo porcentaje de FPA, FA y FPO, que con la cantidad de animales analizados no alcanza aún significancia estadística. Si esta tendencia se confirma al aumentar el número de animales, los resultados explicarían en parte los bajos niveles séricos de $E_2$ encontrados. El aumento en la cantidad de CL puede deberse a una luteinización temprana de los folículos (tal como se observó en los ovarios de madres A5) o a una permanencia de los mismos, aún luego de dos meses postparto. Chattopadhyay y col. describe una disminución en la foliculogénesis en ratas *Wistar* adultas, expuestas a 0.4 ppm de arsenito de sodio en el agua de bebida durante 28 días (Chattopadhyay and Ghosh 2010a). Sin embargo en estos trabajos no se evalúan los CL. Además tanto las madres A5 como las A50 presentaron folículos quísticos (de gran diámetro, capa delgada de granulosa, teca poco desarrollada y con un gran volumen de líquido intrafolicular). Ahn y col. describe una disrupción en la ciclicidad y presencia de folículos quísticos hemorrágicos en ratones a los que se les inyectó durante 3.5 semanas y dos veces por semana 4 mg/kg de $As_20_3$. En ese mismo trabajo, se demostró un bajo crecimiento y sobrevida de folículos aislados tratados en cultivo con 3, 30 o 90 µM de $As_20_3$ (Ahn et al. 2013). Varios estudios reportaron que el As puede actuar alterando la regulación génica de los receptores de hormonas

esteroideas, tales como el receptor de andrógenos, el cual se ha relacionado con la falla ovárica prematura y el desarrollo de ovarios poliquísticos (Walters et al. 2008).

Por otra parte, encontramos solamente en el postparto una disminución en los niveles de PRL, que puede deberse a los bajos niveles de $E_2$ en las madres tratadas. El $E_2$ ejerce una retroalimentación positiva en la secreción de PRL (Recouvreux et al. 2013), así que la disminución de la misma podría explicar los bajos niveles de la hormona encontrados en el suero de estos animales, particularmente en las madres A50, aunque no podemos descartar algún otro efecto deletéreo ejercido directamente en la pituitaria.

Dados los altos niveles de FSH encontrados en las madres expuestas a As, determinamos el contenido hipotalámico de GnRH. El tratamiento con As solo induce una leve disminución, no estadística, en los niveles del decapéptido, A su vez, la respuesta hipofisaria a GnRH también ha sido evaluada en estos animales, encontrando nuevamente alteraciones en la secreción de FSH. En este caso, la secreción de FSH inducida por GnRH fue impedida de manera dosis dependiente, viéndose disminuida significativamente en el grupo A50, indicando que el tratamiento con As altera la sensibilidad hipofisaria a GnRH en relación a FSH. Estos resultados pueden deberse a una disminución en el *pool* de FSH intracelular como causa de los elevados niveles basales de esta hormona, como describimos anteriormente. Este *pool* intracelular reducido podría producir una menor capacidad de las células para responder ante un factor estimulatorio como GnRH.

Esta descripto que el modo pulsátil de secreción de GnRH desde el hipotálamo, y la activación de su receptor en los gonadotrofos de la hipófisis, son esenciales para la óptima síntesis y secreción de las gonadotrofinas, y en última instancia para la normal función reproductiva (Krsmanovic et al. 2009). Es así como el patrón de pulsatilidad de GnRH estimula de forma diferencial la síntesis y secreción de las gonadotrofinas: pulsos de alta frecuencia de GnRH favorecen la síntesis de LH, mientras que pulsos de baja frecuencia favorecen la síntesis de FSH. Por este motivo nos propusimos evaluar la liberación pulsátil de GnRH hipotalámica en las madres de los diferentes tratamientos. La exposición a As en ninguna de las dosis empleadas modificó ninguno de los parámetros evaluados relacionados con los pulsos de GnRH a lo largo del tiempo

(cantidad de pulsos/hora, intervalo inter-pulso, duración del pico de GnRH o amplitud del mismo). De nuestro conocimiento, esta es la primera vez en la que se describe los posibles efectos del As sobre la fisiología del hipotálamo.

Si bien la puslatilidad de GnRH es uno de los factores que influyen en la expresión diferencial de FSH y LH, ésta también está regulada en parte por una retroalimentación de las hormonas ováricas directamente en la hipófisis: el $E_2$ aumenta los niveles de LH e inhibe los de FSH; y las Inhibinas A y B reducen la secreción de FSH. También se ha demostrado que mayores niveles de activina bio-disponible, debido a una caída en la folistatina y / o en los niveles de inhibina, pueden favorecer selectivamente la síntesis FSHβ (Besecke et al. 1996; Woodruff et al. 1996). Por otra parte, siguiendo nuestra hipótesis, en nuestro modelo experimental la falla ovárica podría ser la responsable de la caída en los niveles de $E_2$ observados en los animales expuestos a As, así como también podría causar la disminución en los niveles de inhibina y como consecuencia de estos dos factores, inducir el incremento en los niveles de FSH observados en este grupo.

La degeneración folicular ovárica en las ratas tratadas con As podría explicarse por el estrés oxidativo que produce el As en el ovario. Sin embargo en nuestro modelo experimental no encontramos alteraciones en la actividad de la enzima catalasa, ni en los niveles de peroxidación lipídica o en la cantidad de TBARS en el ovario (ni en el hígado). Por lo tanto, el mecanismo de acción por el cual el As produce estas alteraciones a nivel ovárico queda aún por dilucidar.

En nuestro modelo experimental el As induce, únicamente durante la preñez, una apreciable intolerancia a la glucosa evidenciada por los resultados obtenidos en el TTG. Esta incapacidad de restauración de la glucemia fue más pronunciada en las madres A50. La disminución en la capacidad de depuración de la glucosa durante el TTG podría explicarse por una incapacidad de las células β para secretar insulina en respuesta a la glucosa o una disminución en la sensibilidad periférica a esta hormona o una combinación de ambas. El análisis del índice HOMA-IR puede ayudar a responder esta pregunta, ya que este índice evalúa la sensibilidad a la insulina de los tejidos periféricos. Cuando analizamos el HOMA-IR, las madres A5 mostraron un valor de índice menor a sus pares control, indicando que en estos animales existe un aumento

en la sensibilidad a insulina. Sin embargo, este parámetro no se alteró en las madres A50. Este fenómeno podría explicar por qué los animales A5 presentan una alteración menor en el TTG, respecto a las madres expuestas a la dosis mayor. El test de tolerancia a la insulina (TTI) en las madres al DG 18 podría ayudarnos a determinar con mayor precisión, si la exposición a As produce una insulino resistencia en los tejidos periféricos. Sin embargo, no realizamos este estudio dado que no quisimos someter a las hembras preñadas al estrés que implica la hipoglucemia que se genera frente a la administración de insulina en condiciones de ayuno.

Teniendo en cuenta que el HOMA-IR no está aumentado, podemos inferir que el As induce alteraciones en la homeostasis de la glucosa durante la gestación, alterando el correcto funcionamiento de las células β. Varios estudios *in vivo* e *in vitro* describen una disminución en la secreción de insulina debido a un estrés oxidativo, un fenómeno inducido por As descripto ampliamente (Fu et al. 2010) y que sería de sumo interés evaluar más adelante, a pesar d que no hayamos encontrado evidencias de alteraciones del estrés oxidativo en ovario o hígado.

Además no encontramos alteraciones en los niveles séricos de insulina y glucagon, pero sí un alto contenido pancreático de insulina en las madres expuestas a As, lo cual es consistente con nuestra hipótesis de que el As podría alterar la secreción de insulina durante el TTG, pero no sus síntesis en las condiciones estudiadas. Para comprobarlo sería oportuno realizar un Test de Secreción de Insulina (TSI).

Interesantemente, los niveles de testosterona elevados podrían contribuir a la intolerancia a la glucosa observada en las ratas preñadas tratadas con As, ya que se ha descripto diferencias sexuales en este parámetro (menor tolerancia a la glucosa en machos que en hembras) que se atribuyen a esta hormona (Faerch et al. 2010).

Nuestros resultados revelan un efecto perjudicial del As en la homeostasis de la glucosa que puede llevar a un aumento en el riesgo de desarrollar diabetes gestacional. A pesar de que existen varios modelos experimentales analizando la exposición del As durante la preñez, la mayoría de ellos estudia los efectos adversos sobre las crías y proveen muy poca información sobre los efectos en las madres. Además, aunque existe amplia evidencia que muestra un incremento en el riesgo de diabetes de tipo II en la población en general expuesta a As, muy poco se sabe sobre la

exposición durante la preñez y su asociación a la diabetes gestacional. En relación a ello, Ettinger y col. demostraron una asociación entre la exposición a As en el agua de bebida y las altas probabilidades de alteraciones en el TTG en mujeres embarazadas de Oklahoma, EEUU (Ettinger et al. 2009). Futuros trabajos intentarán dilucidar los mecanismos por los cuales el As ejerce estos efectos metabólicos deletéreos y transitorios durante la preñez, ya que éstos se normalizan luego del parto.

## CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO I

Nuestros resultados demuestran que el As puede actuar en las madres como un efectivo disruptor endócrino desde la preñez en adelante, afectando diferentes ejes endócrinos e induciendo un síndrome símil diabetes gestacional durante la preñez.

Tomando en cuenta todos estos resultados y que la falla ovárica puede acelerarse por factores externos, incluyendo tóxicos ambientales, llevando a la menopausia temprana (Tilly and Sinclair 2013), podemos postular que el tratamiento con As puede inducir falla ovárica prematura en este modelo animal. El marcado descenso en los niveles de $E_2$ y los elevados niveles de FSH observados en este trabajo también fueron descriptos como una característica de la amortiguación en la retroalimentación positiva hipotálamo- hipófisis en respuesta a estrógenos, causando finalmente la menopausia, concomitantemente con el declive de la reserva ovárica.

En la **Tabla 1** se presenta un resumen de los resultados obtenidos en este capítulo.

**Tabla 1.** Resumen de los efectos de la exposición a As en el control del eje reproductivo y la homeostasis de la glucemia durante la gestación y en el postparto.

| | Gestación | Postparto |
|---|---|---|
| Peso corporal | ↓ A50 | = |
| Performance reproductiva | = | = |
| Gonadotrofinas séricas | = LH y FSH | = LH<br>↑ A50 FSH |
| PRL sérica | = | ↓ A50 |
| Hormonas esteroideas séricas | ↑$E_2$ A50<br>= $P_4$<br>↑ T A50 | ↓ $E_2$ A5 y A50<br>= $P_4$<br>= T |
| Contenido ovárico de hormonas esteroideas | ↓ $E_2$ A50<br>= $P_4$<br>= T | |
| Peso ovárico | ↑ A50 | = |
| Ciclo estral | | ↑ anestros |
| Contenido hipotalámico de GnRH | | = |
| Liberación pulsátil de GnRH | | = |
| Secreción de gonadotrofinas en respuesta a GnRH | | = LH<br>↓ FSH A50 |
| Peso glándula adrenal | = | = |
| Morfología ovárica | | ↑CL A5 y A50<br>Cys A5 y A50 |
| Test de tolerancia a la glucosa/ insulina | ↑ A5 y A50/ - | = / = |
| Glucemia /Insulina en ayuno | = / = | = / - |
| HOMA-IR | ↓ A5 | |
| Insulina y glucagon séricos en ayuno | = | |
| Contenido pancreático de insulina y glucagon | ↑ cont. Insulina A5 y A50<br>= cont. glucagon | |
| Estrés oxidativo en hígado (HIG) y ovario (OV) | | = HIG<br>= OV |
| Contenido de As en hígado | | ↑A50 > A5 > C |

# CAPITULO II – ESTUDIOS EN CRÍAS

## II.A. INTRODUCCIÓN II

### DIFERENCIACIÓN DEL SISTEMA REPRODUCTIVO

En los mamíferos, luego de la determinación genética del sexo, el sistema reproductivo es inicialmente anátomo-funcionalmente indistinguible entre los dos sexos, pero está predeterminado para desarrollar, básicamernte, la vía hembra. Para llegar a ser un macho, se necesita una modificación en este proceso, que implica una cadena de acontecimientos iniciados por la activación del gen *Sry*, resultando en la formación de testículo. Este es el primer paso en la vía masculina, pero no necesariamente resulta en un fenotipo masculino. Más bien, la "masculinización" de todo el cuerpo es impulsada por las hormonas producidas por el testículo fetal, principalmente la testosterona (Welsh et al. 2008). El término “masculinización” se refiere al proceso por el cual un feto sexualmente indiferenciado con un testículo se transforma luego en un fenotipo masculino con genitales masculinos externos (pene, escroto y perineo) e internos (epidídimo, vas deferens, vesículas seminales y próstata), el cual no puede ocurrir hasta que el testículo se diferencie y comience a secretar hormonas. Estudios recientes en ratas han demostrado que existe una ventana de masculinización andrógeno-dependiente que precede a la diferenciación de estas estructuras, y se ha denominado a este período *“ventana de programación masculina (VPM)”* y ocurre entre los días de gestación 15.5-17.5 en roedores y entre las semanas 8-12 en humanos (Scott et al. 2009). Se ha demostrado que si hay insuficiencia en la acción o en la producción de la testosterona durante la VPM, puede resultar en alteraciones en la masculinización como por ejemplo la ausencia de la formación del pene o malformaciones del mismo, criptorquidias, ausencia en el desarrollo de la próstata, reducción en la distancia anogenital y longitud del pene.

La **distancia anogenital (AGD)**, que es sexualmente dimórfica en roedores y humanos, siendo mayor en machos que en hembras, es comúnmente considerada un método no-invasivo de 'lectura' sobre la acción/ exposición de andrógenos fetales en

el útero durante la VPM (van den et al. 2012). Diversas alteraciones se han reportado en la AGD de la progenie de ratas preñadas tratadas exógenamente con una variedad de agentes conocidos por tener actividad endocrina. Algunos de los compuestos que han sido descriptos como causantes de tales alteraciones incluyen: andrógenos como la testosterona y androstenediona; antiandrógenos como la vinclozolina y la flutamida; estrógenos, incluyendo el fitoestrógeno isoflavonoide genisteína, así como el benzoato de estradiol y dietilestilbestrol; etc (Gallavan, Jr. et al. 1999). Una AGD más corta se asocia, tanto en ratas como en seres humanos, con la aparición de hipospadias, criptorquidia y pene más corto de longitud al nacer y con recuentos bajos de espermatozoides e infertilidad en la edad adulta.

En los vertebrados, además de la diferenciación de los órganos sexuales, la habilidad de alcanzar la competencia reproductiva en la adultez involucra la organización de una red neuronal compleja, sensible a hormonas esteroideas, en regiones discretas del cerebro (hipotálamo, área preóptica), como hemos visto, durante ventanas de tiempo críticas en el desarrollo. Este proceso incluye el establecimiento de la red neural hipotalámica de neuronas GnRH, junto con sus aferencias regulatorias, que permiten los efectos de retroalimentación de las hormonas esteroideas sobre la liberación pulsátil de GnRH y el pico preovulatorio de GnRH/LH en las hembras y la ausencia de éste en los machos. El desarrollo anatómico de esta red hipotalámica sensible a esteroides ocurre temprano en el desarrollo, particularmente durante la etapa embrionaria tardía y el período temprano neonatal en los mamíferos, y su organización es fundamental para alcanzar y activar las funciones reproductivas apropiadas en la adultez (Gore 2008).

En la rata, la diferenciación sexual del cerebro funcional ocurre, como es sabido, durante el período perinatal. Las características conspicuas del dimorfismo sexual son el ciclo estral y el patrón de comportamiento sexual en mamíferos. Estas funciones son controladas por el hipotálamo: por el área preóptica (APO) para la ciclicidad (Freeman 1994; Terasawa et al. 1984) y por el núcleo hipotalámico ventromedial (NVM) y el septum para el comportamiento sexual femenino (Pfaff et al. 1999). Dos picos de testosterona, uno prenatal (aproximadamente el día 18 de gestación) y otro el día del nacimiento inducen la diferenciación hacia macho. Durante el período perinatal, la

presencia de andrógenos o estrógenos pueden producir la masculinización en la hembra, con un estro acíclico y bajo índice de lordosis (Kouki et al. 2005b). Existen numerosos núcleos sexuales dimórficos (Bleier et al. 1982; Gorski 1968; Gorski et al. 1980), pero entre ellos dos regiones, el AVPV y el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica (SDN-POA) tienen un desarrollo diferencial debido a la influencia de hormonas endógenas y pueden ser manipulados en tamaño (y probablemente en función) por la castración o administración de hormonas exógenas. En el período crítico de diferenciación sexual del cerebro, diferentes sustancias que actúan a través del receptor de estrógenos tienen la potencialidad de causar un cerebro de fenotipo masculino bloqueando la ciclicidad y disminuyendo el patrón de comportamiento sexual femenino (Kouki et al. 2005a). Las regiones anteriormente mencionadas son, por lo tanto, un posible blanco de la impronta epigenética de los disruptores endócrinos.

## ARSÉNICO Y CRÍAS

Como mencionamos, durante el período gestacional, la exposición a As puede causar alteraciones tanto a la madre como al feto en ratas y humanos, ya que puede atravesar la barrera placentaria, produciendo un aumento en el riesgo de pérdida fetal, nacimientos a pre-término y mortalidad neonatal así como también bajo peso corporal al nacimiento, a bajos niveles de exposición.

Cuando a ratones hembra preñadas se las expone vía inhalación al gas arsina, tanto los cerebros como los hígados de los fetos contienen mayores concentraciones de As que la placenta o el hígado materno (Miyazaki et al. 2005). La exposición a $As_i$ en el agua de bebida en ratas preñadas también resulta en la acumulación de As en el feto, incluyendo el cerebro fetal (Rodriguez et al. 2002). Los compuestos monometil y dimetil arsenicales han sido detectados en fetos de ratones hembra preñadas expuestas a $As^{III}$ o a $As^{V}$ a través de una inyección i.p o por vía oral (Hood et al. 1987; Hood et al. 1988). De todas formas, no está en claro que forma/s del As son las que atraviesan la placenta o si los fetos metilan el As.

El estadío de desarrollo en los animales (que se extiende desde la etapa fetal y neonatal hasta la pubertad) son blanco de disruptores endócrinos. Dentro del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, la maduración y función reproductiva son coordinadas por la liberación de GnRH desde el hipotálamo (Elkind-Hirsch et al. 1981). Los componentes neurales de este eje que regulan la secreción de GnRH son sexualmente diferenciados por las hormonas endógenas gonadales, principalmente el $E_2$, a través de una serie de eventos críticos en las etapas pre- y perinatal (Cooke et al. 1998). Entonces, la disrupción de esta organización sexo-específica por la exposición a disruptores endócrinos durante uno o más de estos períodos críticos, puede afectar el inicio de la pubertad y el mantenimiento del ciclo estral regular en las ratas hembra.

Pocos estudios han sido enfocados a evaluar los efectos de la exposición a As desde la gestación hasta la adultez. Dado que el As atraviesa la placenta e interactúa con hormonas esteroideas, como hemos mencionado particularmente con $E_2$, parecería que la exposición a este metaloide podría tener efectos en el feto en desarrollo.

## II.B. OBJETIVO CAPÍTULO II

El objetivo de este capítulo fue estudiar los efectos del As como disruptor endócrino en el eje reproductivo y metabólico a distintas etapas de desarrollo y determinar que ventana de exposición a este metaloide es crucial para causar efectos permanentes.

# II.C. MATERIALES Y MÉTODOS II

## MODELO EXPERIMENTAL

Luego de estar expuestas a A5 o A50 desde la concepción en el útero materno, el día del parto, las crías fueron divididas en machos y hembras de acuerdo a su distancia anogenital (AGD) y cada camada se ajustó a un número de 8 crías por madre (4 hembras/ 4 machos cada vez que fue posible). Desde el día del nacimiento (día postnatal 1: DPN 1), las crías continuaron estando expuestas a As durante la lactancia, ya que el As pasa a la leche materna (Xi et al. 2010).

Las crías hembra y macho de cada madre se destetaron al DPN 21. A esta edad fueron identificadas individualmente con un sistema de perforaciones en las orejas y se dividieron por género, de acuerdo al tratamiento, en jaulas nuevas. Las crías de ambos sexos fueron divididas en dos grupos: uno de ellos continuó recibiendo el mismo tratamiento que su madre (grupos A5-A5 y A50-A50) y el otro comenzó a beber agua destilada (A5-C y A50-C) hasta el día de su sacrificio (4 meses de edad). Las crías de las madres control continuaron recibiendo agua destilada.

En las **Figura 59** y **60** se ilustra un resumen del diseño experimental utilizado para las crías hembra y macho, respectivamente. Se registró el peso corporal (PC) de todas las crías al DPN 1, DPN 21 y luego del destete, una vez por semana.

Se evaluaron diferentes parámetros a distintas edades maduracionales, asignadas como neonatal (DPN 1), peripuberal (DPN 21 a 40) y adultez (DPN 60 en adelante). Los animales utilizados en cualquier grupo experimental pertenecen a 10 camadas diferentes. En cada camada había animales de todos los grupos experimentales.

A los cuatro meses de edad, los animales fueron pesados y sacrificados por la mañana a través de una rápida decapitación (en condiciones mínimas de estrés). Las hembras se sacrificaron en la mañana del estro. Se recolectó la sangre troncal, separando el suero por centrifugación y se disecaron y pesaron los ovarios, testículos e hipotálamos. Todas las muestras fueron guardadas a -20°C para determinaciones hormonales.

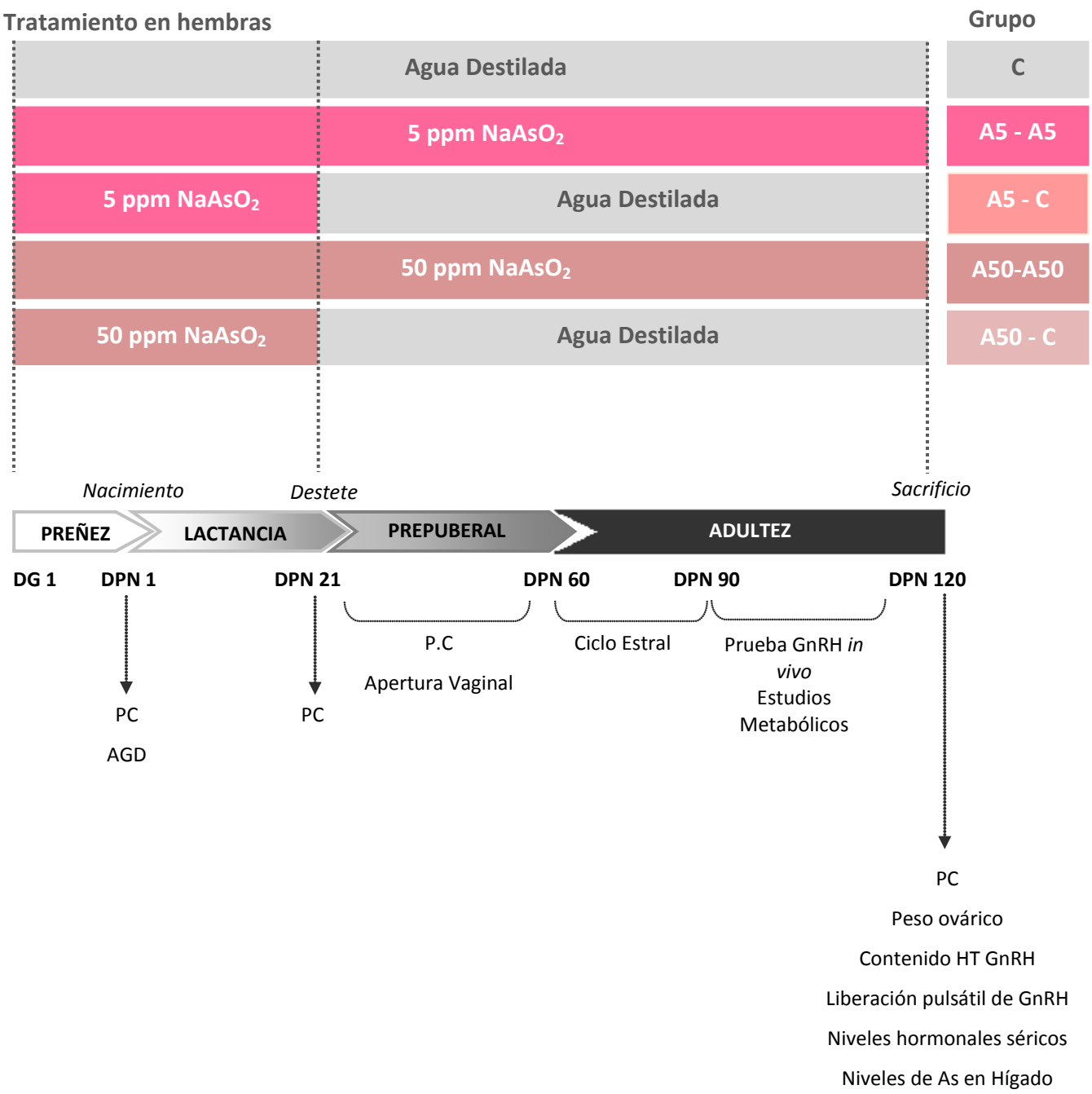



**Figura 59.** Ilustración del modelo experimental utilizado para crías hembra.

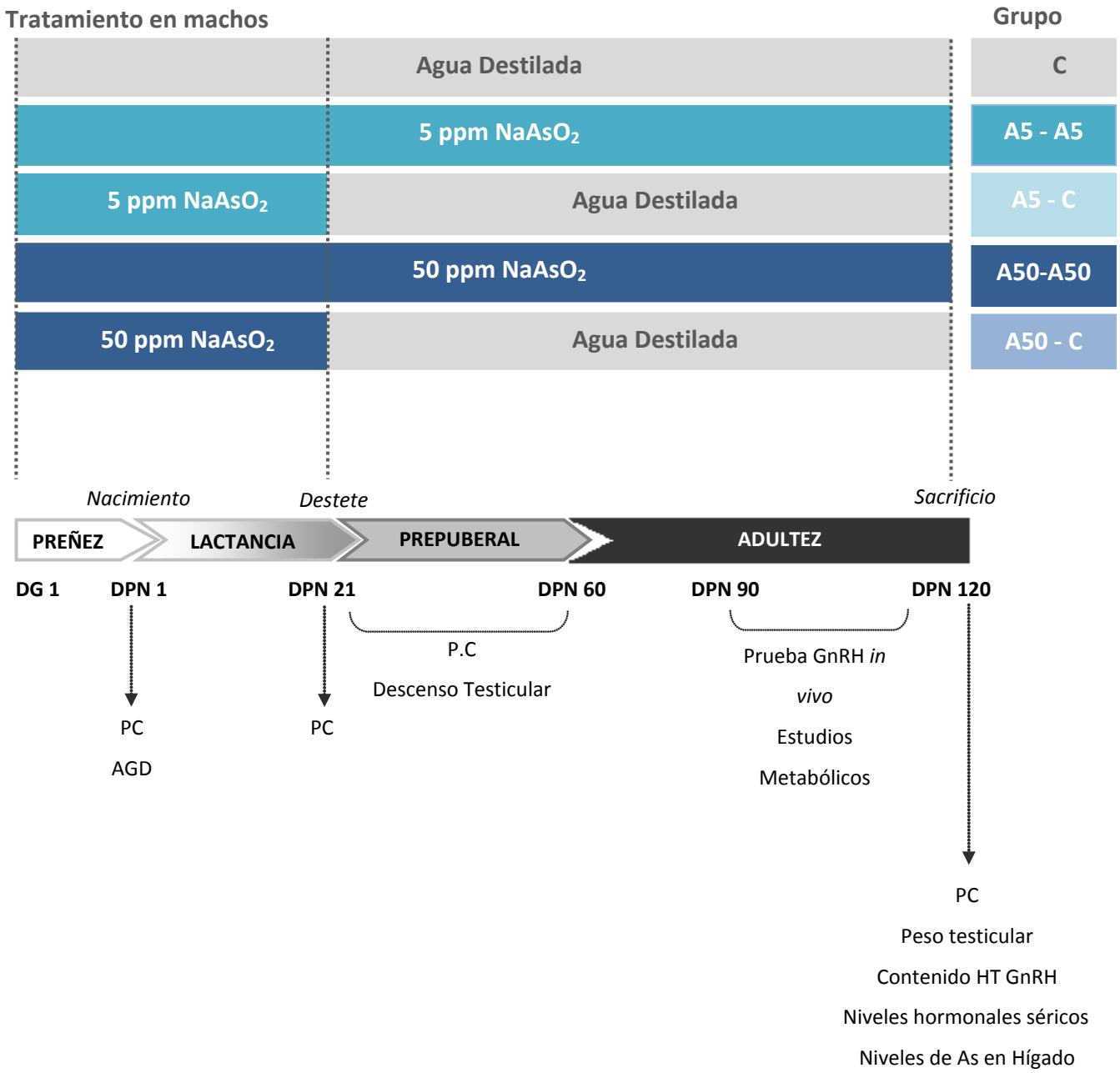



**Figura 60.** Ilustración del modelo experimental utilizado para crías machos.

## ESTUDIOS REPRODUCTIVOS

### MARCADORES DE DESARROLLO SEXUAL

#### DISTANCIA ANOGENITAL (AGD)

Se midió la distancia anogenital (AGD) utilizando un calibre en machos y hembras al día del nacimiento (DPN 1)(Pallares et al. 2013). Los resultados se expresan como la AGD en relación al peso corporal promedio para cada grupo experimental.

#### DESCENSO TESTICULAR (DT) Y APERTURA VAGINAL (AV)

Se registró el día y el peso en el cual los testículos descendieron por completo en las crías macho y las crías hembra abrieron vagina (Fernandez et al. 2009), como un indicador del inicio de la pubertad. El descenso testicular (DT) se define como el día en el cual ambos testículos descienden por completo en el saco escrotal y pueden ser palpados cuando se sostiene al macho verticalmente. La apertura vaginal (AV) se define como el día en el cual la vagina abre completamente al sostener a la hembra en posición de lordosis. En ambos casos se examinó diariamente a las crías comenzando en DPN 21. Los resultados se expresan como el día promedio en el cual hubo DT o AV para cada grupo experimental.

### CICLO ESTRAL

A los dos meses de edad, se evalúo el estadío del ciclo estral en las crías hembra durante un mes, examinando el frotis vaginal bajo un microscopio óptico. Luego se determinó el porcentaje de días en ciclos normales y en anestro. Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de días ciclando o en anestro, por tratamiento.

### NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDEAS

Al día de sacrificio (DPN 120), se determinaron los niveles séricos basales de $E_2$, $P_4$ y T en hembras y de T en machos por RIA, luego de una extracción con éter etílico tal como se describió previamente. También se midió el contenido ovárico de T. Los

resultados serán expresados como el nivel promedio hormonal para cada tratamiento. También se evaluó el contenido ovárico de los esteroides sexuales en las crías hembra.

### NIVELES DE HORMONAS PROTEICAS

Se determinaron los niveles séricos basales de LH, FSH, PRL por RIA en ratas de ambos sexos en la edad del sacrificio. Los detalles de estos protocolos fueron descriptos anteriormente en la tesis. Se mostrarán los resultados como el valor de la concentración promedio para cada tratamiento.

### CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE GNRH

Se midió el contenido hipotalámico de GnRH en crías de ambos sexos al DPN 120. Para ello los hipotálamos (HT) fueron pesados y homogenizados en HCl 0.1N. Se midieron los niveles de GnRH por RIA en los extractos obtenidos, tal como se describió en materiales y métodos generales. Los resultados se expresan como los niveles promedio de GnRH/HT.

### ESTUDIO DE LIBERACIÓN PULSÁTIL DE GNRH

En las crías hembras al sacrificio (en estro), se evaluó la liberación pulsátil de GnRH hipotálamico, tal como fue descripto en la sección de materiales y métodos generales. Se analizó la frecuencia de la pulsatilidad de GnRH secretado (pulsos de GnRH/hora), la masa de GnRH secretada/ pulso, el inntervalo inter-pulso, la duración y la amplitud del pico de GnRH para cada tratamiento.

### RESPUESTA HIPOFISARIA DE GNRH *IN VIVO*

Se determinó la respuesta hipofisaria *in vivo* a GnRH en crías hembra (en estro) y macho de DPN 90-120, tal como fue descripto por  y en materiales y métodos generales. En los sueros correspondientes a cada tiempo, se determinaron los niveles séricos de LH y FSH por RIA. Los resultados se expresan como los niveles hormonales promedio a lo largo del tiempo para cada tratamiento.

## ESTUDIOS METABÓLICOS

### TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (TTG)

A crías de ambos sexos de 90-120 días de edad se las sometió a un test de tolerancia a la glucosa (TTG). Brevemente, en ayunas se midieron los niveles de glucemia a distintos tiempos: 0, 30, 60, 90 y 120 min post-inyección de una sobrecarga de glucosa. Los resultados se expresan como glucemia a lo largo del tiempo.

### TEST DE TOLERANCIA A LA INSULINA (TTI)

Tal como fue descripto anteriormente, a crías de ambos sexos de 90-120 días de edad, con 2-4 hs de ayuno previas se les realizó un ITT. Brevemente, en ayunas se midieron los niveles de glucemia a distintos tiempos: 0, 30, 60, 90 y 120 min post-inyección de insulina. Los resultados se expresan como glucemia a lo largo del tiempo.

### NIVELES DE HORMONAS PROTEICAS

Se determinaron los niveles séricos basales de Insulina por RIA en ratas de ambos sexos en la edad del sacrificio. Los detalles de estos protocolos fueron descriptos anteriormente en la tesis. Se muestran los resultados como el valor sérico promedio para cada tratamiento.

### INDICE HOMA DE RESISTENCIA A INSULINA (HOMA-IR)

Calculamos el índice HOMA de resistencia a Insulina (HOMA-IR) en crías de ambos sexos de 90-120 días de edad previamente ayunadas.

## DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN HÍGADO

Muestras de hígados de crías hembra y macho fueron recolectados el día de su sacrificio (4 meses de edad) para la determinación del contenido de As total en este órgano. Este análisis lo llevo a cabo el laboratorio “Sistemas Analíticos - Ensayos y análisis químicos”, bajo la técnica mencionada previamente en la tesis. Los resultados son expresados como el promedio de niveles de As total por kg de tejido.

## II.D. RESULTADOS II

### PESO CORPORAL

Como mencionamos anteriormente, la exposición crónica a $As_i$ ha sido asociada a la pérdida del peso corporal y el tratamiento con el mismo redujo la ganancia de peso en las madres durante la preñez, como vimos en el capítulo anterior. Es por ello que evaluamos si la exposición a este metaloide produjo alteraciones también en las crías. Se registró el peso corporal al día del nacimiento, al destete y al mes y dos meses de edad.

Al DPN 1, machos y hembras A50 mostraron una disminución en el peso corporal comparado con sus pares control del mismo sexo, siendo más marcada esta diferencia para las crías macho (**Figura 61 A**). Esto fue seguido por una recuperación del peso al día del destete (DPN 21), dondese evidenció un aumento en el peso (**Figura 61 B**). Los animales A5 mostraron un incremento aún mayor a las crías control, en ambos sexos. Al mes y dos meses de edad estas diferencias desaparecieron (**Figura 62 A** y **B**).

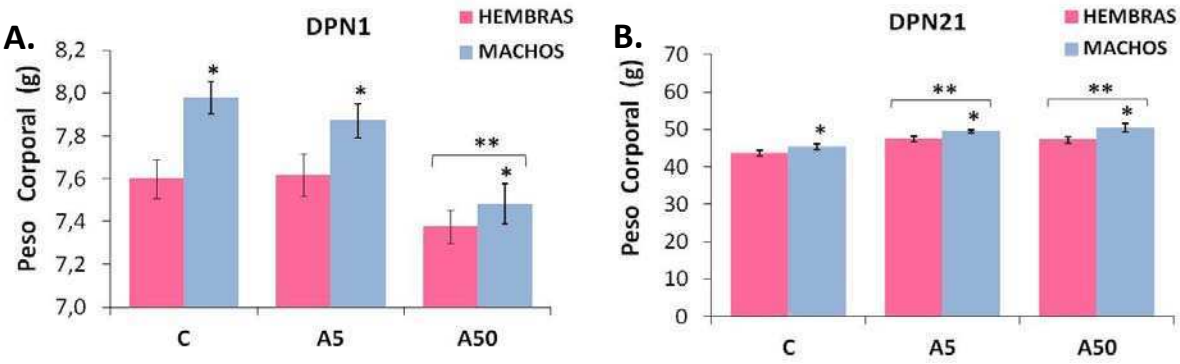



**Figura 61.** Efectos de la exposición a As en el peso corporal al DPN 1 (**A.**) y DPN 21 (**B.**) para crías hembra y macho. Los resultados se expresan como el peso corporal promedio (g) ± SEM. **A.** ANOVA de dos factores: interacción NS; efecto principal sexo *p<0.0005; efecto principal tratamiento p<0.00005: ** A50 vs. C and A5, p<0.005. n=55-63. **B.** ANOVA de dos factores: interacción NS; efecto principal sexo *p<0.005; efecto principal tratamiento p<0.00005: ** vs. C, p<0.00005. n=25-20.

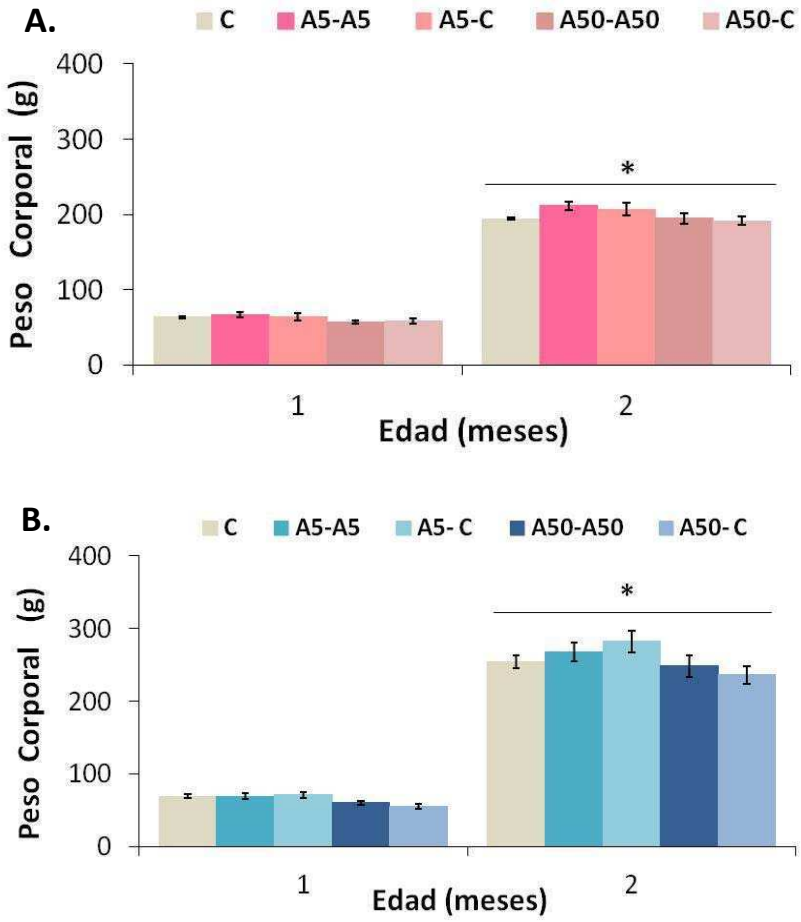



**Figura 62.** Efectos de la exposición a As en el peso corporal al mes 1 y 2 de edad para crías hembra (**A.**) y macho (**B.**). Los resultados se expresan como el peso corporal promedio (g) ± SEM. **A.** ANOVA de dos factores con medidas repetidas: interacción NS; efecto principal tratamiento NS; efecto principal edad: $p<0.00005$: * vs. 1 mes, $p<0.0005$. n=9-23. **B.** ANOVA de dos factores con medidas repetidas: interacción NS; efecto principal tratamiento NS; efecto principal edad $p<0.00005$: * vs. 1 mes, $p<0.0005$. n=8-25.

## ESTUDIOS REPRODUCTIVOS

### DISTANCIA ANOGENITAL

Debido a que gran parte del proceso de masculinización implica la acción de andrógenos y la principal fuente de estos esteroides es el testículo fetal, trastornos en alguno de los procesos de la masculinización andrógeno-dependiente pueden proporcionar una lectura de la función esteroidogénica testicular fetal. También cabe destacar que la masculinización del feto es sólo el primer paso, aunque el más

importante, hacia la formación de un fenotipo masculino ya que la producción/acción de andrógenos después del nacimiento, y sobre todo en la pubertad, también es esencial para que esto suceda.

Nos propusimos evaluar si la exposición a As desde el DG 1 afecta el desarrollo sexual en las crías. Esto resultó especialmente relevante dado que en las hembras preñadas habíamos detectado un aumente en los nivels de $E_2$ y T al DG 18. La medición de la distancia anogenital (AGD) es un método simple y no invasivo que permite evaluar la correcta diferenciación *in utero* de machos y hembras. Por lo tanto, se registró la medida de la AGD al día del nacimiento como un marcador del desarrollo sexual. Como los animales tratados con As presentaron diferencias en el peso corporal respecto al grupo control y esta descripto que la AGD varía con el peso, expresamos este parámetro relativizado al peso corporal de cada animal.

En las crías hembra, la exposición a 50 ppm de arsenito de sodio redujo significativamente la AGD al nacimiento en relación a las crías hembra control. En las crías macho, el As no modificó este parámetro (**Figura 63**).

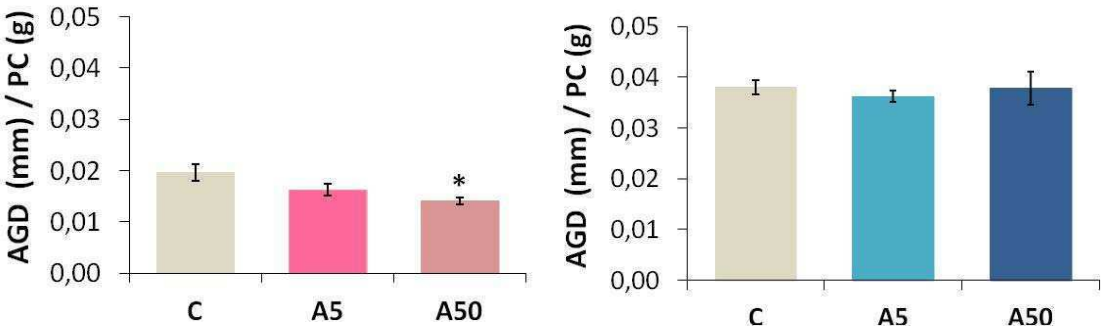



**Figura 63.** Efectos de la exposición a As en la distancia anogenital (AGD) al DPN 1, en crías hembra (*panel izquierdo*) y macho (*panel derecho*). Los resultados se expresan como la AGD promedio (mm) /P.C (g) ± SEM. ANOVA de un factor. *Panel izquierdo*: * vs. C, $p<0.05$. n=17-22. *Panel derecho:* NS. n=10-24.

## MARCADORES DE INICIO DE LA PUBERTAD

El inicio de la pubertad está relacionada con la reactivación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, y se manifiesta por un aumento en la frecuencia y la amplitud de los pulsos de GnRH en el hipotálamo, lo que conduce a un aumento en la secreción

pulsátil de LH y FSH. En las mujeres, esa maduración en la función neuroendócrina reproductiva finalmente conduce al comienzo de los ciclos menstruales ovulatorios. En los hombres, LH inicia la secreción de los andrógenos (testosterona y androstenediona) en las células de Leydig testiculares.

Tradicionalmente, el inicio puberal es evaluado en roedores como la edad del macho en la que se produce el descenso testicular (DT), un evento mediado por andrógenos, y, en hembras, la edad de la apertura vaginal (AV), un evento mediado por estrógenos. Por lo tanto, estos parámetros ofrecen la forma más sencilla y menos invasiva de determinar el correcto desarrollo del eje gonadotrófico fetal.

Los disruptores endócrinos pueden producir alteraciones en el inicio de la pubertad, por consiguiente, evaluamos los posibles efectos del As sobre el mismo, determinando la edad de la AV y del DT en crías hembra y macho, respectivamente. Como se puede observar en la **Figura 64**, la edad promedio de la AV no fue alterada por la exposición temprana a As, así como tampoco la edad del DT.

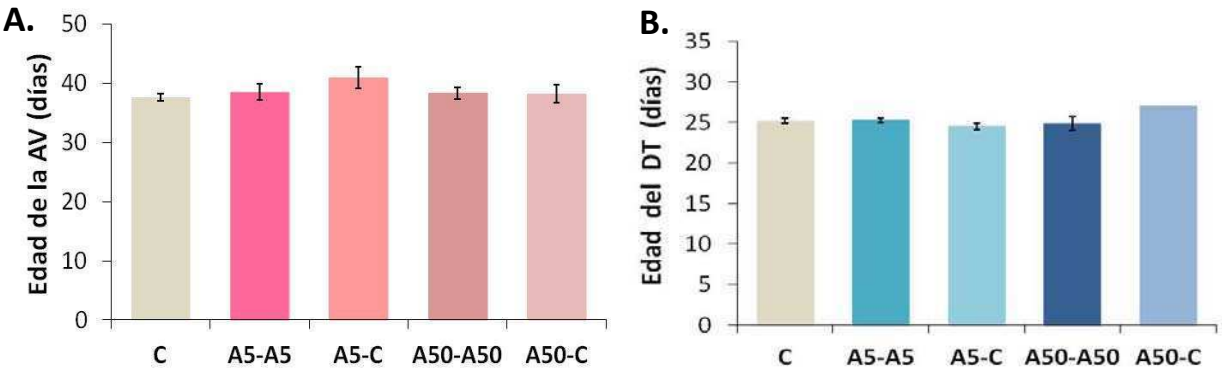



**Figura 64.** Efectos de la exposición a As en la edad de la apertura vaginal (VA) y del descenso testicular (DT), en crías hembra (**A.**) y macho (**B.**), respectivamente. Los resultados se expresan como la edad promedio (días) de AV o DT ± SEM. ANOVA de un factor. **A.**NS. n= 9-22. **B.** NS. n= 4-15.

## NIVELES SÉRICOS DE HORMONAS SEXUALES

Por otra parte determinamos los niveles séricos de las hormonas esteroideas sexuales, ya que son decisivas en el control del eje gonadotrófico, y numerosos

trabajos describen alteraciones en los niveles de los esteroides tras la exposición a As durante la adultez(Davila-Esqueda et al. 2012; Sarkar et al. 2003). La exposición a arsenito de sodio no alteró los niveles de $E_2$ ni de $P_4$ en las crías hembra una vez que alcanzaron la adultez. Sin embargo, elevados niveles de T fueron hallados en las crías A50-A50 respecto al grupo control (**Figura 65**).

En las crías macho adultas expuestas a la mayor dosis de As (A50-A50) hay una leve tendencia a presentar mayores niveles de T, sin embargo no se alacanzó una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tratamientos (**Figura 66**).

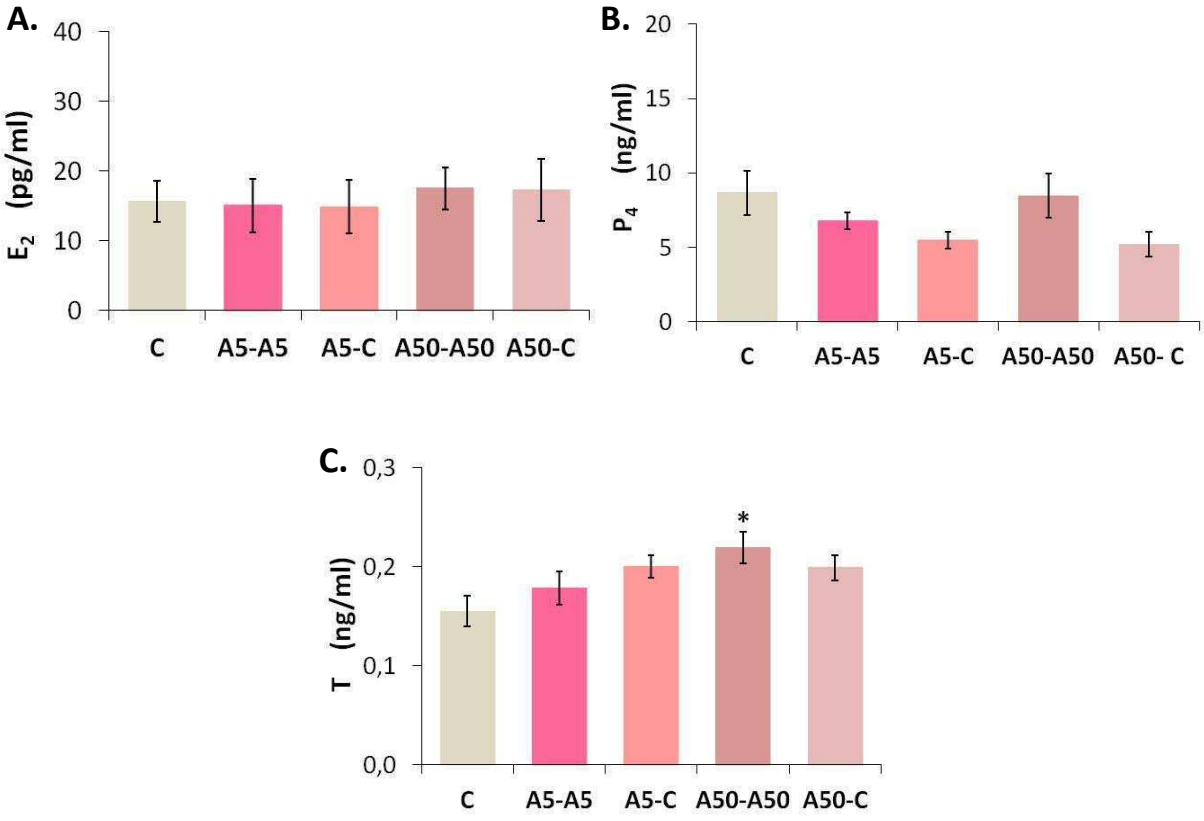



**Figura 65.** Efectos de la exposición a As en los niveles séricos basales de $E_2$ (**A.**), $P_4$ (**B.**) y T (**C.**) en crías hembra adultas. Los resultados se expresan como los niveles promedio de cada hormona esteroidea (ng/mL) ± SEM. ANOVA de un factor. **A.** NS. n=9-22. **B.** NS. n=9-22. **C.** * vs. C, p‹0.05. n=10-21.

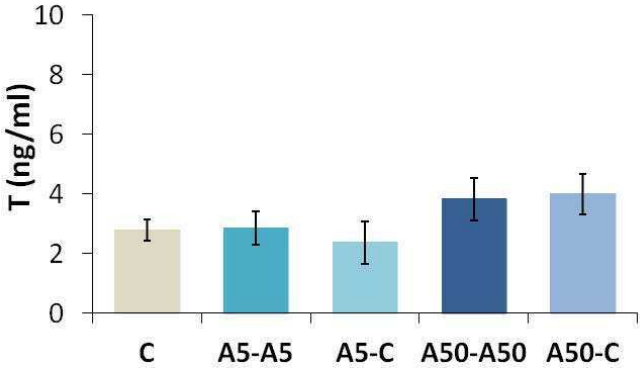



**Figura 66.** Efectos de la exposición a As en los niveles séricos basales de T en crías macho adultas. Los resultados se expresan como los niveles promedio de T (ng/mL) ± SEM. ANOVA de un factor. NS. n=8-25.

## NIVELES SÉRICOS DE GONADOTROFINAS

La T regula la síntesis y secreción de las gonadotrofinas. Como la exposición a As elevó los niveles de T en las hembras y, levemente, en machos, se midieron los niveles séricos basales de las LH y FSH.

En las crías hembra, los niveles de FSH basales se hallaron aumentados en los grupos A50-A50 y A50-C (**Figura 67 B**), mientras que en los machos esta hormona esta disminuida en los animales que corresponden al mismo tratamiento (**Figura 67 D**). En contraste, los niveles séricos basales de LH no difirieron entre los diferentes tratamientos de cada sexo (**Figura 67 A Y C**).

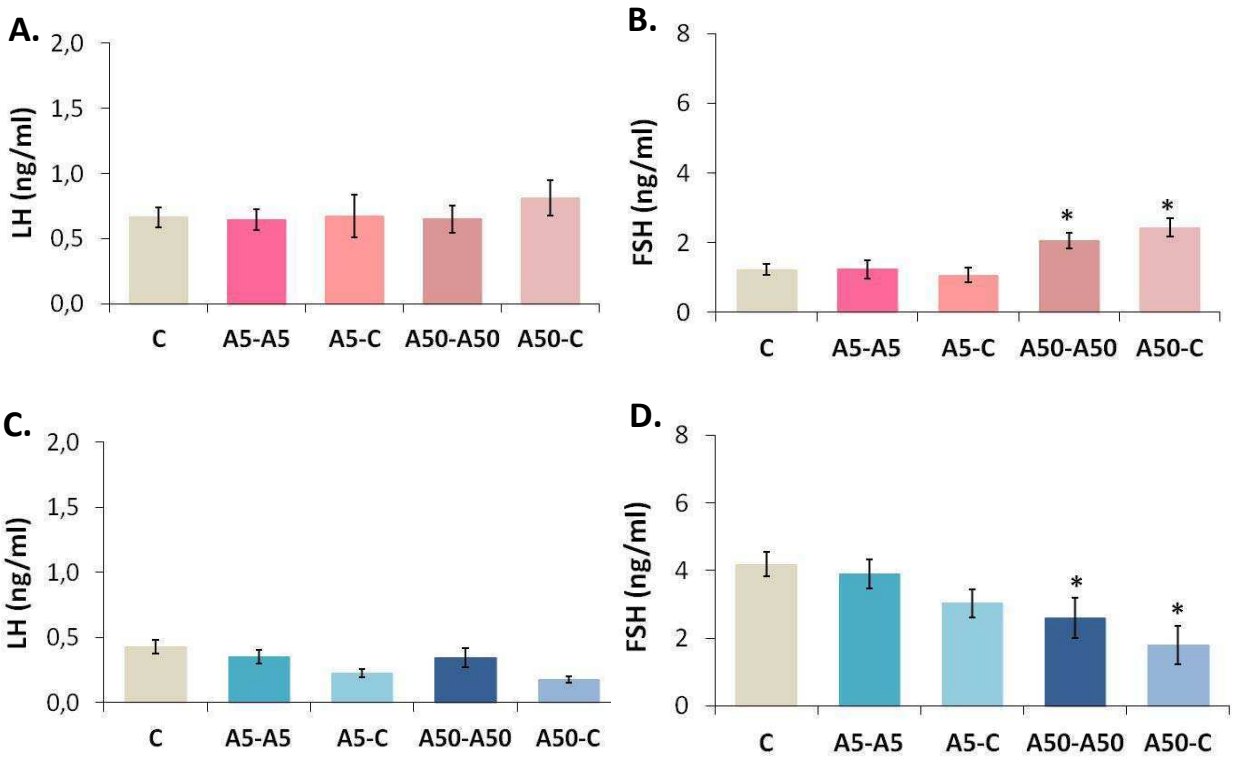



**Figura 67.** Efectos de la exposición a As en los niveles séricos basales de LH (**A., C.**) y FSH (**B. D.**) en crías hembra (panel superior) y macho (panel inferior) adultas. Los resultados se expresan como los niveles promedio de las gonadotrofinas (ng/mL) ± SEM. ANOVA de un factor. **A.** NS. n= 7-22. **B.** * vs. C, p‹0.05. n=9-22.**C.** NS. n= 4-15. **D.*** vs. C, p‹0.05 n=4-15.

## PESO GONADAL

Al sacrificio (4 meses de edad), las gónadas de las crías de los diferentes tratamientos fueron disecadas y pesadas. Si bien los animales expuestos a As no presentan alteraciones en el peso corporal a esta edad, encontramos que las crías A5-A5 tienen mayor peso ovárico (**Figura 68**). Sin embargo, no registramos diferencias entre grupos en el peso testicular.

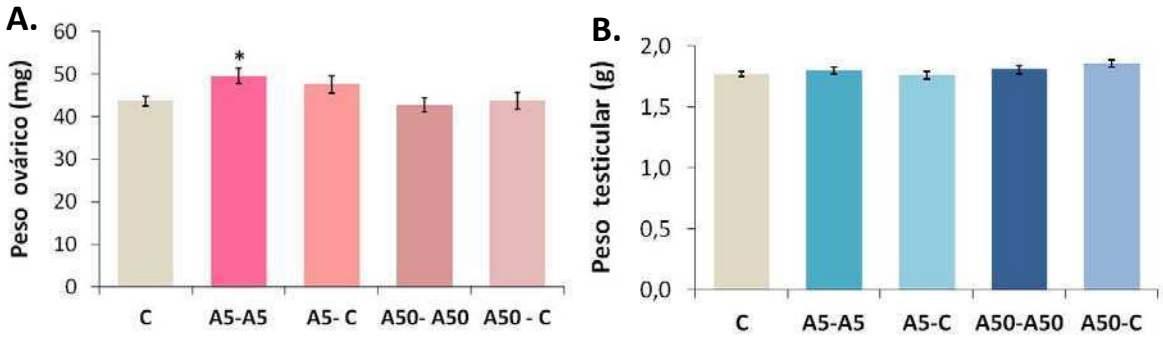



**Figura 68.** Efectos de la exposición a As en el peso ovárico (**A.**) y testicular (**B.**) de crías hembra y macho respectivamente. Los resultados se expresan como el peso promedio gonadal (mg) ± SEM. ANOVA de un factor. **A.** *vs. C, p‹0.05. n=9-21. **B.**NS. n=4-15.

## CONTENIDO OVÁRICO DE ESTEROIDES SEXUALES

Debido a las alteraciones encontradas en los niveles séricos de T en las crías hembra expuestas a As, evaluamos el contenido de esta hormona en el ovario a fin de evaluar la procedencia del mismo.

A diferencia de los valores de T séricos obtenidos, no encontramos diferencias entre tratamientos en el contenido ovárico de esta hormona (**Figura 69**).

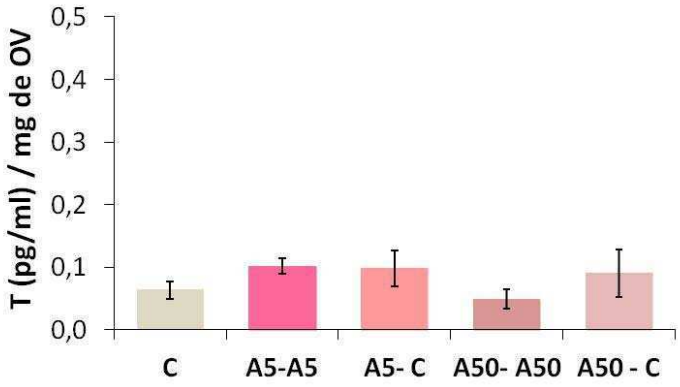



**Figura 69.** Efectos de la exposición a As en el contenido ovárico de Testosterona de crías hembra. Los resultados se expresan como el contenido ovárico promedio de T (pg/mL) / mg de tejido ± SEM. ANOVA de un factor. NS. n=9-10.

## CICLO ESTRAL

Debido a las alteraciones encontradas en los niveles séricos de FSH y T en las crías expuestas a As, decidimos evaluar si estas alteraciones afectaban la correcta ciclicidad de las hembras. La **Figura 70** muestra el porcentaje de días que permanecieron con ciclos normales o en anestro. A diferencia de sus madres, no se observaron en las crías irregularidades en el ciclo estral luego de la exposición a As.

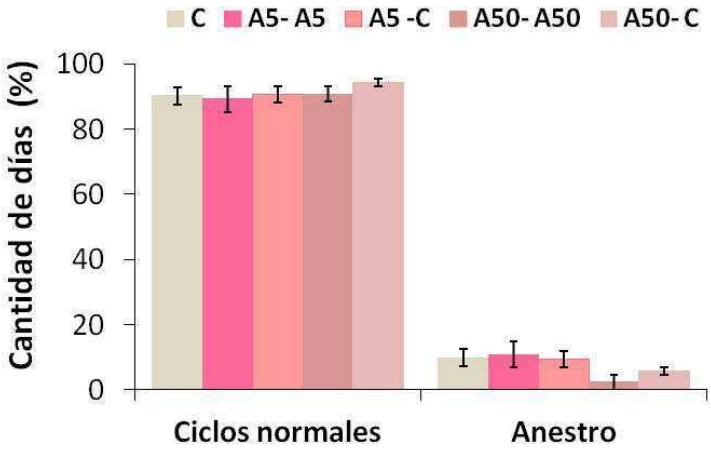



**Figura 70.** Efectos de la exposición a As en el ciclo estral de crías hembra. Los resultados se expresan como la cantidad de días promedio (%) en anestro o ciclando ± SEM. Chi Cuadrado. NS. n= 8-21.

## CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE GNRH

Como mencionamos previamente en esta tesis, la liberación de las gonadotrofinas está regulada por la cantidad liberada en forma pulsátil de GnRH. La exposición a As desde la gestación, alteró los niveles basales de FSH, por lo que decidimos evaluar el contenido hipotalámico del decapéptido, para tener una aproximación acerca del funcionamiento de esta área cerebral.

En las crías hembra expuestas a la dosis mayor de As se observa un mayor contenido de GnRH en el hipotálamo respecto a los animales control, logrando una significancia estadística únicamente para grupo A50-A50 (**Figura 71 A**), mientras que ya no se observa si comienzan a beber agua destilada luego del destete (A50-C) .

En las crías macho A5-A5 y A50-A50/ A50-C la cantidad de GnRH hipotalámica se encuentra reducida. Similar a lo que ocurre en las hembras, esta alteración deja de

evidenciarse si los machos A5 comienzan a consumir agua destilada luego del destete (A5-C) (**Figura 71 B**).

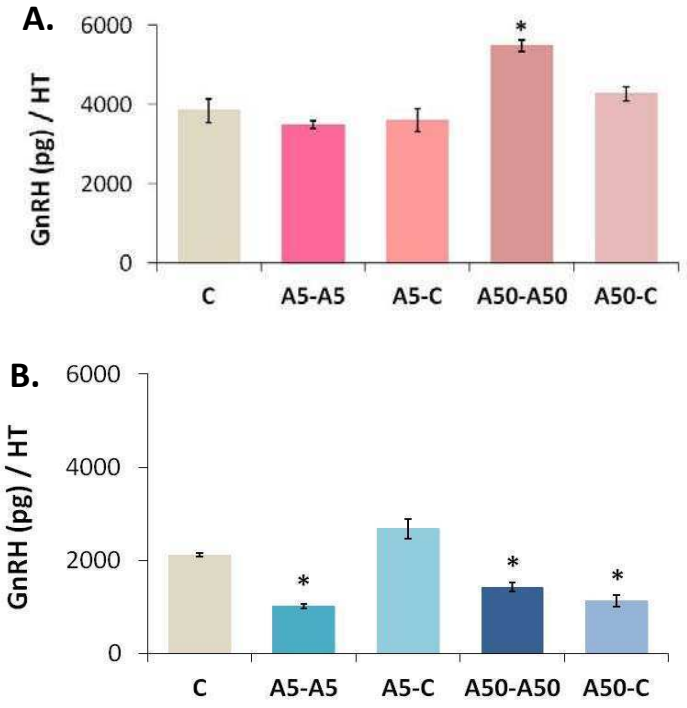



**Figura 71.** Efectos de la exposición a As en el contenido hipotalámico de GnRH en crías hembra (**A.**) y macho (**B.**). Los resultados se expresan como los niveles promedio de GnRH (ng/mL)/ hipotálamo (HT) ± SEM. ANOVA de un factor. **A.** * vs. todos los tratamientos, $p<0.05$. n=9-20. **B.** * vs. C, $p<0.05$. n=8-25.

## EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN PULSÁTIL DE GNRH

Para tener una visión más fisiológica, procedimos a evaluar la actividad pulsátil de GnRH a partir de explantos hipotalámicos incubados *in vitro* en crías hembra de los distintos tratamientos a los 4 meses de edad. En la **Figura 72** se observan de forma representativa, los perfiles de secreción obtenidos para cada tratamiento.

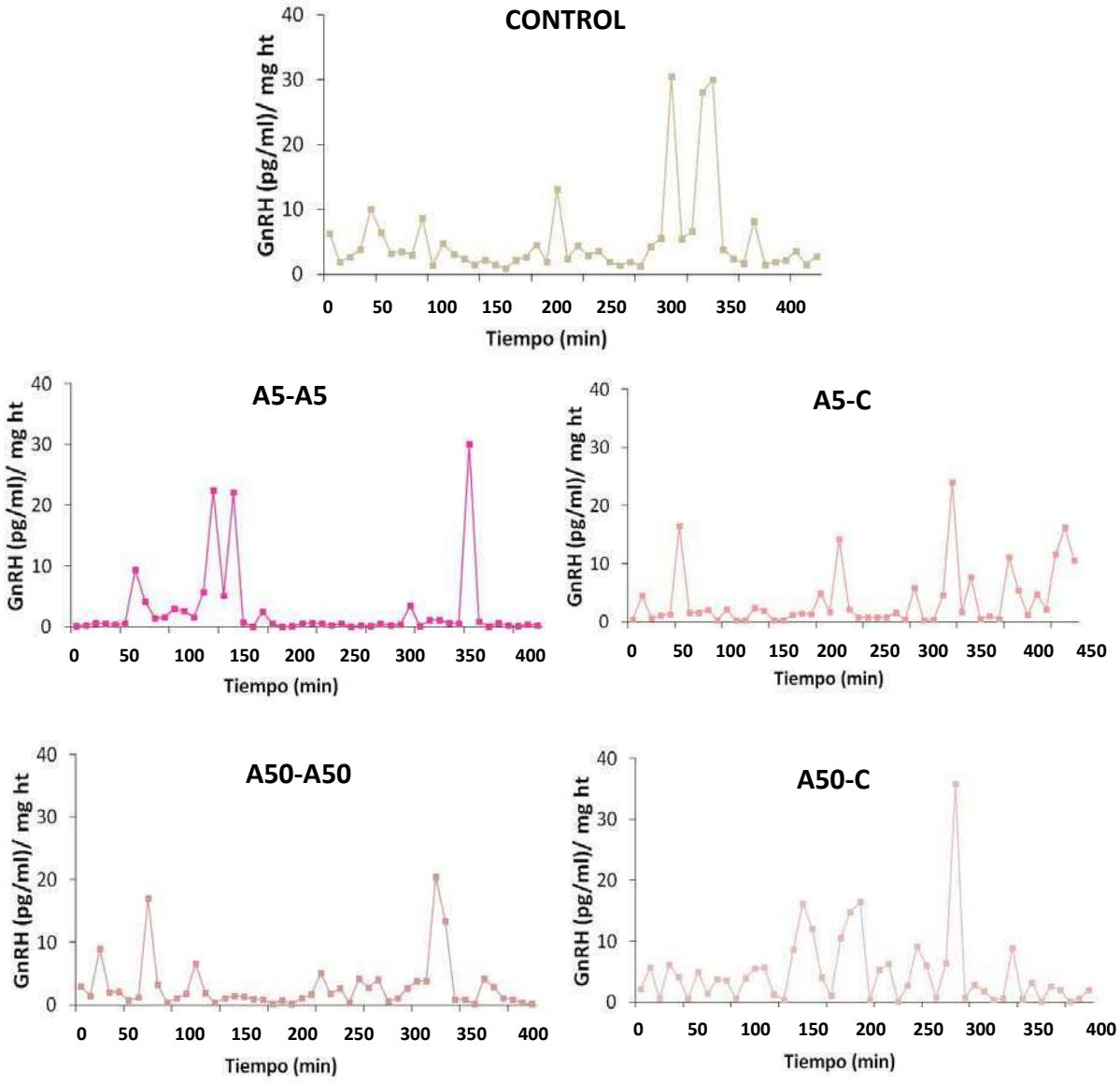



**Figura 72.** Efectos de la exposición a As en la liberación pulsátil de GnRH de crías hembra en la adultez (4 meses). Perfiles representativos de la secreción pulsátil de GnRH (pg/mg HT) a lo largo del tiempo (min), a partir de explantos hipotalámicos incubados *in vitro*.

La frecuencia de secreción pulsátil (cantidad de pulsos/hora) de GnRH fue similar entre tratamientos. Sorpresivamente, a diferencia del contenido hipotalámico, la masa de GnRH secretada por pulso no mostró diferencias significativas entre tratamientos (**Figura 73**). No se encontraron alteraciones tras la exposición a As en los otros

parámetros analizados: intervalo inter-pulso, duración del pico de GnRH o amplitud del mismo (**Figura 73**).

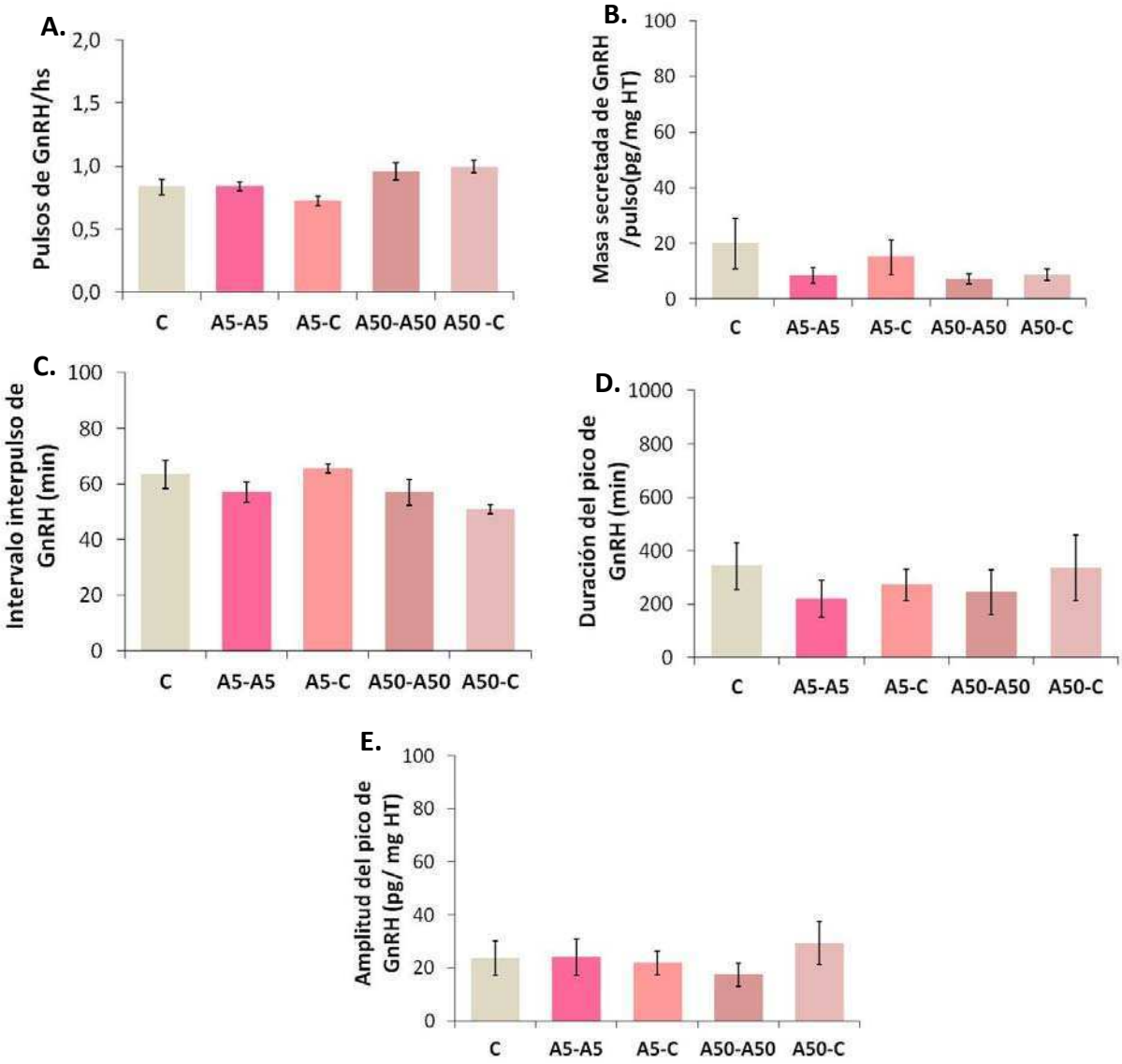



**Figura 73.** Efectos de la exposición a As en la liberación pulsátil de GnRH en crías hembra adultas (4 meses). N= 6-8. **A.** Frecuencia de la pulsatilidad de GnRH secretado (pulsos de GnRH/hora). ANOVA de un factor. NS. **B.** Masa de GnRH secretada/ pulso (pg/ mg de HT). ANOVA de un factor. NS. **C.** Intervalo inter-pulso (min). ANOVA de un factor. NS. **D.** Duración del pico de GnRH (min). ANOVA de un factor. NS. **E.** Amplitud del pico de GnRH (pg/ mg de HT). ANOVA de un factor. NS.

## RESPUESTA HIPOFISARIA A GNRH *IN VIVO*

Al igual que en las madres, quisimos determinar si la exposición crónica a As modifica la respuesta hipofisaria a GnRH. En las **Figuras 74** y **75** se muestran los niveles de LH y FSH en respuesta a la estimulación con GnRH a lo largo del experimento, para crías macho y hembra respectivamente.

La mayor dosis de As alteró la respuesta hipofisaria a GnRH en las crías macho. Tras la estimulación con GnRH, los niveles de LH incrementan en todos los grupos a los 15 min post-inyección de GnRH in vivo (**Figura 74 A**). Pasados los 50 min de estimulación, LH se mantiene elevada solo en los animales expuestos todo el tiempo a 50 ppm de As.

Por otra parte la liberación de FSH inducida por GnRH fue menor en las crías macho expuestas a la mayor dosis de As, ya sea los que permanecieron expuestos al disruptor como los que luego del destete dejaron de estarlo (**Figura 74 B**).

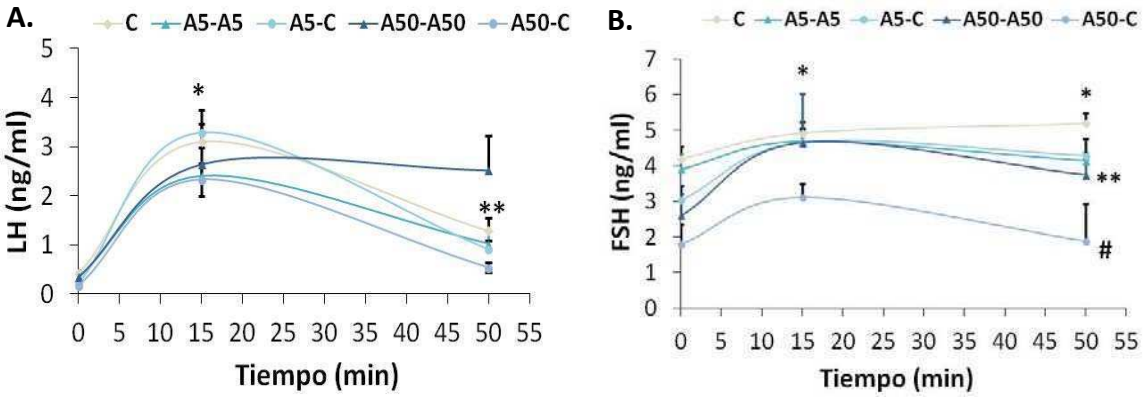



**Figura 74.** Efectos de la exposición a As en la respuesta hipofisaria a GnRH in vivo. Niveles de LH (**A.**) y FSH (**B.**) en crías macho. Los resultados se expresan como los niveles promedio de las gonadotrofinas (ng/mL) ± SEM. ANOVA de dos factores con medidas repetidas. **A.** interacción $p<0.005$: *vs. tiempo 0 para todos los tratamientos, $p<0.0005$; ** vs. tiempo 0 y 15, para todos los tratamientos menos A50-A50 and A50-Ctrl, $p<0.0005$. n=4-15. **B.** Interacción NS, efecto principal tratamiento $p<0.05$; efecto principal tiempo $p<0.005$. *vs. tiempo 0 para todos los tratamientos, $p<0.005$. **A50-A50 vs. C, $p<0.05$, # A50-C vs. todos los tratamientos, $p<0.05$, n=4-15.

A diferencia de las alteraciones encontradas en las crías macho, tras la exposición a arsenito la liberación de las gonadotrofinas en respuesta a GnRH no fue modificada en las crías hembra (**Figura 75**), si bien se observan loa niveles basales aumentados en los grupos A50-A50 y A50-C.

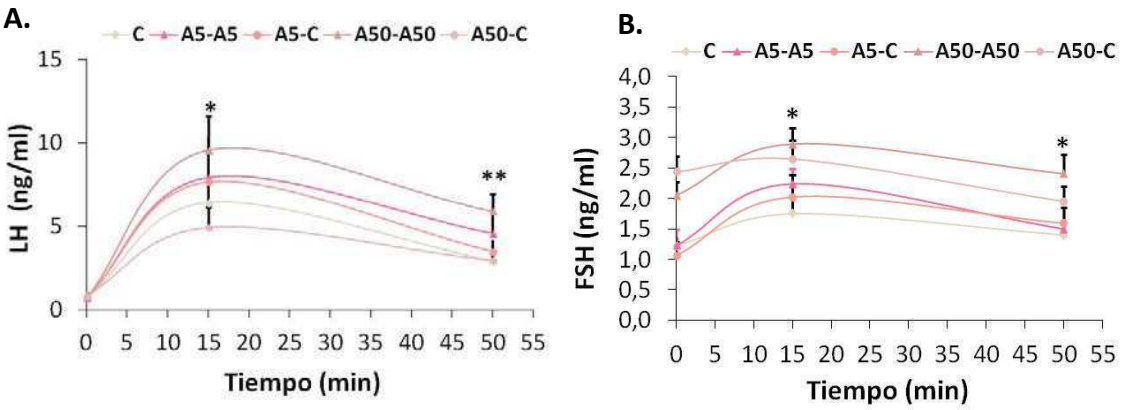



**Figura 75.** Efectos de la exposición a As en la respuesta hipofisaria a GnRH in vivo. Niveles de LH (**A.**) y FSH (**B.**) en crías hembra. Los resultados se expresan como los niveles promedio de las gonadotrofinas (ng/mL) ± SEM. ANOVA de dos factores con medidas repetidas. **A.** Interacción NS; efecto principal tratamiento NS; efecto principal tiempo p<0.0005. * vs. tiempo 0, p<0.00005; **vs. tiempo 0 y 15 para todos los tratamientos, p<0.0005. n=7-22. **B.** Interacción NS; efecto principal tratamiento NS; efecto principal tiempo p<0.0005. * vs. tiempo 0 para todos los tratamientos, p<0.00005. n=9-22.

## NIVELES SÉRICOS DE PROLACTINA

Por otra parte, se determinaron los niveles séricos de PRL en las crías hembra de todos los tratamientos. El tratamiento con As no afectó el nivel de esta hormona en sangre: **C**: 14.93 ± 2.60; **A5-A5**: 12.42 ± 4.44; **A5-C**: 16.67 ± 1.99; **A50-A50:** 10.18 ± 2.20; **A50-C:** 11.03 ± 2.38. ANOVA de un factor (PRL (ng/mL) ± SEM. ANOVA de un factor. NS. n=8-22).

## PESO DE LA GLÁNDULA ADRENAL

La glándula adrenal sintetiza y secreta, además de glucocorticoides y mineralocorticoides, andrógenos. La exposición a la mayor dosis de As aumentó los niveles séricos de T (principalmente en hembras), sin modificarse el contenido ovárico de esta hormona. Siendo, entonces, la glándula adrenal una fuente de andrógenos, también se evaluó el peso de la de la misma en las crías de ambos sexos. Al igual que en las madres, no se encontraron diferencias entre tratamientos ni en hembras ni en machos (**Figura 76)**.

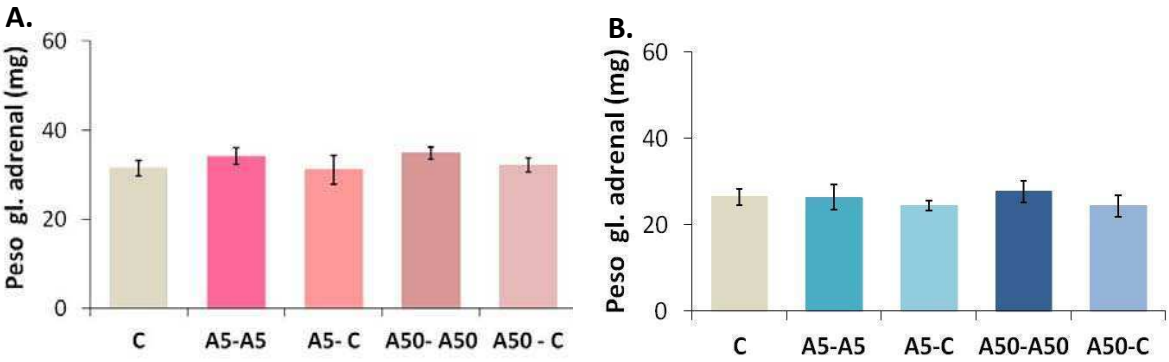



**Figura 76.** Efectos de la exposición a As en el peso de la glándula adrenal en crías hembra (**A.**) y macho (**B.**). Los datos son expresados como el peso promedio (mg) ± ES. **A.** ANOVA de un factor. NS. n= 10-11. **B.** ANOVA de un factor. NS. n= 10-11.

## ESTUDIOS METABÓLICOS

Varios trabajos postulan una fuerte interrelación entre la exposición a As y efectos en el metabolismo, pero muy pocos lo evalúan en animales expuestos desde la etapa gestacional. Crías macho y hembra de los diferentes grupos experimentales fueron sometidas a un TTG y a un TTI, a los dos meses de edad aproximadamente. También se determinaron los niveles de Insulina y glucemia en ayunas, y el HOMA-IR asociado.

## TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (TTG)

En la **Figura 77 A** (hembras) y **B** (machos) pueden observarse los resultados obtenidos. En nuestro modelo el As no afectó la tolerancia a la glucosa. Todos los grupos de ambos sexos exhibieron el característico pico rápido en la glucemia dentro de los 30 min posteriores a la carga de glucosa, seguido por una caída gradual de la misma aproximándose a los niveles basales a los 90 min.

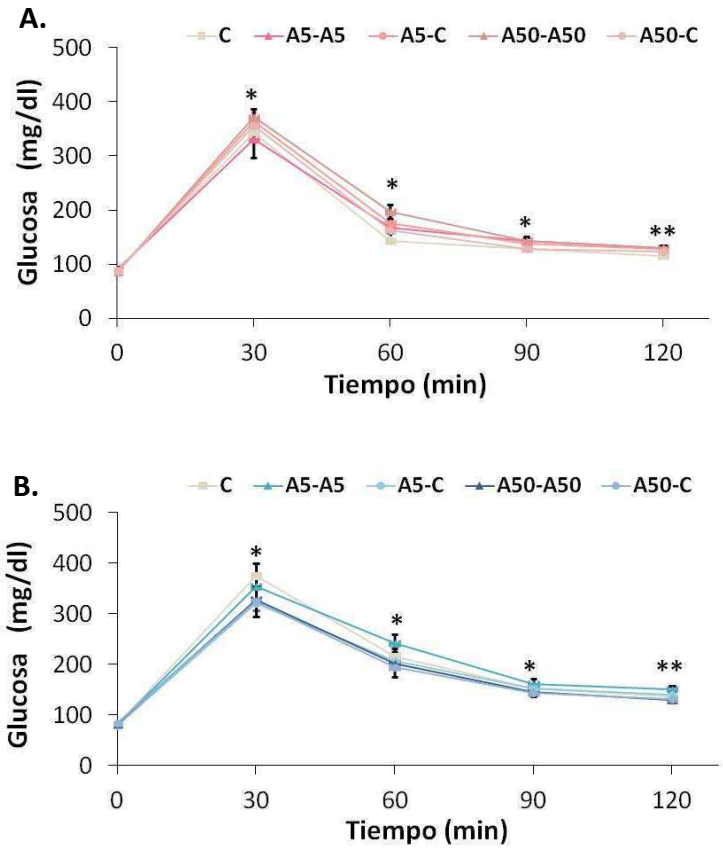



**Figura 77.** Efectos de la exposición a As en el TTG de crías hembra (**A.**) y macho (**B.**). Los resultados se expresan como el nivel promedio de glucemia (ng/mL) ± ES a lo largo del tiempo (min). ANOVA de dos factores con medidas repetidas. **A.** Interacción $p<0.05$; efecto principal tratamiento NS; principal tiempo $p<0.00005$: * vs. tiempo 0 para todos los tratamientos, $p<0.05$; ** vs. tiempo 0 y 60 para todos los tratamientos excepto el C, $p<0.05$. n=8-14. **B.** Interacción $p<0.05$; efecto principal tratamiento NS; efecto principal tiempo $p<0.00005$: * vs. tiempo 0 para todos los tratamientos, $p<0.05$; ** vs. tiempo 0 y 90 para todos los tratamientos excepto para A50-A50, $p<0.05$. n=10-14.

## TEST DE TOLERANCIA A LA INSULINA (TTI)

En la **Figura 78** se pueden observar los resultados obtenidos para el TTI. La exposición a As tampoco modificó el TTI, sin encontrar diferencias entre grupos en los títulos basales o en los mínimos niveles de glucosa alcanzados.

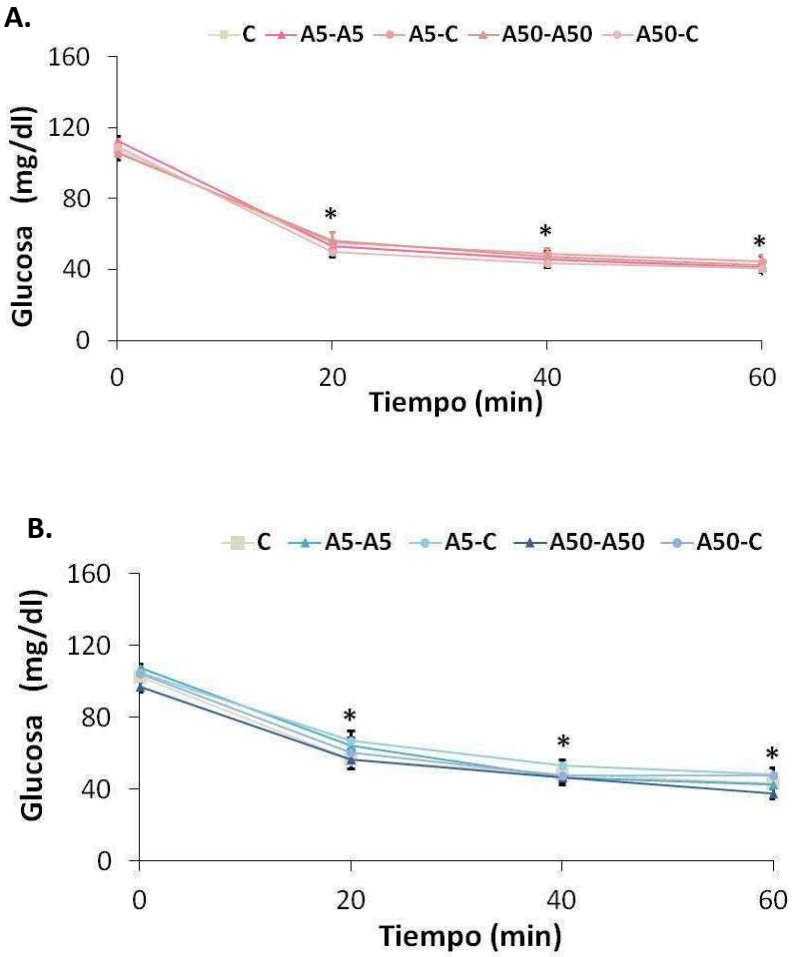



**Figura 78.** Efectos de la exposición a As en el TTI de crías hembra (**A.**) y macho (**B.**). Los resultados se expresan como el nivel promedio de glucemia (ng/mL) ± ES a lo largo del tiempo (min). ANOVA de dos factores con medidas repetidas. **A.** Interacción NS; efecto principal tratamiento NS; efecto principal tiempo $p<0.00005$: * vs. tiempo 0 para todos los tratamientos, $p<0.05$. n=7-14. **B.** Interacción NS; efecto principal tratamiento NS; efecto principal tiempo $p<0.00005$: * vs. tiempo 0 para todos los tratamientos, $p<0.05$. n=10-14.

## INSULINEMIA Y GLUCEMIA EN AYUNO – HOMA-IR

En la **Tabla 2**, se encuentran los niveles de Insulina y glucosa sérica de las crías de ambos sexos en ayunas, obtenidos a partir del suero recolectado en el tiempo 0 del TTG. A partir de estos valores también se calculó el índice HOMA-IR para cada grupo. La exposición a As no produjo ninguna alteración en ninguno de los parámetros evaluados.

**Tabla 2.** Efectos de la exposición a As en los niveles séricos de glucosa e insulina en ayunas. Cálculo del HOMA-IR.

| | Hembras | | | Machos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Tratamiento | Glucemia (mg/dL) | Insulina (ng/mL) | HOMA-IR | Glucemia (mg/dL) | Insulina (ng/mL) | HOMA-IR |
| C | 89.31±2.22 | 0.34±0.02 | 1.84±0.10 | 79.36±2.27 | 0.56±0.03 | 2.73±0.15 |
| A5-A5 | 90.88±4.40 | 0.38±0.06 | 2.10±0.28 | 79.09±3.00 | 0.49±0.06 | 2.45±0.36 |
| A5-C | 87.70±4.50 | 0.37±0.04 | 1.93±0.20 | 78.40±2.99 | 0.60±0.14 | 3.00±0.83 |
| A50-A50 | 85.79±2.79 | 0.43±0.05 | 2.26±0.24 | 81.15±4.36 | 0.41±0.04 | 1.98±0.20 |
| A50-C | 86.54±4.18 | 0.44±0.03 | 2.41±0.29 | 83.46±3.51 | 0.63±0.11 | 3.16±0.51 |

Niveles séricos de glucosa, insulina y HOMA-IR: ANOVA de un factor. NS en todos los casos. Hembras: 8-14 y Machos: 10-14 animales por grupo.

## CONTENIDO DE ARSÉNICO TOTAL EN HÍGADO

Al momento del sacrificio, se recolectaron muestras de hígados de crías control, A5-A5 y A50-A50 de ambos sexos para determinar el contenido de As total en los mismos. El tratamiento crónico con arsenito produjo un incremento en la concentración de As, exhibiendo un incremento de 10 veces solo en el grupo A50. Aunque no haya alcanzado significancia estadística, el grupo A5 presenta niveles detectables de As. Estas diferencias respecto a las crías control son en efecto, subestimadas, ya que todas

las muestras control presentan niveles de As por debajo del límite de detección de la técnica (**Figura 79**).

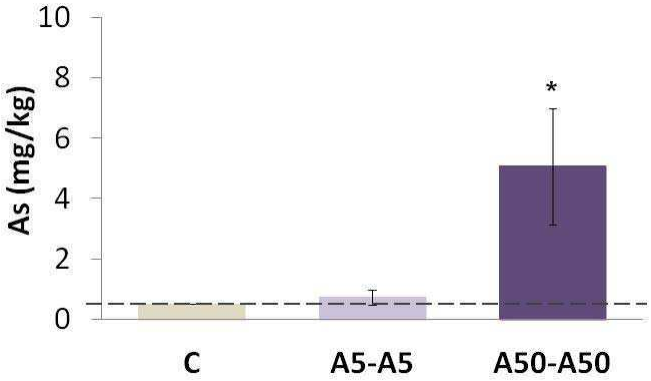



**Figura 79.** Contenido de As total en el hígado de crías al sacrificio (4 meses de edad). Los resultados se expresan como el contenido promedio de As (mg/kg) ± ES. La línea punteada corresponde al límite de detección de la técnica: 0.05 mg/kg. ANOVA de un factor. * vs. C y A5-A5, p‹ 0.005. n=10-16.

## II.E. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES II

En este capítulo evaluamos los efectos de la exposición a arsenito de sodio (5 o 50 ppm) desde la concepción hasta la adultez o desde la concepción hasta el destete en ratas Sprague Dawley.

Las concentraciones de As total que encontramos en el hígado, son comparables a los niveles detectados por otros autores en hígados de crías rata expuestas a dosis similares de arsenito de sodio en el agua de bebida durante la gestación y la lactancia (Pineda et al. 2013). El contenido de As en el hígado fue significativamente mayor, alcanzando niveles 5.07 mg/kg solo en el grupo expuesto a 50 ppm de arsenito de sodio. En el grupo A5-A5 se hallaron niveles de As total porm encima del límite de detección, pero estadísticamente similares a los grupos control, lo cual indicaría que al menos en el hígado de las crías, el As se acumula sólo cuando se ingieren a grandes dosis. Xi y col. encontraron niveles similares de contenido de As en hígado de crías de ratas Wistar expuestas a 50 ppm de arsenito de sodio desde el DG 7 hasta el DPN 41. Estos mismos autores describen que las crías expuestas a 10 ppm de arsenito de sodio presentan niveles de As en hígado similares al grupo control. Por otro lado, muestras de hígado humano que desarrollaron hepatomegalia como resultado de beber agua con 0.22 a 2 ppm de As contienen desde 0.5 a 6 mg de As/kg de peso de tejido seco, valores similares a los obtenidos en las crías de este modelo experimental.

Las crías expuestas a 50 ppm de arsenito de sodio de ambos sexos presentaron bajo peso corporal al nacimiento. Esto fue seguido por una recuperación al destete, momento en el cual un incremento en peso corporal se observó respecto a los animales control. Además, a esta edad, las crías expuestas a 5 ppm mostraron mayor peso corporal que sus pares control. De todas formas, a los dos meses de edad las ratas tratadas con As normalizan su peso corporal a valores similares a los animales control. Tal como ha sido descripto en estudios de toxicidad reproductiva, el peso corporal de las crías varía ampliamente en función de la toxicidad materna o neonatal (Bezek et al. 2008). Nuestros resultados son consistentes con trabajos previos donde se muestra bajo peso al nacimiento de crías expuestas a As *in utero* (Petrick et al. 2009). A su vez, un aumento en la frecuencia de bajo peso al nacimiento fue observado

en hijos de mujeres expuestas a altos niveles de As comparado con hijos de mujeres pertenecientes a áreas no contaminadas.

La medición de la distancia anogenital (AGD) es un método simple y no invasivo que permite evaluar la correcta diferenciación *in utero* de machos y hembras. En neonatos la medida de la AGD está determinada por la exposición prenatal a andrógenos, quienes estimulan el crecimiento del perineo causando una distancia mayor. Por ende la AGD es mayor en machos que en hembras en roedores (Gray et al. 2001; Wolf, Jr. et al. 1999) y en seres humanos (Salazar-Martinez et al. 2004; Thankamony et al. 2009) y puede variar con el peso corporal. En este capítulo, demostramos que la exposición temprana a As altera la diferenciación sexual en el roedor: las crías hembra expuestas a 50 ppm de As presentaron disminuido la AGD al día del nacimiento, sugiriendo un efecto de "hiper-feminización", sin encontrar diferencias en las crías macho. De nuestro conocimiento, ésta es la primera vez que se describe un efecto sobre la AGD por la exposición a As. Generalmente, este punto ha sido más estudiado en relación a la feminización del macho que por la hiper- feminización o masculinización de la hembra. Se sabe que hembras expuestas a andrógenos se masculinizan (incrementan su AGD a una medida normal para macho) (Wolf et al. 2002). En la mayoría de los estudios de exposición a compuestos anti-androgénicos, usualmente estos compuestos no alteran la AGD(Christiansen et al. 2013; Hotchkiss et al. 2004); mientras que la exposición a compuestos estrogénicos incrementan los valores de AGD (Mandrup et al. 2013). Interesantemente, Christiansen y col. describieron en un estudio muy reciente que la exposición a bajas dosis de otro disruptor endócrino, el Bisfenol A (BPA) induce una reducción en la AGD en hembras, de manera similar a nuestras observaciones tras la exposición a As. Más estudios son necesarios para determinar el mecanismo de acción de los disruptores endócrinos, como el As o el BPA, para lograr esta característica.

El inicio de la pubertad ocurre como consecuencia de la activación del eje hipotálamo- hipófiso- gonadal (Buck Louis et al. 2008). En este modelo, evaluamos la edad promedio de la apertura vaginal o el descenso testicular en las crías, como marcadores del inicio de la pubertad. La exposición a As no afectó en nuestro modelo la edad promedio de la apertura vaginal o del descenso testicular. Otros estudios

recientes también reportaron que la exposición a As no modificó el inicio de la pubertad de las crías (Markowski et al. 2012; Gandhi et al. 2012).

También evaluamos el entorno endócrino de los animales expuestos al As en la adultez. El tratamiento con este metaloide no alteró los niveles séricos de LH en ratas adultas expuestas desde la concepción en adelante. Por el contrario, encontramos que la exposición a 50 ppm de As incrementó los niveles séricos de FSH en hembras y los disminuyó en los machos, aún en los grupos donde la exposición a As cesó luego del destete, sugiriendo un efecto organizacional. De todas formas, otros trabajos demuestran que la exposición a As durante la adultez reduce los niveles de FSH y LH en ratas hembra y macho (Jana et al. 2006; Akram et al. 2010), resaltando la importancia de la ventana de exposición. En este capítulo, además, demostramos que la exposición a As tiene un impacto en la liberación de las gonadotrofinas inducidas por GnRH *in vivo* solo en crías macho, alterando la respuesta a este decapéptido en los animales A50 (altos niveles de LH y bajos de FSH). De nuestro conocimiento, esta es la primera vez en la que se describen alteraciones en la funcionalidad hipofisaria en respuesta a GnRH como consecuencia de la exposición a As.

También medimos el contenido hipotalámico de GnRH. Las crías hembra A50 presentaron alto contenido de GnRH mientras que las crías macho expuestas a las dos concentraciones de As mostraron el contenido disminuido, correlacionando con los niveles de FSH basales. Sin embargo, al evaluar la liberación pulsátil de este decapéptido no encontramos diferencias en ninguno de los parámetros (número de pulsos/hora, intervalo inter-pulso, duración del pico de GnRH o amplitud del mismo). Esto nos hace pensar que quizás este disruptor produzca un aumento en la síntesis del péptido, sin alterar la forma o cantidad de su secreción.

Si bien, más estudios serán necesarios para determinar el mecanismo de acción por el cual el As altera los niveles séricos de FSH, está descripto que en la hembra adulta, tanto el $E_2$ como la inhibina controlan la secreción de FSH, siendo esta última el componente principal en la inhibición de esta gonadotrofina en las hembras. Además, en los machos se demostró que a lo largo de la vida existe una desaparición gradual de la inhibina como regulador directo de la secreción de FSH, lo que resulta en niveles elevados de esta hormona (Culler and Negro-Vilar 1988). Por lo tanto, en nuestro

modelo experimental, la inhibina podría estar elevada en las crías macho y disminuida en las hembras, produciendo las alteraciones observadas en los niveles de FSH. Aunque tampoco podemos descartar que existan otros efectos sobre la hipófisis como por ejemplo la alteración en la producción de activina local.

También demostramos que la exposición a As desde la concepción a la adultez incrementa los niveles séricos de T en las hembra A50-A50, sin modificar el contenido ovárico de la misma. Sin embargo, los niveles de esta hormona en los machos no se alteró con el tratamiento. Además se pesaron las glándulas adrenales, sin encontrar diferencias entre tratamientos en ambos sexos. Sin embargo, podría existir una alteración en la funcionalidad de la glándula adrenal y/o en el ovario. Estudios sobre la actividad esteroidogénica en estos órganos serán necesarios para poder explicar la alteración encontrada en la T sérica en las crías hembra. Tampoco encontramos diferencias en los niveles séricos basales de PRL, $P_4$ o $E_2$ en las crías hembra. Dávila-Esqueda y col. observaron bajos niveles de $E_2$ en ratas hembra de un mes de edad expuestas a 3 ppm de arsenito de sodio en un período de tiempo similar al nuestro. De todas formas, pasada esta edad, esta alteración desaparecía, coincidiendo con nuestros resultados. En otros estudios, la exposición durante la adultez reduce los niveles de $E_2$ en ratas hembras y de T en ratas macho, aún a dosis similares a las utilizadas por nosotros (4 y 40 ppm), pero difiere el modelo experimental utilizado.

Además se ha demostrado que a concentraciones fisiológicas, la T actúa directamente sobre la hipófisis, aumentando la transcripción de FSHβ tanto en ratas macho como hembra. Por lo tanto los altos niveles de T en las crías hembra podrían favorecer al aumento de FSH.

Por otra parte se evaluaron otros parámetros que determinan la correcta fisiología del eje reproductivo. El peso ovárico aumentó en las hembras expuestas a la menor dosis de As (A5-A5). En los machos, no se encontraron diferencias en el peso testicular.

A pesar de los altos niveles séricos de T encontrados en las ratas hembra tratadas con As, no se hallaron alteraciones en el ciclo estral de las crías. En contraposición, numerosos estudios reportaron que ratas expuestas a As de forma aguda en la adultez, aún a dosis más bajas que las utilizadas en este modelo, permanecen en estadío de

diestro. Por lo tanto, una exposición crónica a As no produce el mismo efecto en el eje reproductivo que una exposición aguda, al menos en el tiempo evaluado.

Estudios epidemiológicos demuestran que la exposición a As está asociada con un incremento en el riesgo de diabetes tipo II (Maull et al. 2012). Paul y col. encontraron que ratones macho C57BL/6 adultos expuestos a 50 ppm de arsenito de sodio en el agua de bebida se promueve una alteración en la tolerancia a la glucosa (Paul et al. 2007a). Otros autores describen que ratas expuestas a 3 ppm de As desde la concepción hasta los 4 meses de edad presentan hiperglucemia, alteraciones en el metabolismo de la glucosa e insulino resistencia en la adultez. En nuestras condiciones experimentales, encontramos que las crías de ambos sexos tratadas con As no muestran alteraciones en el metabolismo de la glucosa. No encontramos diferencias ni en los niveles en ayuno de la glucemia o insulinemia, HOMA-IR o en los TTIs o TTGs a los 4 meses de edad. A pesar de ello, no podemos descartar que se desarrolle un efecto por la exposición a As en el metabolismo en edades más avanzadas.

## CONCLUSIONES CAPÍTULO II

La mayoría de los estudios sobre la exposición a As en roedores evalúan los efectos de este metaloide durante la adultez, por lo que poco se sabe sobre los efectos de la exposición al As desde la concepción en crías de rata. En este modelo, la exposición a $As_i$ en agua de bebida afectó la regulación hormonal y la funcionalidad del eje reproductivo, principalmente en hembras, sin alterar el metabolismo de la glucosa. Es interesante notar, que las madres expuestas a As desde el DG 1 en adelante mostraron desórdenes reproductivos que sugieren una falla ovárica prematura. Entonces, las alteraciones en el eje hipotálamo- hipófiso- gonadal observados en las crías jóvenes podría ser un signo temprano de la misma patología. Más estudios son necesarios para clarificar el/ los mecanismos de disrupción del As en el sistema reproductivo.

Por otro lado, si bien no encontramos señales de una alteración en el metabolismo glucídico en las crías adultas, el bajo peso corporal al nacimiento ha sido relacionado con deficiencias nutricionales de la madre durante la preñez (tanto baja en calorías como baja en proteínas). Recordemos que las madres tratadas con As muestran un menor aumento de peso durante la preñez hasta el parto y recién recuperan un peso

normal a los 2 meses postparto. Esta situación conlleva a una mayor predisposición por parte de las crías a desarrollar intolerancia a la glucosa/diabetes en edades más avanzadas (Hill 2011).

Además demostramos que la exposición a As desde la concepción produce alteraciones en los niveles séricos de FSH (machos y hembras A50-A50 y A50-C), en el contenido de GnRH hipotalámico (hembras A50-A50 y machos A5-A5, A50-A50 y A50-C) y en la respuesta hipofisaria a GnRH (machos A50-A50 y A50-C) que no se revierten al cesar la exposición al mismo.

En la **Tabla 3** se presenta un resumen de los resultados obtenidos en este capítulo.

**Tabla 3.** Resumen de los efectos de la exposición a As en el control del eje reproductivo y la homeostasis de la glucemia en crías al PND 1, PND 21 y en la adultez, para hembras (en rosa), machos (en azul) o ambos (en gris).

| | PND 1 | PND 21 | Adultez |
|---|---|---|---|
| Peso corporal | ↓ A50 ; ↓ A50 | ↑ A50, A5 ;<br>↑ A50, A5 | = |
| AGD | ↓ A50 ; = | | |
| AV -DT | = | | |
| Gonadotrofinas séricas | | | = LH<br>↑ FSH A50-A50, A50-C<br>↓ FSH A50-A50, A50-C |
| PRL sérica | | | = |
| Hormonas esteroideas séricas | | | = $E_2$<br>= $P_4$<br>↑ T A50-A50 ; = T |
| Contenido ovárico de T | | | = |
| Peso ovárico/ testicular | | | ↑ A5-A5; = |
| Ciclo estral | | | = |
| Contenido hipotalámico de GnRH | | | ↑ A50-A50<br>↓ A5-A5, A50-A50, A50-C |
| Liberación pulsátil de GnRH | | | = |
| Secreción de gonadotrofinas en respuesta a GnRH | | | = LH; = FSH<br>↑LH A50-A50<br>↓FSH A50-A50, A50-C |
| Peso glándula adrenal | | | = |
| Test de tolerancia a la glucosa | | | = |
| Test de tolerancia a la insulina | | | = |
| Insulina y glucemia en ayuno | | | = |
| HOMA-IR | | | = |
| Contenido de As en hígado | | | ↑ A50-A50 |

# DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Extensas áreas del mundo contienen niveles de As a partir de fuentes naturales o antropogénicas que crean un riesgo toxicológico para la población, entre ellos, nuestro país. Actualmente, la organización mundial de la salud (OMS) recomienda un nivel máximo de 10 µg/L (10 ppb o 0,01 ppm) de As en el agua de bebida (World Health Organization 1993). De todas formas, los niveles de As en el agua de bebida en algunos lugares superan ampliamente estos niveles, como en Argentina (0,2 ppm); México (0,4 ppm), Taiwán (0,05-1,98 ppm) y en la región Indo-Bangladesh (0,8 ppm).

Siendo la contaminación con As en el agua un problema nacional y mundial, en esta tesis nos propusimos evaluar los efectos de la exposición a As en ratas *Sprague-Dawley* en la regulación del eje reproductivo y la homeostasis de la glucemia. Algunos estudios sugieren que el As afecta estos sistemas, viéndose relacionado con diabetes tipo II o con alteraciones en el eje reproductivo, pero muy pocos evalúan los efectos de la exposición a este contaminante desde la etapa gestacional en la madre y en la cría. En este trabajo, ratas preñadas fueron expuestas a 5 (A5) o 50 ppm (A50) de arsenito de sodio desde el DG 1 hasta la restauración de sus ciclos estrales (2 meses postparto). Luego del nacimiento, las crías de ambos sexos continuaron recibiendo el mismo tratamiento que su madre (A5-A5 y A50-A50) o no (A5-C y A50-C) hasta la adultez (4 meses de edad). Este modelo no solo nos permite ampliar la información existente sobre los efectos del As en los sistemas mencionados, sino que también nos permite evaluar las consecuencias de la exposición temprana (*in utero*) a As en un individuo al nacimiento y en la adultez.

En primer lugar, cuando medimos el contenido total de As en hígado encontramos que llamativamente sólo en las madres aumentó de forma dosis dependiente. Las crías A5-A5 presentaron niveles de As similares a sus pares control. En relación a ello, un estudio sugiere que los niños presentan mayor grado de metilación, y por ende de detoxificación, que mujeres adultas, debido a los altos niveles encontrados de compuestos de As metilados en orina en niños respecto a las adultas (Concha et al. 1998a). Si bien el contenido de As total en hígado fue medido en madres y crías ya adultas, con edades parecidas (aproximadamente 4 meses), algo similar podría estar

ocurriendo en las crías de nuestro modelo experimental, siendo efectivo este mecanismo de detoxificación solo cuando la exposición a As es baja (crías A5-A5) ya que los altos niveles de As permitirían que se acumule en este tejido. Para ello sería necesario medir tanto en madres como en crías adultas, los niveles de As en orina y también determinar la cantidad y/o actividad de las enzimas que intervienen en el metabolismo del metaloide.

Por otra parte, los niveles de As detectados en madres y en crías, coinciden con los niveles encontrados por otros autores tanto en humanos como en roedores. Por ejemplo, en un estudio hecho en residentes del área de Bangladesh, las concentraciones de As total en hígado de personas que desarrollaron hepatomegalia como resultado de beber agua con 0.22 a 2 ppm de $As_i$ se hallaron entre 0.5 - 6 mg de As/kg de peso de tejido, valores similares a los encontrados en madres y crías expuestas a 50 ppm de As. Se sabe que en la rata la distribución, unión, metabolismo y excreción del As son diferentes comparados con el ser humano. La metilación puede ser considerada un mecanismo de detoxificación, ya que los metabolitos metilados son menos tóxicos que el $As_i$ y más rápidamente excretados en la orina. El roedor puede metabolizar y eliminar del organismo los metabolitos de As más eficientemente que los humanos, haciendo a estos últimos más sensibles. En este contexto, altas dosis o mayor tiempo de exposición de cualquier compuesto de As son necesarias en el roedor para producir el mismo efecto que en el humano (Styblo et al. 2002), siendo, entonces, las concentraciones utilizadas en este estudio apropiadas.

Uno de los parámetros evaluados en esta tesis es el efecto de la exposición a As en el peso corporal de los animales. Éste diminuyó luego de la exposición a 50 ppm tanto en las madres, en la etapa de gestación, como en las crías al día del nacimiento. Estos resultados son consistentes con trabajos previos donde se observa bajo peso corporal producto de la exposición a As (Izquierdo-Vega et al. 2006; Guan et al. 2012). En las madres el peso corporal se recupera a niveles semejantes al grupo control a los dos meses postparto, al mismo tiempo en el que se restaura la homeostasis de la glucosa. Esto sugiere que la disminución en el peso corporal podría estar dada no solo por la toxicidad generada por el As en la madre, sino por una alteración en la asimilación de los nutrientes incorporados.

Tal como ha sido descripto en estudios de toxicidad reproductiva, el peso corporal de las crías varía ampliamente en función de la toxicidad materna o neonatal. El entorno fetal está determinado por el ambiente materno y por la fisiología de la madre y de la placenta. El crecimiento (un aumento en el número y tamaño de las células o en la masa de tejidos) y desarrollo (cambios en la estructura y función de las células o tejidos) del feto son eventos biológicos complejos influenciados por la genética, epigenética, la madurez materna, así como también por factores ambientales (Wu et al. 2006). Estos factores pueden afectar el tamaño y la capacidad funcional de la placenta, la transferencia útero-placentaria de nutrientes y de oxígeno de la madre al feto, la disponibilidad de nutrientes, el medio endócrino fetal, y las vías metabólicas. En nuestro modelo experimental, hemos evaluado si la exposición a As altera el peso fetal o el peso y tamaño de la placenta al DG 18, sin encontrar diferencias entre tratamientos. Sin embargo, el bajo peso corporal en crías de ambos sexos se hace evidente al día del nacimiento. Por lo tanto, podemos plantear la hipótesis que alteraciones en los días subsiguientes de la gestación ocurrirían posiblemente en la placenta para alcanzar la diferencia de peso observada al día del nacimiento.

Pero la eficiencia placentaria no se refleja sólo en su peso o tamaño, sino que también depende de otros factores, tales como la densidad microvascular, interdigitación de la placenta con el endometrio materno para aumentar la superficie, y el flujo sanguíneo a la placenta. Dado que el As puede atravesar fácilmente la placenta y acumularse en ella, podría tener efectos deletéreos en su vasculatura, causando anormalidades placentarias, disminuyendo el fluido sanguíneo y por lo tanto, retrasar el crecimiento fetal. He y col. mostraron que la exposición a As produce aberraciones en la vasculogénesis de la placenta e insuficiencia placentaria al DG 12 en ratones FVB/NJ expuestos a 37.5 ppm en el agua de bebida desde el DG 1 (He W et al. 2007).

En cuanto a los niveles séricos de las hormonas sexuales durante la preñez, hemos encontrado que las madres expuestas a 50 ppm presentan un aumento en los niveles séricos de $E_2$ y T. Los niveles de $P_4$ fueron similares entre tratamientos. En esta etapa, el contenido ovárico de T en las madres A50 fue similar a sus pares control, mientras que el de $E_2$ fue menor en las madres A50. A diferencia de la placenta humana, la

placenta de la rata secreta normalmente grandes cantidades de $P_4$ y T, y no puede sintetizar estrógenos ya que en este tejido no se expresa la enzima aromatasa, por lo que depende de la síntesis de estrógenos ováricos (Sridaran et al. 1981). Estos resultados sugieren que la exposición a As durante la gestación podría alterar la esteroidogénesis placentaria, llevando a un aumento en la producción de T, así como también en el ovario y/o en el tejido adiposo aumentando los niveles de $E_2$. También, el aumento de $E_2$ podría deberse solamente a un exceso de sustrato (la T) y no a cambios en la expresión o actividad de la aromatasa ovárica.

Si bien tanto los niveles de $E_2$ como de T se encuentran elevados, el incremento más pronunciado se observa en esta última, predominando entonces los niveles androgénicos por sobre los estrogénicos. En este contexto, algunos estudios sugieren que la T puede suprimir el crecimiento fetal, disminuyendo la llegada de nutrientes al feto por una regulación negativa en la actividad y expresión de transportadores de aminoácidos específicos de placenta(Sathishkumar et al. 2011), así como también afectar el fluido sanguíneo en la misma(Sun et al. 2012). Por lo tanto, los altos niveles de T en la madre A50 podrían contribuir a la disminución en el peso corporal de sus crías.

En las crías, el bajo peso corporal al nacimiento fue seguido por un incremento al destete respecto a los animales control. Además, a esta edad, las crías expuestas a 5 ppm mostraron mayor peso corporal que sus pares control. De todas formas, a los dos meses de edad las ratas tratadas con As normalizan su peso corporal a valores similares a los animales control. Se ha demostrado que la exposición prenatal a altos niveles de T o de glucocorticoides (Seckl 2001) reducen el peso corporal al nacimiento, seguido por una recuperación en el mismo. Si bien los niveles de corticosterona no fueron cuantificados en las madres preñadas, varios estudios indican que la exposición a As en el agua de bebida aumentan los niveles séricos de este corticoide en roedores(; Martinez et al. 2008). Por lo tanto, un ambiente intrauterino con altos niveles de T como en las madres A50, y/o en los niveles de corticosterona, podrían generar el "efecto rebote" en el peso corporal luego del nacimiento.

Por otra parte, en la rata la diferenciación sexual del cerebro funcional ocurre, como es sabido, durante el período perinatal. Dos picos de T, uno prenatal

(aproximadamente el DG 18) y otro el día del nacimiento inducen la diferenciación hacia macho. En nuestro modelo experimental, las madres A50 presentaron al DG 18 un aumento considerable en los niveles de T y en menor medida de $E_2$, lo que podría traducirse en alteraciones en la diferenciación sexual de sus crías. Es por eso que evaluamos marcadores del desarrollo sexual en las mismas. En primer lugar determinamos la distancia anogenital (AGD) en crías de ambos sexos, ya que da una idea de la exposición prenatal a andrógenos; y luego evaluamos el inicio de la pubertad, reflejados por la edad de la apertura vaginal (AV; un evento mediado por estrógenos) en las hembras y del descenso testicular (DT; un evento mediado por andrógenos) en los machos para determinar el correcto desarrollo del eje gonadotrófico fetal.

En este trabajo las crías hembra expuestas a 50 ppm de As presentaron disminuida la AGD al día del nacimiento, sugiriendo un efecto de "hiper-feminización", sin encontrar diferencias en las crías macho. Tampoco se encontraron alteraciones en el inicio de la pubertad en las crías hembra o macho expuestas a As. Se sabe que hembras expuestas a andrógenos, como sería el caso de las crías A50, incrementan su AGD a una medida típica de macho y se retrasa su pubertad . También se ha descripto que una exposición fetal a altos niveles de estrógenos pueden causar anormalidades en el tracto reproductivo en roedores macho, debido aparentemente a una perturbación en la producción de andrógenos por el testículo fetal. De todas formas, estudios previos reportan que un incremento en los niveles séricos de las hormonas maternas en ratas no necesariamente está asociado a un incremento en los niveles en el feto.

En la placenta de la rata, se expresa la enzima 17β-HSD2, que convierte las formas activas 17β-hidroxi de $E_2$ y T en sus formas menos activas 17-ceto (Mustonen et al. 1997; Wetzel et al. 2011). Por lo tanto, esta enzima protegería al embrión de la acción de los 17-hidroxiesteroides presentes en el fluido amniótico. Sun y col. han descripto un aumento en los niveles proteicos de esta enzima en placentas de ratas *Wistar* expuestas a T durante la preñez. En nuestro modelo, los altos niveles de T en las madres A50 podrían llevar a un aumento en los niveles de la enzima 17β-HSD2 y de esta manera evitar la acción de los altos niveles de esteroides en el feto. No

encontramos ningún trabajo en el que se evalúe los niveles de esta enzima tras la exposición a As durante la gestación, por lo que resultaría interesante medir la expresión y actividad de la misma en las placentas de las madres expuestas a As.

Sin embargo, el hecho que las crías hembra hayan mostrado una disminución en la AGD indicando "hiper-feminización", como comentaramos más arriba, indica que estuvieron sometidas a algún agente intra útero que causó esta alteración. Coincidiendo con nuestros resultados tras la exposición a As, Christiansen y col. describieron en un estudio reciente que la exposición a bajas dosis de otro disruptor endócrino, el Bisfenol A (BPA), que tiene principalmente efectos estrogénicos, también induce una reducción en la AGD en hembras. Más estudios son necesarios para determinar el mecanismo de acción de los disruptores endócrinos, como el As o el BPA, para inducir esta característica.

Al reiniciar los ciclos estrales (etapa de postlactancia), las madres A50 alcanzan niveles de T similares a los de sus pares control, sosteniendo la hipótesis que su incremento en la preñez proviene de una alteración en la esteroidogénesis en la placenta. Los niveles de $P_4$ no se modifican con el tratamiento, pero sí disminuyen los niveles de $E_2$ y aumenta FSH sérica, sin alteraciones en los niveles de LH. A su vez, las madres expuestas a la mayor dosis de As presentan alteraciones en los ciclos estrales. La morfología ovárica también se encontró alterada: las madres expuestas a As presentaron folículos quísticos, folículos antrales con invaginaciones en la capa de células de granulosa, un aumento en el porcentaje de CL, y una tendencia a presentar menor crecimiento folicular. Estos resultados, en su conjunto, nos llevaron a sugerir que la exposición a As produce alteraciones que son compatibles con una **falla ovárica prematura**, causada por el efecto tóxico del As.

Por otra parte, hemos demostrado que las crías hembra A50-A50 en la adultez tienen altos niveles de T y FSH, ciclos estrales sin alteraciones y niveles de $E_2$, $P_4$ y LH normales. Las crías macho A50-A50 mostraron bajos niveles de FSH y normales de LH y T.

Los efectos de envejecimiento se manifiestan como un proceso de deterioro con un impacto progresivo, sobre todo después de que la maduración sexual y la vida reproductiva se completan. Todos los folículos en el ovario, del primordial al

preovulatorio, se consideran parte de la reserva total, denominada **reserva ovárica**. En el ser humano, la pérdida de la reserva ovárica es el mecanismo de propulsión primaria para la senescencia del ovario. Además de la pérdida en el número de folículos, se registran disminuciones relacionadas con la edad en la calidad de los ovocitos contenida dentro de ellos. Esta situación difiere en el roedor. En estos animales, los cambios relacionados con la edad en la ciclicidad reproductiva se reflejan inicialmente en patrones de liberación de las gonadotrofinas anormales y no siempre coincidentes con una reducción crítica en el número de folículos.

El envejecimiento reproductivo se puede dividir en tres etapas: reproductiva, transición a la menopausia y postmenopáusica. Al final de la **etapa reproductiva**, en la mujer el número de folículos primordiales y su capacidad para secretar inhibina disminuye gradualmente, por lo cual, con el tiempo, los niveles de FSH comienzan a incrementarse. En esta etapa la regularidad del ciclo menstrual se conserva. En la etapa de **transición hacia la menopausia**, los ciclos comienzan a ser irregulares y los niveles de FSH se mantienen elevados. En este período, la reserva ovárica está comprometida, el proceso de atresia folicular se acelera y hay una mayor pérdida de folículos disponibles. Al llegar a la **postmenopausia**, las concentraciones de las gonadotrofinas exhiben diferentes patrones de liberación. Los niveles de LH y FSH se encuentran tónicamente elevados y los de $E_2$ constantemente bajos. En nuestro modelo experimental, las madres A50 se encontrarían en la etapa de transición hacia la menopausia y las crías A50-A50 en la etapa reproductiva tardía donde los primeros signos de envejecimiento aparecen. En estudios de corte transversal en el que las fases reproductivas están agrupadas por décadas, se observan incrementos en los niveles de FSH circulantes en mujeres a lo largo del tiempo (Lenton et al. 1984). En consecuencia, las mujeres de más edad tienen ciclos menstruales caracterizados por un aumento distintivo en FSH y en algunos casos una disminución evidente en los niveles de $E_2$ séricos (Santoro et al. 2003). En las crías, los persistentes niveles elevados de FSH, sin un cambio concomitante en los de $E_2$ también implicarían un envejecimiento en el eje hipotálamo-hipofisario, el cual podría estar censando inapropiadamente la señal del estrógeno. Esta hipótesis es apoyada por estudios recientes en mujeres que se encuentran en la transición a la menopausia, y donde los ciclos anovulatorios son analizados.

En los adultos, la inhibina sérica se correlaciona inversamente con la concentración de FSH en suero. La pérdida de inhibinas en el momento de la menopausia en las mujeres conduce a un aumento en la producción de FSH, lo que confirma el papel central de las inhibinas en la contención de FSH mediante retroalimentación negativa (Lin et al. 2003). Siguiendo nuestra hipótesis, en nuestro modelo experimental el bajo crecimiento folicular podría ser la responsable de la caída en los niveles de $E_2$ observados en los animales expuestos a As, así como también podría causar la disminución en los niveles de inhibina y como consecuencia de estos dos factores, inducir el incremento en los niveles de FSH observados en este grupo.

La falla ovárica prematura podría deberse a un alto grado de estrés oxidativo en el ovario, que lleve a la perdida folicular. A su vez, este es uno de los mecanismos de acción más estudiados por el que el As realizaría su acción tóxica. Por eso evaluamos en las madres, el nivel de peroxidación lipídica, los niveles de grupos tioles y la actividad de la enzima catalasa en este tejido, sin encontrar diferencias entre tratamientos. También evaluamos el estrés oxidativo en el hígado, tejido en el que encontramos una muy significativa acumulación de As, y tampoco en éste se observaron alteraciones en los parámetros de estrés oxidativo evaluados. Entonces, podemos sugerir que al menos los parámetros estudiados nos se vieron modificados con el tratamiento, lo cual no permite descartar que otras enzimas antioxidantes, por ejemplo, se encuentren alteradas. Otra posibilidad es que el As produciría la falla ovárica mediante otro mecanismo de acción, o una combinación de ambos podría estar sucediendo. Sería interesante determinar no solo la cantidad de estructuras ováricas totales en cada tratamiento, sino también el grado de proliferación y apoptosis celular en este tejido, estudios que forman parte de la continuación de este trabajo.

Por otra parte, se sabe que los niveles de gonadotrofinas están determinados por la forma y cantidad de secreción pulsátil de GnRH. Dadas las alteraciones encontradas en los niveles de FSH, tanto en madres como en las crías hembra, nos propusimos evaluar el contenido hipotalámico de GnRH y la liberación pulsátil del mismo. En las madres ambos parámetros fueron similares entre ratas expuestas a As y control. En las crías no se observaron diferencias en la pulsatilidad de GnRH entre los grupos; sin embargo se

detectaron elevados contenidos de GnRH hipotalámicos en las hembras expuestas a A50 coincidentes con el aumento de FSH sérico y disminuidos contenidos de FSH en las crías macho expuestas a A50, nuevamente coincidentes con la dismimución de FSH sérica. Si esta correlación es una mera coincidencia o un factor causal del otro será motivo de futuros estudios.

Diversos estudios demuestran que roedores de mediana edad muestran una disminución de la expresión de GnRH y la reducción de la liberación de GnRH en el hipotálamo en comparación con sus homólogos jóvenes (Zuo et al. 1996; Rubin et al. 1997; Arias et al. 1996; Gruenewald and Matsumoto 1991). Sin embargo, no todos los estudios sobre cambios relacionados con la edad en la expresión de GnRH y su liberación han sido consistentes. Mientras algunos investigadores reportar que no hay cambio en la expresión de GnRH (Gore et al. 2002) o la liberación (Sortino et al. 1989), otros han observado un aumento relacionado con la edad en la liberación de GnRH (Rance and Uswandi 1996).

Otro de los objetivos de esta tesis fue evaluar los efectos de la exposición a As en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, durante la gestación y postparto en las madres y en la adultez en las crías. Como hemos mencionado, durante la preñez hay una tendencia natural en la madre a la “insulino resistencia”, para obtener niveles más altos de glucosa en sangre y permitir el crecimiento fetal. Pero normalmente, las células β de la madre pueden producir la insulina adicional necesaria para superar la insulino-resistencia de la preñez. La exposición a As durante la gestación generó una intolerancia a la glucosa, reflejada por una alteración en el TTG, en las madres A5 y A50. En el postparto, estas alteraciones desaparecen. El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa requiere de dos componentes: la producción adecuada de insulina por las células β pancreáticas y la capacidad de respuesta a la insulina en los tejidos periféricos. Las células β son de vital importancia para el correcto metabolismo de la glucosa/insulina, tanto en el feto como en el adulto. Estas células detectan los niveles de glucosa presentes en el cuerpo e inician la liberación de insulina proporcional.

El análisis del índice HOMA-IR nos permite aproximarnos a determinar si es la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos la que se encuentra afectada. Sin

embargo, este parámetro no se alteró en las madres A50. Además no encontramos alteraciones en los niveles séricos de insulina y glucagon en ayunas, pero sí un alto contenido pancreático de insulina en las madres expuestas a As. Estos resultados sugieren que el As modificaría el correcto funcionamiento de las células beta pancreáticas, llevando a un aumento en el riesgo de desarrollar **diabetes gestacional**. Sin embargo, con estos resultados, no podemos descartar totalmente que exista insulino resistencia periférica en las ratas expuesta a ársenico.

La diabetes gestacional se define como una intolerancia a la glucosa detectada por primera vez durante la etapa de gestación y está asociada a un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo II más tarde en la vida (Forsbach-Sanchez et al. 2005). Muchos estudios describen que los fetos que se desarrollan en un ambiente intrauterino con hiperglucemia desarrollan intolerancia a la glucosa en la adultez (Aerts and Van Assche 2006; Fernandez-Twinn and Ozanne 2006). En este trabajo, tanto las madres en la etapa de postparto como las crías adultas expuestas desde la gestación a As no mostraron alteraciones en la homeostasis de la glucosa, aunque no podemos descartar que se esto se modifique más adelante.

Además los altos niveles de T podrían contribuir a la intolerancia de glucosa observada en las madres tratadas con As, ya que se han descripto diferencias sexuales en este parámetro (menor tolerancia a la glucosa en machos que en hembras) que se atribuyen a esta hormona. Por otra parte, considerando que en la madre A50 existe una intolerancia a la glucosa, esta tendría el potencial para aumentar la disponibilidad de glucosa y aminoácidos para el feto, por lo que la transferencia de nutrientes de la madre al feto también podría verse afectada en estas condiciones  ya que lo que se observa es un bajo peso corporal de sus crías al día de nacimiento.

## CONCLUSIÓN GENERAL

La mayoría de los estudios sobre la exposición a As en roedores evalúan los efectos de este metaloide durante la adultez, por lo que poco se sabe sobre los efectos de la exposición al As en etapas críticas como la gestación y meses postparto en las madres o desde la concepción en crías de rata.

De nuestro conocimiento, esta es la primera vez en la que se evalúan los posibles efectos del As sobre los niveles de hormonas sexuales durante la etapa gestacional y la fisiología del hipotálamo (estudiando la pulsatilidad de GnRH); y que se describen alteraciones en la AGD, la funcionalidad hipofisaria en respuesta a GnRH y la funcionalidad hipofisaria en respuesta a GnRH como consecuencia de la exposición a As desde la concepción.

Nuestros resultados demuestran que el As puede actuar como un potente disruptor endócrino principalmente en las hembras. La exposición a este metaloide afectó diferentes mecanismos endócrinos, produciendo un síndrome símil diabetes gestacional durante la preñez e induciendo un sindrome símil falla ovárica prematura en este modelo animal. Además demostramos que la exposición a As desde la concepción produce alteraciones que no se revierten al cesar la exposición al mismo. Más estudios son necesarios para clarificar el/los mecanismos de disrupción del As en los sistemas evaluados.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Abernathy CO et al. 1999. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. Environ Health Perspect 107: 593-597.

Aerts L ,Van Assche FA. 2006. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. Int J Biochem Cell Biol 38: 894-903.

Ahmad SA et al. 2001. Arsenic in drinking water and pregnancy outcomes. Environ Health Perspect 109: 629-631.

Ahn RW et al. 2013. Nano-encapsulation of arsenic trioxide enhances efficacy against murine lymphoma model while minimizing its impact on ovarian reserve in vitro and in vivo. PLoS One 8: e58491.

Akram Z et al. 2010. Adverse effects of arsenic exposure on uterine function and structure in female rat. Exp Toxicol Pathol 62: 451-459.

Al Bader MD. 2006. Estrogen receptors alpha and beta in rat placenta: detection by RT-PCR, real time PCR and Western blotting. Reprod Biol Endocrinol 4: 13.

Andreu C, Parborell F, Vanzulli S, Chemes H, Tesone M. 1998. Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis. Molecular Reproduction and Development 51: 287-294.

Aposhian HV ,Aposhian MM. 2006. Arsenic toxicology: five questions. Chem Res Toxicol 19: 1-15.

Arias P et al. 1996. Effects of aging on N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced GnRH and LH release in female rats. Brain Res 740: 234-238.

Arimura A. Hypothalamic Hormones. In: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine (Conn PM, Freeman ME, eds). New Jersey:Human Press,2004;41-58.

Augustine RA, Ladyman SR, Grattan DR. 2008. From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. J Physiol 586: 387-397.

Ben Zimra M et al. 2002. Uterine and placental expression of steroidogenic genes during rodent pregnancy. Mol Cell Endocrinol 187: 223-231.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemestry. Barcelona, España:Reverté, S.A,2002.

Berne RM, Levy MN. Physiology. St. Louis, Missouri:Mosby Year Book,1993.

Besecke LM et al. 1996. Gonadotropin-releasing hormone regulates follicle-stimulating hormone-beta gene expression through an activin/follistatin autocrine or paracrine loop. Endocrinology 137: 3667-3673.

Bezek S, Ujhazy E, Mach M, Navarova J, Dubovicky M. 2008. Developmental origin of chronic diseases: toxicological implication. Interdiscip Toxicol 1: 29-31.

Bleier R, Byne W, Siggelkow I. 1982. Cytoarchitectonic sexual dimorphisms of the medial preoptic and anterior hypothalamic areas in guinea pig, rat, hamster, and mouse. J Comp Neurol 212: 118-130.

Bodwell JE, Kingsley LA, Hamilton JW. 2004. Arsenic at very low concentrations alters glucocorticoid receptor (GR)-mediated gene activation but not GR-mediated gene repression: complex dose-response effects are closely correlated with levels of activated GR and require a functional GR DNA binding domain. Chem Res Toxicol 17: 1064-1076.

Bonaventura MM et al. 2013. Sex differences in insulin resistance in GABAB1 knockout mice. Life Sci 92: 175-182.

Borzsonyi M, Bereczky A, Rudnai P, Csanady M, Horvath A. 1992. Epidemiological studies on human subjects exposed to arsenic in drinking water in southeast Hungary. Arch Toxicol 66: 77-78.

Brubaker PL ,Drucker DJ. 2002. Structure-function of the glucagon receptor family of G protein-coupled receptors: the glucagon, GIP, GLP-1, and GLP-2 receptors. Receptors Channels 8: 179-188.

Buck Louis GM et al. 2008. Environmental factors and puberty timing: expert panel research needs. Pediatrics 121 Suppl 3: S192-S207.

Bundschuh J, Pérez Carrera A, Litter M. Iberoarsen: Distribución del arsénico en las regiones Ibérica e Iberoamericana.CYTED,2008.

Caligioni CS. 2009. Assessing reproductive status/stages in mice. Curr Protoc Neurosci Appendix 4: Appendix.

Carter DE, Aposhian HV, Gandolfi AJ. 2003. The metabolism of inorganic arsenic oxides, gallium arsenide, and arsine: a toxicochemical review. Toxicol Appl Pharmacol 193: 309-334.

Catalano PN et al. 2010. Lack of functional GABA(B) receptors alters GnRH physiology and sexual dimorphic expression of GnRH and GAD-67 in the brain. Am J Physiol Endocrinol Metab 298: E683-E696.

Chakraborti D et al. 2002. Arsenic calamity in the Indian subcontinent What lessons have been learned? Talanta 58: 3-22.

Chatterjee A ,Chatterji U. 2010. Arsenic abrogates the estrogen-signaling pathway in the rat uterus. Reprod Biol Endocrinol 8: 80.

Chattopadhyay S ,Ghosh D. 2010a. Role of dietary GSH in the amelioration of sodium arsenite-induced ovarian and uterine disorders. Reprod Toxicol 30: 481-488.

Chattopadhyay S ,Ghosh D. 2010b. The involvement of hypophyseal-gonadal and hypophyseal-adrenal axes in arsenic-mediated ovarian and uterine toxicity: modulation by hCG. J Biochem Mol Toxicol 24: 29-41.

Chattopadhyay S, Ghosh S, Chaki S, Debnath J, Ghosh D. 1999. Effect of sodium arsenite on plasma levels of gonadotrophins and ovarian steroidogenesis in mature albino rats: duration-dependent response. J Toxicol Sci 24: 425-431.

Chattopadhyay S, Ghosh S, Debnath J, Ghosh D. 2001. Protection of sodium arsenite-induced ovarian toxicity by coadministration of L-ascorbate (vitamin C) in mature wistar strain rat. Arch Environ Contam Toxicol 41: 83-89.

Chattopadhyay S, Pal GS, Ghosh D, Debnath J. 2003. Effect of dietary co-administration of sodium selenite on sodium arsenite-induced ovarian and uterine disorders in mature albino rats. Toxicol Sci 75: 412-422.

Chen KP ,Wu HY. 1965. [Epidemiologic studies on blackfoot disease in Taiwan, China. 4. Relation of disease process with host and environmental factors]. Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi 64: 456-469.

Cheung K.W. ,Wong S.F. 2012. Gestational diabetes mellitus update and review of literature. Reproductive sys and sexual disord .

Christiansen S et al. 2013. Low dose effects of BPA on early sexual development of male and female rats. Reproduction .

Cingolani HE, Houssay AB. Fisiología humana de Houssay. Buenos Aires:2000.

Cohen SM, Arnold LL, Eldan M, Lewis AS, Beck BD. 2006. Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment. Crit Rev Toxicol 36: 99-133.

Concha G, Nermell B, Vahter MV. 1998a. Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina. Environ Health Perspect 106: 355-359.

Concha G, Vogler G, Lezcano D, Nermell B, Vahter M. 1998b. Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. Toxicol Sci 44: 185-190.

Conn PM, Morrell DV, Dufau ML, Catt KJ. 1979. Gonadotropin releasing hormone action in cultured pituicytes. Independence of luteinizing hormone release and adenosine 3,5, monophosphate production. Endocrinology 104: 448-453.

Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM. 1998. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. Front Neuroendocrinol 19: 323-362.

Culler MD ,Negro-Vilar A. 1988. Passive immunoneutralization of endogenous inhibin: sex-related differences in the role of inhibin during development. Mol Cell Endocrinol 58: 263-273.

Davey JC, Bodwell JE, Gosse JA, Hamilton JW. 2007. Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. Toxicol Sci 98: 75-86.

Davila-Esqueda ME et al. 2012. Effects of arsenic exposure during the pre- and postnatal development on the puberty of female offspring. Exp Toxicol Pathol 64: 25-30.

Dean L, McEntyre J. Introduction to Diabetes. In: The Genetic Landscape of Diabetes Washington,DC:NCBI : NIDDK,2004.

Del Razo LM, Styblo M, Cullen WR, Thomas DJ. 2001. Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices. Toxicol Appl Pharmacol 174: 282-293.

DeSesso JM. 2001. Teratogen update: inorganic arsenic. Teratology 64: 170-173.

DeSesso JM, Jacobson CF, Scialli AR, Farr CH, Holson JF. 1998. An assessment of the developmental toxicity of inorganic arsenic. Reprod Toxicol 12: 385-433.

Diamanti-Kandarakis E et al. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. Endocr Rev 30: 293-342.

Diaz-Torga GS et al. 2001. Metabolic cues for puberty onset in free grazing Holstein heifers naturally infected with nematodes. Theriogenology 56: 111-122.

Diaz-Villasenor A, Burns AL, Hiriart M, Cebrian ME, Ostrosky-Wegman P. 2007. Arsenic-induced alteration in the expression of genes related to type 2 diabetes mellitus. Toxicol Appl Pharmacol 225: 123-133.

Driancourt MA, Gougeon A, Royère D, Thibault C. Ovarian Function. In: Reproduction in Mammals and Man (Thibault C, Levasseur MC, eds). Paris:R.H.F. Hunter, Ellipses,1993;281-305.

Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH. 2008. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. Obstet Gynecol Surv 63: 39-48.

Elkind-Hirsch K, King JC, GERALL AA, Arimura AA. 1981. The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) system in normal and estrogenized neonatal rats. Brain Res Bull 7: 645-654.

Enciclopia británica, 2014. http://www.britannica.com/EBchecked/media/47180/The-islets-of-Langerhans-contain-alpha-beta-and-delta-cells.

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. Curr Top Med Chem 1: 529-539.

Ettinger AS et al. 2009. Maternal arsenic exposure and impaired glucose tolerance during pregnancy. Environ Health Perspect 117: 1059-1064.

Faerch K, Borch-Johnsen K, Vaag A, Jorgensen T, Witte DR. 2010. Sex differences in glucose levels: a consequence of physiology or methodological convenience? The Inter99 study. Diabetologia 53: 858-865.

Fernandez MO, Bianchi MS, Lux-Lantos VA, Libertun C. 2009. Neonatal Exposure to Bisphenol A Alters Reproductive Parameters and Gonadotropin Releasing Hormone Signaling in Female Rats. Environ Health Perspect 117: 757-762.

Fernandez MO, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Libertun C. 2010. Neonatal Exposure to Bisphenol A and Reproductive and Endocrine Alterations Resembling the Polycystic Ovarian Syndrome in Adult Rats. Environ Health Perspect 118: 1217-1222.

Fernandez-Twinn DS ,Ozanne SE. 2006. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. Physiol Behav 88: 234-243.

Ferris HA ,Shupnik MA. 2006. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GNRH1. Biol Reprod 74: 993-998.

Fink G. Gonadotropin secretion and its control. In: The physiology of reproduction (Knobil E, Neill JD, eds). New York:Raven Press,1988;1349-1377.

Fink G. Neuroendocrine regulation of pituitary function. In: Neuroendocrinology in physiology and medicine (Conn PM, Freeman ME, eds). Totowa NJ:Humana Press,2000;107-133.

Flora SJ. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. Free Radic Biol Med 51: 257-281.

Forsbach-Sanchez G, Tamez-Perez HE, Vazquez-Lara J. 2005. Diabetes and pregnancy. Arch Med Res 36: 291-299.

Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: The physiology of reproduction. (Knobil E, Neill JD, eds). New York:Raven Press,Ltd.,1994;613-658.

Fu J et al. 2010. Low-level arsenic impairs glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells: involvement of cellular adaptive response to oxidative stress. Environ Health Perspect 118: 864-870.

Gallavan RH, Jr., Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. 1999. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod Toxicol 13: 383-390.

Gandhi DN, Panchal GM, Patel KG. 2012. Developmental and neurobehavioural toxicity study of arsenic on rats following gestational exposure. Indian J Exp Biol 50: 147-155.

García S. Hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE) -Modulo de capacitación para atención primaria. Buenos Aires, Argentina:Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de

Prevención y Control de las Intoxicaciones,2011.

Gartner L P, Hiatt J L. Histología, texto y atlas. DF,México:Mc Graw-Hill Interamericana,1997.

Geneser F. Órganos de la reproducción. In: Histología sobre bases biomoleculares (Geneser FE, ed). Buenos Aires:Editorial Médica Panamericana S.A.,2000; 613-677.

Gibori G et al. 1988. Placental-derived regulators and the complex control of luteal cell function. Recent Prog Horm Res 44: 377-429.

Goggin SL, Labrecque MT, Allan AM. 2012. Perinatal exposure to 50 ppb sodium arsenate induces hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in male C57BL/6 mice. Neurotoxicology 33: 1338-1345.

Gonzalez IA et al. 2000. Bromocriptine restores angiotensin II response in pituitary hyperplasia. Mol Cell Endocrinol 165: 67-74.

Gore AC. 2008. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. Front Neuroendocrinol 29: 358-374.

Gore AC, Oung T, Woller MJ. 2002. Age-related changes in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and N-methyl-D-aspartate receptor gene expression, and their regulation by oestrogen, in the female rat. J Neuroendocrinol 14: 300-309.

Gorski RA. 1968. Influence of age on the response to paranatal administration of a low dose of androgen. Endocrinology 82: 1001-1004.

Gorski RA, Harlan RE, Jacobson CD, Shryne JE, Southam AM. 1980. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. J Comp Neurol 193: 529-539.

Gougeon A ,Lefevre B. 1983. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. J Reprod Fertil 69: 497-502.

Gray LE et al. 2001. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. Hum Reprod Update 7: 248-264.

Greenwald GS, Roy SK. Follicular Development and its Control. In: The Physiology of Reproduction. (Knobil E, Neill JD, eds). New York:Raven Press, Ltd.,1994;629-724.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ Res 86: 494-501.

Gruenewald DA ,Matsumoto AM. 1991. Age-related decreases in serum gonadotropin levels and gonadotropin-releasing hormone gene expression in the medial preoptic

area of the male rat are dependent upon testicular feedback. Endocrinology 129: 2442-2450.

Guan H et al. 2012. Prenatal exposure to arsenic and its effects on fetal development in the general population of Dalian. Biol Trace Elem Res 149: 10-15.

Guha Mazumder DN. 2000. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/arsenicun4.pdf.

Guillette LJ, Jr., Crain DA, Rooney AA, Pickford DB. 1995. Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. Environ Health Perspect 103 Suppl 7: 157-164.

Guo X et al. 2001. Arsenic contamination of groundwater and prevalence of arsenical dermatosis in the Hetao plain area, Inner Mongolia, China. Mol Cell Biochem 222: 137-140.

Guvenius DM, Aronsson A, Ekman-Ordeberg G, Bergman A, Noren K. 2003. Human prenatal and postnatal exposure to polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorobiphenylols, and pentachlorophenol. Environ Health Perspect 111: 1235-1241.

Halasz B. The Hypothalamus as an Endocrine Organ: The Science of Neuroendocrinology. In: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine (Conn PM, Freeman ME, eds). New Jersey:Humana Press,2000;3-21.

He W et al. 2007. Arsenic exposure in pregnant mice disrupts placental vasculogenesis and causes spontaneous abortion. Toxicol Sci 99: 244-253.

Heape W. 1900. The "sexual season" of mammals and the relation of the "pro-oestrum" to menstruation. Q J Micr Sci 44: 1-70.

Heger S et al. 2003. Overexpression of glutamic acid decarboxylase-67 (GAD-67) in gonadotropin-releasing hormone neurons disrupts migratory fate and female reproductive function in mice. Endocrinology 144: 2566-2579.

Hill DJ. 2011. Nutritional programming of pancreatic beta-cell plasticity. World J Diabetes 2: 119-126.

Holson JF, DeSesso JM, Jacobson CF, Farr CH. 2000. Appropriate use of animal models in the assessment of risk during prenatal development: an illustration using inorganic arsenic. Teratology 62: 51-71.

Hood RD. 1972. Effects of sodium arsenite on fetal development. Bull Environ Contam Toxicol 7: 216-222.

Hood RD, Vedel GC, Zaworotko MJ, Tatum FM, Meeks RG. 1988. Uptake, distribution, and metabolism of trivalent arsenic in the pregnant mouse. J Toxicol Environ Health 25: 423-434.

Hood RD, Vedel-Macrander GC, Zaworotko MJ, Tatum FM, Meeks RG. 1987. Distribution, metabolism, and fetal uptake of pentavalent arsenic in pregnant mice following oral or intraperitoneal administration. Teratology 35: 19-25.

Hopenhayn C et al. 2003. Arsenic exposure from drinking water and birth weight. Epidemiology 14: 593-602.

Hopenhayn-Rich C et al. 2000. Chronic arsenic exposure and risk of infant mortality in two areas of Chile. Environ Health Perspect 108: 667-673.

Hotchkiss AK et al. 2004. A mixture of the "antiandrogens" linuron and butyl benzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion. Biol Reprod 71: 1852-1861.

Hughes MF. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. Toxicol Lett 133: 1-16.

Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ. 2011. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. Toxicol Sci 123: 305-332.

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. Hum Reprod 17: 2839-2841.

International Agence for Research on Cancer (I.A.R.C). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France:2004.

Izquierdo-Vega JA, Soto CA, Sanchez-Pena LC, Vizcaya-Ruiz A, Del Razo LM. 2006. Diabetogenic effects and pancreatic oxidative damage in rats subchronically exposed to arsenite. Toxicol Lett 160: 135-142.

Jackson JA ,Albrecht ED. 1985. The development of placental androstenedione and testosterone production and their utilization by the ovary for aromatization to estrogen during rat pregnancy. Biol Reprod 33: 451-457.

Jana K, Jana S, Samanta PK. 2006. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. Reprod Biol Endocrinol 4: 9.

Kaiser UB, Conn PM, Chin WW. 1997. Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. Endocr Rev 18: 46-70.

Kaltreider RC, Davis AM, Lariviere JP, Hamilton JW. 2001. Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. Environ Health Perspect 109: 245-251.

Kapaj S, Peterson H, Liber K, Bhattacharya P. 2006. Human health effects from chronic arsenic poisoning--a review. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 41: 2399-2428.

Kardong K V. Vertebrados. Anatomía comparada, función y evolución. Madrid, España:Mc Graw-Hill Interamericana,2007.

Kavlock RJ et al. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environ Health Perspect 104 Suppl 4: 715-740.

Keen KL, Wegner FH, Bloom SR, Ghatei MA, Terasawa E. 2008. An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. Endocrinology 149: 4151-4157.

Kitchin KT. 2001. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. Toxicol Appl Pharmacol 172: 249-261.

Knight PG ,Glister C. 2003. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. Anim Reprod Sci 78: 165-183.

Knobil E. 1980. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. Recent Prog Horm Res 36: 53-88.

Kouki T, Okamoto M, Wada S, Kishitake M, Yamanouchi K. 2005a. Suppressive effect of neonatal treatment with a phytoestrogen, coumestrol, on lordosis and estrous cycle in female rats. Brain Res Bull 64: 449-454.

Kouki T, Okamoto M, Wada S, Kishitake M, Yamanouchi K. 2005b. Suppressive effect of neonatal treatment with a phytoestrogen, coumestrol, on lordosis and estrous cycle in female rats. Brain Res Bull 64: 449-454.

Kristoforovic-Ilic MJ, Bjelanovic JM, Ilic MP, Vidovic MM. 2009. Arsenic contamination in environment in the region of Vojvodina. Cent Eur J Public Health 17: 152-157.

Krsmanovic LZ, Hu L, Leung PK, Feng H, Catt KJ. 2009. The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. Trends Endocrinol Metab 20: 402-408.

Lenton EA, Landgren BM, Sexton L, Harper R. 1984. Normal variation in the length of the follicular phase of the menstrual cycle: effect of chronological age. Br J Obstet Gynaecol 91: 681-684.

Levine JE. The Hypothalamus as a Major Integrating Center. In: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine (Conn PM, Freeman ME, eds). New Jersey:Humana Press,2000;75-93.

Levine JE, Bauer-Dantoin AC, Besecke LM, Wolfe AMyc. 1991. Neuroendocrine regulation of the luteinizing hormone releasing hormone pulse generation in the rat. Rec Prog Horm Res 47: 97-153.

Libertun C. Radioinmunoanálisis. Buenos Aires:López Libreros Editores SRL,1980.

Lin W, McKinney K, Liu L, Lakhlani S, Jennes L. 2003. Distribution of vesicular glutamate transporter-2 messenger ribonucleic Acid and protein in the septum-hypothalamus of the rat. Endocrinology 144: 662-670.

Longnecker MP ,Daniels JL. 2001. Environmental contaminants as etiologic factors for diabetes. Environ Health Perspect 109 Suppl 6: 871-876.

Lu X, Arnold LL, Cohen SM, Cullen WR, Le XC. 2003. Speciation of dimethylarsinous acid and trimethylarsine oxide in urine from rats fed with dimethylarsinic acid and dimercaptopropane sulfonate. Anal Chem 75: 6463-6468.

Main KM et al. 2006. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. Environ Health Perspect 114: 270-276.

Malven PV. Neurotransmitters as Regulators of Hypothalamic Function. In: The Neuroendocrinology in Physiology and Medicine (Conn PM, Freeman ME, eds). New Jersey:Humana Press,2000;59-73.

Mandal BK, Ogra Y, Anzai K, Suzuki KT. 2004. Speciation of arsenic in biological samples. Toxicol Appl Pharmacol 198: 307-318.

Mandal BK, Ogra Y, Suzuki KT. 2001. Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. Chem Res Toxicol 14: 371-378.

Mandrup KR et al. 2013. Effects of perinatal ethinyl estradiol exposure in male and female Wistar rats. Reprod Toxicol 42: 180-191.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Braz J Biol 62: 609-614.

Markowski VP, Reeve EA, Onos K, Assadollahzadeh M, McKay N. 2012. Effects of prenatal exposure to sodium arsenite on motor and food-motivated behaviors from birth to adulthood in C57BL6/J mice. Neurotoxicol Teratol 34: 221-231.

Martinez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI. 1992. Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 1852-1855.

Martinez EJ, Kolb BL, Bell A, Savage DD, Allan AM. 2008. Moderate perinatal arsenic exposure alters neuroendocrine markers associated with depression and increases depressive-like behaviors in adult mouse offspring. Neurotoxicology 29: 647-655.

Massrieh W, Derjuga A, Blank V. 2006. Induction of endogenous Nrf2/small maf heterodimers by arsenic-mediated stress in placental choriocarcinoma cells. Antioxid Redox Signal 8: 53-59.

Matthews DR et al. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28: 412-419.

Maull EA et al. 2012. Evaluation of the Association between Arsenic and Diabetes: A National Toxicology Program Workshop Review. Environ Health Perspect .

Mazumder DN. 2005. Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on liver. Toxicol Appl Pharmacol 206: 169-175.

Metzger BE ,Coustan DR. 1998. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. Diabetes Care 21 Suppl 2: B161-B167.

Ministerio de educación, 2008. http://www.mapaeducativo.edu.ar/Atlas/Arsenico.

Miyazaki K, Watanabe C, Mori K, Yoshida K, Ohtsuka R. 2005. The effects of gestational arsenic exposure and dietary selenium deficiency on selenium and selenoenzymes in maternal and fetal tissues in mice. Toxicology 208: 357-365.

Mustonen M et al. 1997. Ontogeny of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA expression in the developing mouse placenta and fetus. Mol Cell Endocrinol 134: 33-40.

Myers LM et al. 2004. The Emerging Science of Endocrine Disruptors.

Nandi D, Patra RC, Swarup D. 2005. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. Toxicology 211: 26-35.

National Research Council. Arsenic in Drinking Water 2001 Update.National Academy Press,2001.

Navas-Acien A et al. 2006. Arsenic exposure and type 2 diabetes: a systematic review of the experimental and epidemiological evidence. Environ Health Perspect 114: 641-648.

Nordberg J ,Arner ES. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med 31: 1287-1312.

Noren K ,Meironyte D. 2000. Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years. Chemosphere 40: 1111-1123.

Page RB. The Anatomy of the Hypothalamo-Hypophyseal Complex. In: The Physiology of Reproduction. (Knobil E, Neill JD, eds). New York:Raven Press,1988;1161-1233.

Pal S ,Chatterjee AK. 2004. Protective effect of methionine supplementation on arsenic-induced alteration of glucose homeostasis. Food Chem Toxicol 42: 737-742.

Palkovits M. Micro- and Macroscopic Structure, Innervation and Vasculature of the Hypothalamus. In: Neuroendocrinology in Physiology ann Medicine (Conn PM, Freeman ME, eds). New Jersey:Humana Press,2000;23-40.

Pallares ME et al. 2013. Prenatal maternal restraint stress exposure alters the reproductive hormone profile and testis development of the rat male offspring. Stress 16: 429-440.

Paul DS, Harmon AW, Devesa V, Thomas DJ, Styblo M. 2007a. Molecular mechanisms of the diabetogenic effects of arsenic: inhibition of insulin signaling by arsenite and methylarsonous acid. Environ Health Perspect 115: 734-742.

Paul DS et al. 2007b. Examination of the effects of arsenic on glucose homeostasis in cell culture and animal studies: development of a mouse model for arsenic-induced diabetes. Toxicol Appl Pharmacol 222: 305-314.

Petrick JS, Blachere FM, Selmin O, Lantz RC. 2009. Inorganic arsenic as a developmental toxicant: in utero exposure and alterations in the developing rat lungs. Mol Nutr Food Res 53: 583-591.

Pfaff T et al. 1999. Alternative splicing generates a novel isoform of the rat metabotropic $GABA_BR1$ receptor. Eur J Neurosci 11: 2874-282.

Pineda J, Herrera A, Antonio MT. 2013. Comparison between hepatic and renal effects in rats treated with arsenic and/or antioxidants during gestation and lactation. J Trace Elem Med Biol 27: 236-241.

Plant TM ,Ramaswamy S. 2009. Kisspeptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the rhesus monkey (Macaca mulatta). Peptides 30: 67-75.

PococK G, Richards CD. Fisiologia humana, la base de la medicina.2002.

Rahman A et al. 2009a. Arsenic exposure during pregnancy and size at birth: a prospective cohort study in Bangladesh. Am J Epidemiol 169: 304-312.

Rahman M, Tondel M, Ahmad SA, Axelson O. 1998. Diabetes mellitus associated with arsenic exposure in Bangladesh. Am J Epidemiol 148: 198-203.

Rahman MM, Ng JC, Naidu R. 2009b. Chronic exposure of arsenic via drinking water and its adverse health impacts on humans. Environ Geochem Health 31 Suppl 1: 189-200.

Rance NE ,Uswandi SV. 1996. Gonadotropin-releasing hormone gene expression is increased in the medial basal hypothalamus of postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 81: 3540-3546.

Ray D ,Melmed S. 1997. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. Endocr Rev 18: 206-228.

Recouvreux MV et al. 2013. Sex differences in the pituitary transforming growth factor-beta1 system: studies in a model of resistant prolactinomas. Endocrinology 154: 4192-4205.

Rembiesa R, Marchut M, Warchol A. 1972. Ovarian--placental dependency in rat. I. Biotransformation of C 21 steroids to androgens by rat placenta in vitro. Steroids 19: 65-84.

Rice S, Ojha K, Whitehead S, Mason H. 2007. Stage-specific expression of androgen receptor, follicle-stimulating hormone receptor, and anti-Mullerian hormone type II receptor in single, isolated, human preantral follicles: relevance to polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab 92: 1034-1040.

Robinson JA, Goy RW. Steroid Hormones and the Ovarian Cycle. In: Comparative Primate Biology, Vol 3 (Alan R., ed).Liss, Inc.,1986;63-91.

Rodriguez VM, Carrizales L, Mendoza MS, Fajardo OR, Giordano M. 2002. Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. Neurotoxicol Teratol 24: 743-750.

Rosenblatt AE ,Burnstein KL. 2009. Inhibition of androgen receptor transcriptional activity as a novel mechanism of action of arsenic. Mol Endocrinol 23: 412-421.

Rossman TG. 2003. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. Mutat Res 533: 37-65.

Rubin BS, Lee CE, Ohtomo M, King JC. 1997. Luteinizing hormone-releasing hormone gene expression differs in young and middle-aged females on the day of a steroid-induced LH surge. Brain Res 770: 267-276.

Russell JA, Douglas AJ, Ingram CD. 2001. Brain preparations for maternity--adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. Prog Brain Res 133: 1-38.

Sadrkhanloo R, Hofeditz C, Erickson GF. 1987. Evidence for widespread atresia in the hypophysectomized estrogen-treated rat. Endocrinology 120: 146-155.

Salazar-Martinez E, Romano-Riquer P, Yanez-Marquez E, Longnecker MP, Hernandez-Avila M. 2004. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. Environ Health 3: 8.

Santoro N et al. 2003. Impaired folliculogenesis and ovulation in older reproductive aged women. J Clin Endocrinol Metab 88: 5502-5509.

Sarkar M, Chaudhuri GR, Chattopadhyay A, Biswas NM. 2003. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. Asian J Androl 5: 27-31.

Sathishkumar K et al. 2011. Prenatal testosterone-induced fetal growth restriction is associated with down-regulation of rat placental amino acid transport. Reprod Biol Endocrinol 9: 110.

Schally AV et al. 1971. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. Science 173: 1036-1038.

Schecter A et al. 2007. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels in livers of U.S. human fetuses and newborns. J Toxicol Environ Health A 70: 1-6.

Schoeters G, Den Hond E, Dhooge W, van Larebeke N, Leijs M. 2008. Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development. Basic Clin Pharmacol Toxicol 102: 168-175.

Schonfelder G et al. 2002. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. Environ Health Perspect 110: A703-A707.

Schwartz J et al. 1998. Paracrine interactions within the pituitary gland. Ann N Y Acad Sci 839: 239-243.

Scott HM, Mason JI, Sharpe RM. 2009. Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. Endocr Rev 30: 883-925.

Seckl JR. 2001. Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. Mol Cell Endocrinol 185: 61-71.

Seminara SB et al. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 349: 1614-1627.

Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: The physiology of reproduction, Vol 1 (Knobil E, Neill JD, eds). New York:Raven Press,1994;189-221.

Sharpe RM ,Skakkebaek NE. 2008. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. Fertil Steril 89: e33-e38.

Sies H ,CADENAS E. 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 311: 617-631.

Silverman A, Pickard G. The Hypothalamus. In: Chemical Neuroanatomy (Emson P, ed). New York:Raven Press,1983.

Smith MS, Freeman ME, Neill JD. 1975. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. Endocrinology 96: 219-226.

Sortino MA, Weiland NG, Wise PM. 1989. Involvement of norepinephrine activity in the regulation of alpha 1 adrenergic receptors in the medial preoptic nucleus of estradiol-treated rats. Life Sci 44: 1223-1229.

Sridaran R, Basuray R, Gibori G. 1981. Source and regulation of testosterone secretion in pregnant and pseudopregnant rats. Endocrinology 108: 855-861.

States JC, Srivastava S, Chen Y, Barchowsky A. 2009. Arsenic and cardiovascular disease. Toxicol Sci 107: 312-323.

Stoica A, Pentecost E, Martin MB. 2000. Effects of arsenite on estrogen receptor-alpha expression and activity in MCF-7 breast cancer cells. Endocrinology 141: 3595-3602.

Stojilkovic SS, Krsmanovic LZ, Spergel DJ, Tomic M, Catt KJ. 1994. Calcium signaling and episodic secretory responses of GnRH neurons. Methods Neurosci 20: 68-84.

Styblo M, Drobna Z, Jaspers I, Lin S, Thomas DJ. 2002. The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update. Environ Health Perspect 110 Suppl 5: 767-771.

Su JY et al. 2013. Perimenopause Amelioration of a TCM Recipe Composed of Radix Astragali, Radix Angelicae Sinensis, and Folium Epimedii: An In Vivo Study on Natural Aging Rat Model. Evid Based Complement Alternat Med 2013: 747240.

Sun M et al. 2012. Maternal androgen excess reduces placental and fetal weights, increases placental steroidogenesis, and leads to long-term health effects in their female offspring. Am J Physiol Endocrinol Metab 303: E1373-E1385.

Sun Y et al. 2004. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. Biomed Chromatogr 18: 501-507.

Takashima K, Ito Y, Gonzalez FJ, Nakajima T. 2008. Different mechanisms of DEHP-induced hepatocellular adenoma tumorigenesis in wild-type and Ppar alpha-null mice. J Occup Health 50: 169-180.

Talsness CE, Andrade AJ, Kuriyama SN, Taylor JA, Vom Saal FS. 2009a. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364: 2079-2096.

Talsness CE, Andrade AJ, Kuriyama SN, Taylor JA, Vom Saal FS. 2009b. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364: 2079-2096.

Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez LC, Aguilar E. 2000. Regulation of growth hormone (GH) secretion by different glutamate receptor subtypes in the rat. Amino Acids 18: 1-16.

Terasawa E, Bridson WE, Nass TE, Noonan JJ, Dierschke DJ. 1984. Developmental changes in the luteinizing hormone secretory pattern in peripubertal female rhesus monkeys: Comparisons between gonadally intact and ovariectomized animals. Endocrinology 115: 223-224.

Thankamony A, Ong KK, Dunger DB, Acerini CL, Hughes IA. 2009. Anogenital distance from birth to 2 years: a population study. Environ Health Perspect 117: 1786-1790.

Thomas DJ, Styblo M, Lin S. 2001. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. Toxicol Appl Pharmacol 176: 127-144.

Tilly JL ,Sinclair DA. 2013. Germline energetics, aging, and female infertility. Cell Metab 17: 838-850.

Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. 2008. Redox regulation of cell survival. Antioxid Redox Signal 10: 1343-1374.

Tresguerres JAF. Fisiología Humana. Madrid:Interamericana- McGraw-Hill,1992.

Tseng CH. 2009. A review on environmental factors regulating arsenic methylation in humans. Toxicol Appl Pharmacol 235: 338-350.

Tseng CH et al. 2000. Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. Environ Health Perspect 108: 847-851.

Tsutsumi R ,Webster NJ. 2009. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. Endocr J 56: 729-737.

United States Pharmacopeia Convention. USP 35 NF 30 U.S Pharmacopeia national formulary.2012.

Universidad nacional experimental politécnica de las fuerzas armadas, 2010. http://morfologiaunefa.blogspot.com/2007/10/gametognesis.html

Urbanski HF, Kim SO, Connolly ML. 1990. Influence of photoperiod and 6-methoxybenzoxazolinone on the reproductive axis of inbred LSH/Ss Lak male hamsters. J Reprod Fertil 90: 157-163.

US EPA. An exposure and risk assessment for arsenic. Report EPA 440/4-85-005. Washington, D.C:U.S Environmental Protection Agency,1982.

Vahter M. 1981. Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats. Environ Res 25: 286-293.

Vahter M. 2002. Mechanisms of arsenic biotransformation. Toxicology 181-182: 211-217.

Vahter M. 2009. Effects of arsenic on maternal and fetal health. Annu Rev Nutr 29: 381-399.

van den DS, Kolovos P, Platts S, Drake AJ, Sharpe RM. 2012. Inter-relationship between testicular dysgenesis and Leydig cell function in the masculinization programming window in the rat. PLoS One 7: e30111.

van Halem D et al. 2010. Subsurface iron and arsenic removal for shallow tube well drinking water supply in rural Bangladesh. Water Res 44: 5761-5769.

Varayoud J et al. 2011. Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites. Endocrinology 152: 1101-1111.

Ventura C et al. 2014. Chlorpyrifos inhibits cell proliferation through ERK1/2 phosphorylation in breast cancer cell lines. Chemosphere 120C: 343-350.

Vizcaya-Ruiz A, Barbier O, Ruiz-Ramos R, Cebrian ME. 2009. Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. Mutat Res 674: 85-92.

Walker M ,Fosbury D. 2009. Arsenic, As((III)), and tungsten in Nevada County's private water supplies. J Water Health 7: 293-301.

Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. 2008. Androgen actions and the ovary. Biol Reprod 78: 380-389.

Wang A, Holladay SD, Wolf DC, Ahmed SA, Robertson JL. 2006. Reproductive and developmental toxicity of arsenic in rodents: a review. Int J Toxicol 25: 319-331.

Warshaw ML, Johnson DC, Khan I, Eckstein B, Gibori G. 1986. Placental secretion of androgens in the rat. Endocrinology 119: 2642-2648.

Welsh M et al. 2008. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. J Clin Invest 118: 1479-1490.

Wetherill YB et al. 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. Reprod Toxicol 24: 178-198.

Wetzel M et al. 2011. Introduction of an electron withdrawing group on the hydroxyphenylnaphthol scaffold improves the potency of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (17beta-HSD2) inhibitors. J Med Chem 54: 7547-7557.

Wolf C, Jr. et al. 1999. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. Toxicol Ind Health 15: 94-118.

Wolf CJ, Hotchkiss A, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray LE, Jr. 2002. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study. Toxicol Sci 65: 71-86.

Woodruff TK et al. 1996. Inhibin A and inhibin B are inversely correlated to follicle-stimulating hormone, yet are discordant during the follicular phase of the rat estrous cycle, and inhibin A is expressed in a sexually dimorphic manner. Endocrinology 137: 5463-5467.

Woodruff TK, Meunier H, Jones PBC, Hsueh AJW, Mayo KE. 1987. Rat inhibin: molecular cloning of a- and b-subunit complementary deoxyribonucleic acids and expression in the ovary. Mol Endocrinol 1: 561-568.

World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water Quality. Geneva:World health organization,1993.

Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE. 2006. Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. J Anim Sci 84: 2316-2337.

Xi S, Jin Y, Lv X, Sun G. 2010. Distribution and speciation of arsenic by transplacental and early life exposure to inorganic arsenic in offspring rats. Biol Trace Elem Res 134: 84-97.

Xia Y, Roman LJ, Masters BS, Zweier JL. 1998. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. J Biol Chem 273: 22635-22639.

Yu WH, Seeburg PH, Nicolics Kyc. 1988. Gonadotropin-releasing hormone-associate peptide exerts a prolactin-inhibiting and weak gonadotropin-releasing activity in vivo. Endocrinology 123: 390-395.

Zakharyan RA et al. 2001. Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. Chem Res Toxicol 14: 1051-1057.

Zuo Z, Mahesh VB, Zamorano PL, Brann DW. 1996. Decreased gonadotropin-releasing hormone neurosecretory response to glutamate agonists in middle-aged female rats on proestrus afternoon: a possible role in reproductive aging? Endocrinology 137: 2334-2338.