



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**EFFECTO DEL BISFENOL-A EN LA DIFERENCIACIÓN Y ACTIVIDAD  
ESTEROIDOGÉNICA DE LAS CÉLULAS DE LEYDIG PERINATALES DEL  
CONEJO**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ALEXIS PAULINA ORTEGA GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS  
DR. HORACIO MERCHANT LARIOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR  
DR. JESÚS CHIMAL MONROY  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DR. FÉLIX RECILLAS TARGA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE DE 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad y el privilegio de formarme profesionalmente en sus aulas.

Agradezco al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM y al Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM por el apoyo y las facilidades otorgadas durante la realización de este proyecto.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con el registro de número 587621 para la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Este trabajo fue financiado por el proyecto CONACYT Efecto del Bisfenol A sobre la programación del desarrollo gonadal del conejo: Estudio *in vivo* e *in vitro* (No. 166012) a cargo del Dr. Horacio Merchant Larios, en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco de manera muy especial a mi tutor principal, el Dr. Horacio Merchant Larios por confiar en mí y siempre mostrar disposición e interés, compartir sus conocimientos, su enseñanza y además orientarme y guiarme a lo largo de mi formación académica.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial el Dr. Jesús Chimal Monroy y al Dr. Félix Recillas Targa por su valiosa orientación y seguimiento a lo largo de la realización de este proyecto.

Agradezco en especial a la Dra. Verónica Díaz Hernández por su invaluable apoyo, disposición, asesoría y seguimiento en la estandarización y manejo de las técnicas de biología molecular e inmunofluorescencia desarrolladas para este proyecto. Así mismo por instruirme en el manejo de los conejos y en la obtención y procesamiento de las muestras biológicas utilizadas en este proyecto.

Agradezco especialmente al técnico M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia por el apoyo continuo en el manejo y traslado de los conejos, la obtención de muestras biológicas y la obtención de los cortes para la realización de las inmunofluorescencias, así como la preparación de material utilizado en la realización del proyecto.

A la MVZ Adriana Castro Domínguez por el apoyo en el correcto manejo de los conejos, la administración del tratamiento y la obtención de las muestras biológicas, por el procesamiento de muestras en epón y la obtención de cortes finos y semifinos utilizados en mi proyecto de Doctorado.

Al M. en C. Pedro Collazo Saldaña por el apoyo brindado en el cuidado del bioterio, en las técnicas de biología molecular e inmunofluorescencias mostradas en este trabajo.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, responsable de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM por su asesoría en el uso y manejo del microscopio confocal, así como la obtención de las imágenes analizadas durante este proyecto.

Agradezco a la M. en C. Patricia de la Torre de la Unidad de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM por el apoyo para la secuenciación de los amplicones utilizados en este proyecto.

A la MVZ Georgina Díaz Herrera responsable del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por su invaluable apoyo e instrucción sobre el manejo y mantenimiento de animales de laboratorio.

Agradezco a la Dra. Tzipe Silvia Govezensky Zack por su invaluable apoyo y asesoría en el manejo y análisis estadístico de los datos obtenidos durante mi proyecto de doctorado.

A la M. en C. Elisa Gutiérrez Hernández y a la MVZ Eloisa Chino Rosario, del módulo de cunicultura de la FES Cuautitlán, UNAM.

Al Dr. Paul Gaytán Colín, M.C. Eugenio López-Bustos, QI Santiago Becerra Ramírez y al Dr. Jorge Yañez, miembros de la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM, por síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este proyecto.

Agradezco al Dr. Félix Recillas Targa, a la Biol. Georgina Guerrero Avendaño y al QBP Hober Nelson Núñez Martínez por las facilidades y asesoría brindada en su laboratorio en el Instituto de Fisiología Celular para el uso y manejo del equipo Termociclador (StepOne™ Real-Time PCR Systems -Applied Biosystems).

## DEDICATORIAS

A mi mamá Patricia Ortega, por ti soy quien soy, este logro es para ti. Gracias por todo tu amor, tu cariño y sobre todo por siempre confiar en mí. Te amo mami.

A mi esposo Javier Alvarado, eres un pilar en mi vida, gracias por acompañarme en este camino, siempre me alientas a ser mejor, me apoyas y crees en mí. Gracias infinitas por tu amor y cariño, te amo.

A toda mi familia, primos y tíos por todo su invaluable apoyo y cariño. Los amo.

Con especial cariño y en memoria de mis abuelos Manuela García, Damián Ortega y mis tíos Juan Ortega y Graciela Casarín. Siempre los llevaré en mi corazón.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCIÓN .....	8
Genes implicados en la diferenciación de las células de Leydig Fetales .....	13
Origen de las células de Leydig fetales.....	16
Esteroidogénesis en las células de Leydig .....	18
Bisfenol A como disruptor endocrino.....	21
JUSTIFICACIÓN .....	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	27
HIPÓTESIS .....	28
OBJETIVO GENERAL .....	29
OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
Animales .....	30
Tratamiento.....	30
Obtención de las muestras .....	31
Sexado de embriones .....	31
Extracción de RNA total y transcripción reversa .....	32
Síntesis de DNA complementario .....	32
PCR en tiempo real.....	33
Inmunofluorescencia para la detección de las proteínas CYP11A1 Y KI67 .....	36
Obtención de suero y ensayo de testosterona .....	37
Secciones semifinas y microscopía electrónica de transmisión.....	38
Análisis estadístico.....	38
Sexado de los embriones.....	38

Extracción de RNA.....	39
Síntesis de cDNA.....	40
Gradientes de temperatura .....	41
Validaciones para qPCR .....	43
RESULTADOS .....	45
Niveles de expresión de SF1, CYP11A1, 3 $\beta$ -HSD y RA en testículos de fetos de conejos y recién nacidos de controles y tratados con BPA.....	45
Concentración de testosterona en suero de fetos de conejos y recién nacidos controles y tratados con BPA.....	50
Proliferación de las células de Leydig fetales en testículos de conejos de controles y tratados con BPA.....	52
Diferenciación de las células de Leydig fetales.....	56
DISCUSIÓN .....	60
CONCLUSIÓN .....	70
ANEXO IMÁGENES DE CURVAS DE VALIDACIÓN Y DE FUSIÓN.....	71
BIBLIOGRAFÍA .....	79
ANEXO: ARTÍCULO REQUISITO .....	93

## RESUMEN

El bisfenol A (BPA) es un monómero ampliamente utilizado en la fabricación de plásticos de policarbonato y se encuentra en una gran variedad de envases para almacenar alimentos y bebidas. La principal vía de exposición al BPA es a través de la ingesta, y diferentes reportes en humanos han indicado la presencia de BPA en orina, sangre, líquido amniótico y sangre de cordón umbilical. Dentro del cuerpo, se sabe que el BPA actúa como un disruptor endocrino debido a su capacidad para unirse a los receptores de estrógenos y causar diferentes efectos adversos.

El BPA atraviesa la barrera placentaria y llega a los órganos fetales, incluidas las gónadas. En los testículos, las células de Leydig fetales (CLF) producen la testosterona necesaria para el establecimiento del fenotipo masculino. Aunque sabemos que, el BPA afecta la proliferación y diferenciación de las CLF durante el desarrollo gonadal, los mecanismos moleculares involucrados en la perturbación de ambos procesos celulares son contradictorios. Existen dos diferencias notables en el patrón de desarrollo entre especies: contexto histológico y la etapa del desarrollo en que se establece la población de CLF. Aunque la especie mejor estudiada ha sido el ratón; sus gónadas embrionarias carecen de corteza y médula, mientras que, en la mayoría de las especies, incluido el humano, forman ambos compartimentos tisulares. El conejo proporciona un buen modelo para estudiar el efecto disruptivo del BPA en las CLF y las posibles consecuencias endocrinas posnatales en las células adultas de Leydig (CLA). Aquí, investigamos el impacto del BPA administrado a conejas preñadas en la población de CLF de los testículos en desarrollo. Usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

cuantitativa (qRT-PCR, por sus siglas en inglés), evaluamos el nivel de la expresión de los genes *SF1*, *CYP11A1*, *3 $\beta$ -HSD* y del receptor para andrógenos (*RA*), mientras que los niveles de testosterona sérica fetal se midieron mediante ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés). Estos niveles se correlacionaron tanto con la actividad mitótica como con la diferenciación ultraestructural de las CLF por microscopía confocal y electrónica, respectivamente. Los resultados indican que el BPA altera los niveles de expresión de genes esenciales implicados en la señalización paracrina de andrógenos, por un lado, el BPA aumento en los niveles de expresión del gen *SF1* en etapas fetales y posteriormente los niveles disminuyeron en la etapa postnatal, al contrario de lo que se observó en la expresión de los genes *CYP11A1*, *3 $\beta$ -HSD* y *RA*, donde los niveles de expresión reflejaron una disminución en las etapas fetales y un incremento en la etapa posnatal. El BPA también disminuyó la proliferación y diferenciación de las CLF en etapas fetales y aumentó los niveles de testosterona sérica después del nacimiento. Por lo tanto, el BPA puede cambiar los niveles posnatales de testosterona sérica debido a una disminución de las CLF formadas por células progenitoras de Leydig proliferativas y CLF citodiferenciadas no proliferativas.

## ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a monomer widely used in the manufacturing of polycarbonate plastics and is found in an extensive variety of containers and packaging for storing food and beverages. The main route of exposure to BPA is through ingestion and different reports in humans have indicated the presence of BPA in urine, blood, amniotic fluid, and umbilical cord blood. Within the body, BPA is known to act as an endocrine disruptor due to its ability to bind to estrogen receptors and cause different adverse effects.

The endocrine disruptor Bisphenol A (BPA) crosses the placental barrier and reaches the fetal organs, including the gonads. In the testis, fetal Leydig cells (FLC) produce the testosterone required for the male phenotype and the homeostatic cell-cell signaling in the developing testis. Although it is known that BPA affects cell proliferation and differentiation in FLC, results concerning the mechanism involved are contradictory, mainly due to differences among species. Fast-developing fetal gonads of rodents lack a cortex and medulla, whereas species with more extended gestation periods form these two tissue compartments. The rabbit provides a good subject for studying the disruptive effect of BPA in FLC and possible postnatal endocrine consequences in adult Leydig cells (ALC). Here, we investigated the impact of BPA administered to pregnant rabbits on the FLC population of the developing testes. Using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), we assessed the levels of *SF1*, *CYP11A1*, *3 $\beta$ -HSD*, and androgen receptor (*AR*) genes, and levels of fetal serum testosterone were measured by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). These levels

correlated with both the mitotic activity and the ultrastructural differentiation of the FLC by confocal and electron microscopy, respectively. The results indicate that BPA alters the expression levels of essential genes involved in paracrine androgen signaling. On the one hand, BPA increased the expression levels of the *SF1* gene in fetal stages and subsequently the levels decreased in the postnatal stage. Contrary to what was observed in the expression of the *CYP11A1*, *3 $\beta$ -HSD* and *AR*, where the expression levels reflected a decrease in the fetal stages and an increase in the postnatal stage. BPA also decreased the proliferation and differentiation of FLCs in fetal stages and increased serum testosterone levels after birth. Thus, BPA may change the postnatal levels of serum testosterone due to the impaired FLC population formed by the proliferating stem and non-proliferating cytodifferentiated FLC.

## ABREVIATURAS

- 17 $\beta$ -HSD: 17 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa.
- 3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa  $\Delta^{5-4}$  isomerasa.
- 5 $\alpha$ -DHT: Dihidrotestosterona.
- ALC: Del inglés Adult Leydig cells. Células de Leydig adultas.
- AMH: Del inglés Anti-Mullerian Hormone. Hormona antimülleriana.
- AMHR2: Del inglés Anti-Mullerian Hormone Receptor Type 2. Receptor de hormona antimülleriana tipo 2.
- AR: Androgen receptor
- ARX: Del inglés Aristaless-related homeobox. Homeobox relacionado con Aristaless.
- BPA: Bisfenol A.
- CGPs: Células germinales primordiales.
- CLA: Células de Leydig adultas.
- CLF: Células de Leydig fetales.
- Ctnnb1: Del inglés: cadherin-associated protein, beta 1.
- CYP11A1: Del inglés Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1. Citocromo P450 familia 11 subfamilia A miembro 1.
- CYP17A1: 17 $\alpha$ -Hidroxilasa, 17,20-liasa.
- DES: Dietilestilbestrol.
- DHH: Del inglés Desert Hedgehog.
- DNA: Del inglés Deoxyribonucleic acid. Ácido desoxirribonucleico.
- *dpc*: días post-coitum.
- *dpp*: días post-partum.
- ELISA: Del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima.
- FAO: Del inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- FLC: Del inglés Fetal Leydig cells. Células de Leydig fetales.
- GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

- H2AX: Del inglés H2A histone family member X. Miembro X de la familia de histonas H2A.
- HPRT: Del inglés Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase. Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa.
- INSL3: Del inglés Insulin-like factor 3. Factor similar a la insulina 3.
- LOAEL: Del inglés Lowest observed adverse effect level. Nivel más bajo con efecto adverso observado.
- MAFB: Del inglés V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. Homólogo B del oncogén del fibrosarcoma musculoaponeurótico V-maf.
- NCAM: Del inglés Neural cell adhesion molecule. Molécula de adhesión de células neurales.
- NCoR: Del inglés Nuclear receptor co-repressor. Correpresor del receptor nuclear.
- NOAEL: Del inglés No observed adverse effect level. Máximo nivel de dosis al que no se observan efectos adversos.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- P450 scc: Del inglés Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme. Enzima de escisión de la cadena lateral del citocromo P450.
- PDGF: Del inglés Platelet-derived growth factor. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PDGFR- $\alpha$ : Del inglés Platelet-derived growth factor receptor A. Receptor A del factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PTCH1: Del inglés Protein patched homolog 1. Homólogo 1 de la proteína Patched.
- RA: Receptor a andrógenos.
- REL: Retículo endoplasmático liso.
- RNA: Del inglés Ribonucleic acid. Ácido ribonucleico.
- RT-qPCR: Del inglés quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa.

- SDT: Síndrome de disgenesia testicular.
- SEM: Media  $\pm$  Error estándar.
- SF1: Del inglés Steroidogenic factor 1. Factor esteroideogénico 1.
- SMRT: Del inglés Silencing mediator for thyroid hormone receptors. Mediador silenciador de los receptores de la hormona tiroidea
- SOX9: Del inglés SRY-box transcription factor 9. Factor de transcripción 9 de la caja SRY.
- SRY: Del inglés Sex-determining region of the Y chromosome. Región determinante del sexo en el cromosoma Y.
- STAR: Del inglés Steroidogenic acute regulatory protein. Proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda.
- Stra8: Del inglés stimulated by retinoic acid. Estimulado por ácido retinoico.
- VCAM1: Del inglés Vascular cell adhesion molecule. Molécula de adhesión de células vasculares.
- Wt1: Del inglés Wilms' Tumor Gene 1
- YWHAZ: Del inglés Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta. Proteína de activación de tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa.

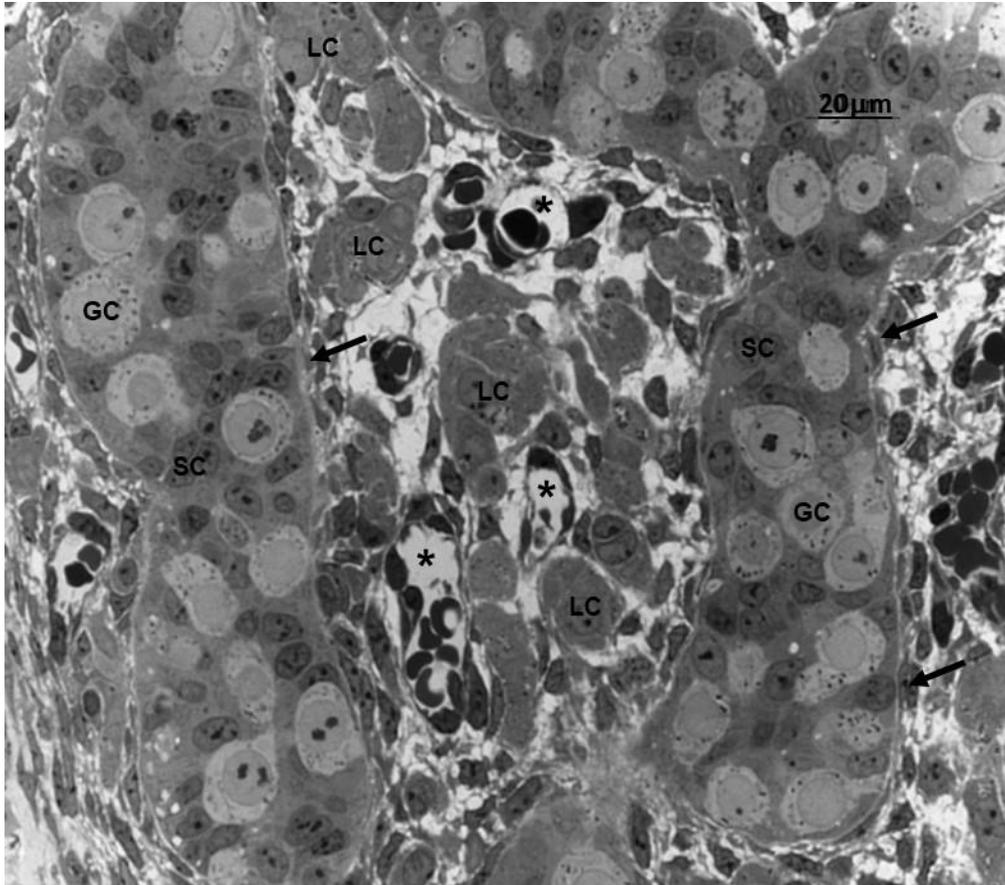
## INTRODUCCIÓN

El paradigma de la diferenciación sexual en mamíferos fue establecido por Alfred Jost (1947) utilizando al conejo como modelo biológico, en el que se estableció que los genes *Sry* y *Sox9*, son los responsables de la determinación sexual, y muestran un patrón de expresión en la gónada del conejo semejante al humano (Díaz-Hernández et al., 2008).

En embriones de mamíferos, el proceso de determinación sexual y la diferenciación morfológica y endocrina del testículo dependen sólo de las células somáticas. El gen *Sry* (Sex-determining region of the Y chromosome) es el encargado de determinar el destino de la gónada bipotencial, al activar las vías de señalización necesarias para la diferenciación hacia un testículo (Koopman et al., 1991). La expresión del gen *Sry*, induce el incremento en la expresión de *Sox9* (SRY-box transcription factor 9) en las células somáticas de pre-Sertoli del testículo fetal (Sekido & Lovell-Badge, 2008). Ambos genes codifican para factores de transcripción iniciando una cascada de señalización que lleva a la diferenciación de los cordones seminíferos integrados por células de Sertoli y las células germinales primordiales (CGPs), también llamadas gonocitos durante el período de migración y colonización de la gónada morfológicamente indiferenciada bipotencial. En torno a los cordones seminíferos en formación, se encuentra el tejido estromático formado por vasos sanguíneos y células mesenquimáticas precursoras de fibroblastos, células peritubulares y células de Leydig (Figura 1). La producción de la molécula de señalización Desert Hedgehog (DHH) por las células de Sertoli, específica a las células de Leydig fetales a través de la unión a su receptor llamado homólogo 1 de

la proteína Patched (PTCH1, por sus siglas en inglés) (Yao et al., 2002), a su vez, las células de Leydig producen Activina A, necesaria para la expansión de los cordones seminíferos (Archambeault & Yao, 2010).

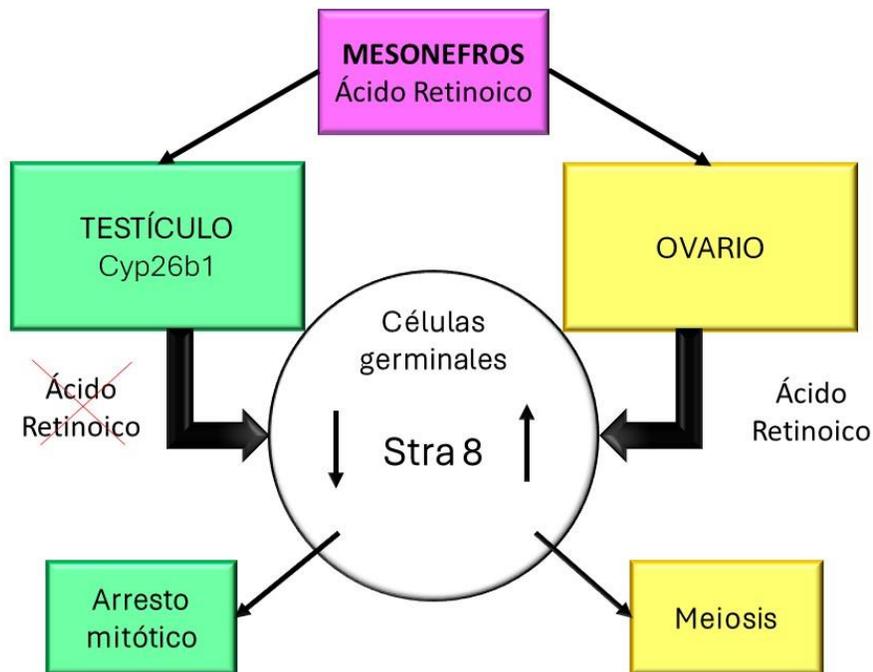
Las células somáticas de Sertoli y de Leydig controlan la diferenciación sexual gonadal mediante la secreción de los factores endocrinos hormona antimülleriana (AMH, por sus siglas en inglés) y testosterona. Estos factores están encargados de masculinizar el tracto genital masculino al inducir el desarrollo de los conductos de Wolff e inhibir los conductos de Müller, respectivamente e inducir la transformación masculina del seno urogenital y genitales externos.



**Figura 1. Corte transversal de testículo de conejo a los 21 dpc.** Los cordones testiculares están formados por las células de Sertoli (SC) y las células germinales (GC). Por fuera de los cordones se distingue el tejido estromático donde se localizan además de las células de Leydig (LC), las células mesenquimales formando fibroblastos, las células endoteliales formando vasos (\*) y las células peritubulares (flechas) rodeando a los cordones testiculares (Imagen obtenida en el laboratorio a cargo del Dr. Horacio Merchant Larios, en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

La diferenciación de las CGPs a espermatogonias está estrechamente asociada a las células de Sertoli y a las células de Leydig (A. M. Clark, et al., 2000; Mark J Bitgood, et al., 1996). En el ratón, el mesonefros adyacente a la gónada de ambos sexos produce ácido retinoico, encargado de inducir la expresión del gen *Stra8* (Stimulated by retinoic acid, por sus siglas en inglés) en las CGPs para que

entren en meiosis en el ovario (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Sin embargo, en el testículo la expresión de *Sf1* en las células de Leydig y Sertoli induce la expresión *Cyp26b1* cuyo producto es la enzima que cataliza la degradación del ácido retinoico, previniendo el inicio de la meiosis de los gonocitos, por lo que entran en un período de arresto mitótico de una manera sincronizada hasta la pubertad cuando se inicia la meiosis (Figura 2) (Bowles et al., 2006; Kashimada et al., 2011).



**Figura 2. Diferenciación de las células germinales.** El ácido retinoico activa la expresión del gen *Stra8* estimulando la entrada en meiosis de las células germinales en el ovario. En el testículo la enzima *Cyp26b1*, sintetizada por las células de Sertoli y las células de Leydig, degrada al ácido retinoico inhibiendo la entrada a meiosis de las células germinales (Modificada de Bowles et al., 2010).

En contraste con el ratón, en especies de mayor tamaño, como el conejo las células germinales entran en meiosis después que el mesonefros adyacente ha sufrido

regresión, descartando a este órgano como la fuente de ácido retinoico, además de que la entrada en arresto mitótico en los testículos de conejo es un proceso asincrónico y asimétrico que dura varios días, semanas e incluso meses como en el humano. (Gondos et al., 1977; Motta et al., 1997)

Las células de Leydig se desarrollan durante la vida fetal y se caracterizan por su capacidad para producir andrógenos, específicamente testosterona responsable de la masculinización del sistema urogenital durante el desarrollo, además producen al Factor similar a la insulina 3 (INSL3, por sus siglas en inglés), necesario para inducir la primera fase transabdominal del descenso testicular (Ivell et al., 2022). Las células de Leydig muestran cambios morfológicos, estructurales y endocrinos en diferentes etapas del desarrollo de los testículos. Se han caracterizado dos poblaciones de células de Leydig: las células de Leydig fetales (CLF) y las células de Leydig adultas (CLA) (Habert et al., 2001). Ambas poblaciones se identificaron por primera vez en embriones de cerdo y desde entonces se han confirmado en otras especies incluyendo rata, humano, conejo, ratón, cerdo, hámster y hurón (Roosen-Runge y Anderson 1959; Baillie 1964; Niemi y Korman 1964; Lording y De Kretser 1972; Gondos et al., 1977; Mendis-Handagama y Ariyaratne 2001; Yao et al., 2002)

Aunque las CLF han sido ampliamente estudiadas, su origen y destino siguen siendo motivo de controversia. Algunos autores indican que el origen de la población fetal y adulta es distinto debido a sus diferencias morfológicas y funcionales (Kerr & Knell, 1988; Shima et al., 2013). Sin embargo, otros estudios han sugerido que la población de CLA deriva del mismo linaje de CLF, pero pasan por un periodo de

“desdiferenciación” y se mantienen latentes hasta la pubertad (Tapanainen et al., 1984; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001; Svingen & Koopman, 2013).

En ratones, la primera población de CLF aparece a los 12,5 *dpc* (días posteriores al coito) y comienzan a producir testosterona (Merchant-Larios & Moreno-Mendoza, 1998). En conejos a los 17 *dpc*, en ratas aparece a los 15 *dpc*, y en humanos a las ocho semanas de gestación (Bjerregaard, et al., 1974; Voutilainen, 1992). Su número aumenta considerablemente en los testículos fetales tempranos, y posteriormente, las CLF entran gradualmente en un arresto mitótico y la población se estabiliza, hasta casi desaparecer durante el período perinatal (Barsoum et al., 2013).

#### *Genes implicados en la diferenciación de las células de Leydig Fetales*

Además de la expresión de Desert Hedgehog (DHH) por las células de Sertoli, que se une a su receptor Patched 1 (PTCH1) localizado en algunas células del estroma precursoras de Leydig, se ha determinado la participación de otros factores reguladores en el establecimiento de la población de las células de Leydig como el Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), la Hormona antimülleriana (AMH, por sus siglas en inglés), la proteína Homeobox relacionado con Aristaless (ARX, por sus siglas en inglés), entre otros (Barsoum & Yao, 2010).

El gen *Sf1*, codifica para un receptor nuclear huérfano que se expresa desde el inicio de la especificación de las células precursoras de Leydig, ubicadas entre

las células del estroma de la cresta gonadal. Se ha demostrado que es esencial para la especificación de células productoras de esteroides y regula la vía de expresión de los genes que codifican a las enzimas involucradas en el proceso de esteroidogénesis: P450<sub>scc</sub> (Enzima de escisión de la cadena lateral del citocromo P450), CYP17A1 (citocromo P450C17), 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa), 17 $\beta$ -HSD (17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa) y StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) (Shima et al., 2015). Aunque las células que expresan *Sf1* en la cresta gonadal también incluyen a las células precursoras de Sertoli, estas están ubicadas en los cordones seminíferos, por lo que se distinguen con facilidad de las precursoras de Leydig localizadas en el estroma.

Los cambios en los niveles de expresión del *SF1* están asociados con fenotipos reproductivos severos. Ratones deficientes en *Sf1* muestran defectos en el desarrollo de las gónadas y las glándulas suprarrenales, lo que indica el rol esencial que juega dicho gen en el establecimiento del tejido esteroidogénico en la cresta urogenital (Hatano et al., 1996; Luo et al., 1994; Sadovsky et al., 1995; Yao & Barsoum, 2007). Jeyasuria y col., 2004, emplearon el alelo Amhr2-Cre para hacer un ratón deficiente en *Sf1* específico en las células de Leydig del testículo del ratón a los 11.5 *dpc*, y observaron un déficit en la proliferación en las células de Leydig fetales, así como una reducción notable en la esteroidogénesis y la síntesis de testosterona, lo que resultó en testículos criptorquídicos y un desarrollo alterado del aparato reproductor indicando una clara disfunción de las CLF.

La expresión del gen *Dhh* es esencial en varios procesos durante el desarrollo embrionario (Bitgood et al., 1996b). En el testículo, la proteína DHH es

producida por las células de Sertoli y es posible detectarlo en ratón a los 11.5 *dpc*. Su receptor PTCH1 se expresa de manera prominente en las CLF y otras células estromales en los testículos de ratón a los 12.5 y 13.5 *dpc*. En ratones deficientes en *Dhh*, el número de células de Leydig disminuye drásticamente a los 13.5 y 14.5 *dpc*. En otro estudio *in vitro* empleando crestas urogenitales de ratón, observaron que la inhibición de la señalización de DHH disminuye la diferenciación de las células de Leydig, sin afectar la diferenciación de las de las células de Sertoli, además de no afectar la migración de las células mesonéfricas, proceso indispensable para la diferenciación histológica del testículo en mamíferos. Estos datos sugieren que, aunque DHH no es un marcador específico de las CLF, la señalización de DHH/PATCHED1 es esencial para su diferenciación (Yao et al., 2002)

Otro gen implicado en la diferenciación de las CLF es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Pdgf*, por sus siglas en inglés) ya que se requiere para el desarrollo embrionario y postnatal de las células de Leydig (Andrae et al., 2008). En ratones, el RNAm de *Pdgf* se sobre-expresa en las células de Sertoli a los 12.5 *dpc*, así como su receptor PDGFR- $\alpha$  en células mesenquimales del estroma. La delección de *Pdgfr- $\alpha$*  en testículos de ratones reveló alteraciones en la formación de los cordones testiculares y estroma, así como una disminución en la proliferación y diferenciación de las células de Leydig. Estos resultados indican que la señalización entre PDGF/PDGFR- $\alpha$  se requiere para la diferenciación de las células de Leydig fetales (Brennan et al., 2003).

El gen *Arx* (Aristaless related homeobox) es un factor de transcripción que, aunque no se expresa en las CLF, es posible detectarlo en los fibroblastos del testículo temprano. Los ratones deficientes de *Arx* muestran severos defectos en la población de las CLF, lo que sugiere que la interacción entre los dos tipos celulares es esencial para la especificación de las CLF en el estroma intersticial del testículo fetal (Kitamura et al., 2002).

Por otro lado, el gen *Amh* que se expresa en las células de Sertoli, codifica para la hormona anti-Mülleriana (AMH, por sus siglas en inglés), necesaria para la regresión de los conductos de Müller en los fetos XY (Lee & Donahoe, 1993). El receptor de AMH (AMHR2) se localiza en las células de Leydig adultas y fetales y la deficiencia de AMH y AMHR2 en ratones incrementa el número de células de Leydig (Racine et al., 1998). Utilizando un ratón deficiente de *Amh* y *Amhr2*, se produjo una marcada hiperplasia de células de Leydig, concluyendo que la AMH induce la proliferación de las CLF (Behringer et al., 1994; Mishina et al., 1996).

#### *Origen de las células de Leydig fetales*

De acuerdo con la literatura, la población de CLF, localizada en el estroma del testículo fetal, puede derivarse de los mesonefros y/o del epitelio celómico. En embriones de mamífero la formación de la cresta gonadal se debe a la proliferación del epitelio celómico en la región ventral de los mesonefros (riñones fetales). La cresta gonadal temprana, está formada por los cordones sexuales primarios derivados del epitelio celómico y el estroma constituido por la invasión de los vasos sanguíneos y células mesenquimatosas procedentes de la región mesonéfrica

adyacente (Merchant-Larios & Moreno-Mendoza, 1998). Algunos estudios indican que las CLF se desarrollan a partir de las células mesenquimatosas, ya que en experimentos de injertos de gónadas/mesonefros y de cocultivos, se observó que las células progenitoras de las células de Leydig aparecen primero en los mesonefros y luego migran hacia el estroma (Buehr et al., 1993; Martineau et al., 1997; Tilmann & Capel, 1999). Sin embargo, si se bloquea la migración de las células de los mesonefros, la diferenciación de las CLF no se ve afectada, lo que sugiere que los mesonefros no son la única fuente de las CLF (Merchant-Larios & Moreno-Mendoza, 1998; Yao & Capel, 2002).

El epitelio celómico prolifera activamente en las crestas genitales embrionarias y se ha propuesto que contribuye a la formación del estroma. Células que migran del epitelio celómico positivas a la molécula Homólogo B del oncogén del fibrosarcoma musculoaponeurótico V-maf (MAFB, por sus siglas en inglés) y células positivas a la Molécula de adhesión de células vasculares (VCAM1, por sus siglas en inglés) provienen de la interfase gónada-mesonefros (DeFalco et al., 2011; Karl & Capel, 1998; Schmahl et al., 2000). Zhang y colaboradores (2015), observaron que, en ratones deficientes, la inactivación del gen *tumor de Wilms 1* (*Wt1*, por sus siglas en inglés) en células de Sertoli, resultó en la transdiferenciación de células de Sertoli a células de Leydig, lo que indica que la diferenciación entre estos dos tipos de células está controlada por *Wt1* y probablemente tanto Sertoli y como Leydig se originan a partir de las mismas células progenitoras.

Por otra parte, se ha propuesto que las células esteroideogénicas de la glándula suprarrenal y de la gónada se derivan de un primordio común durante la

embriogénesis temprana. La presencia de células positivas a SF1 en la cresta urogenital y su posterior segregación entre los primordios gonadal y suprarrenal, apoyan el origen común (Hatano et al., 1996; Val et al., 2003).

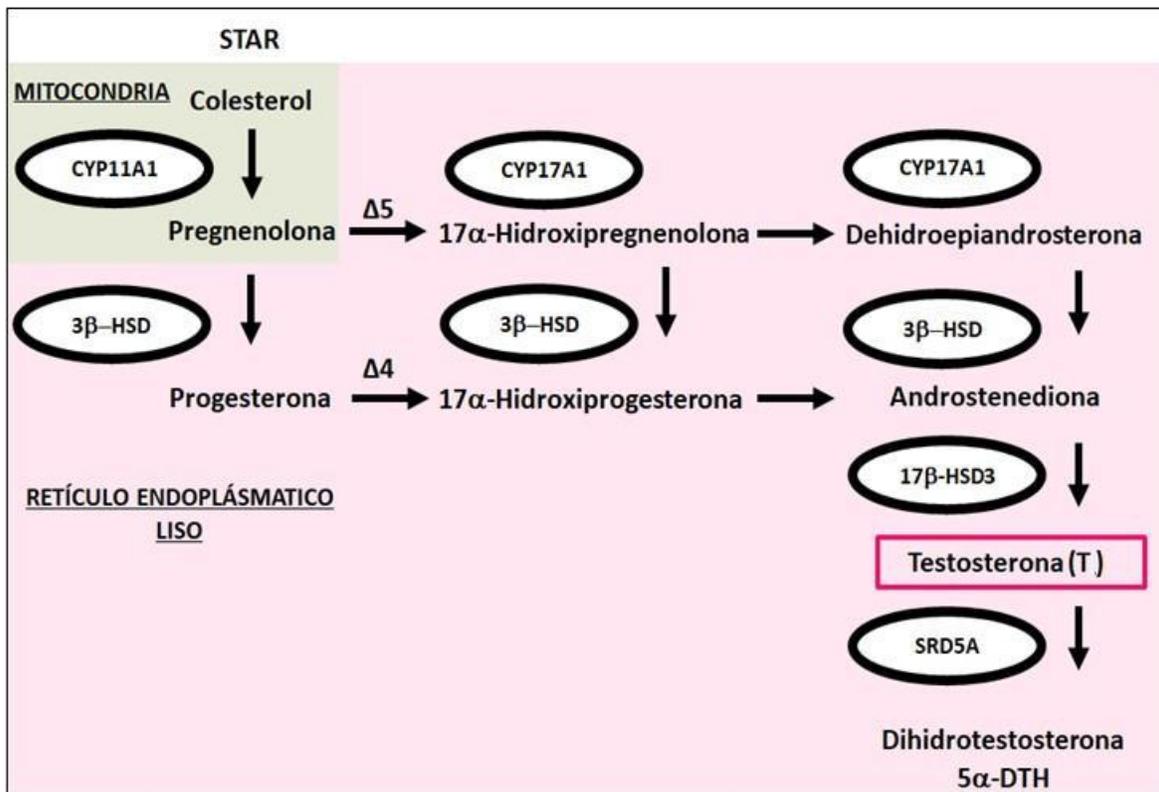
La invasión de la vasculatura en testículos de ratón ocurre entre los 11.5 y 12.5 *dpc*. Este proceso facilita la migración dirigida de células progenitoras de estroma hacia la cresta genital (DeFalco et al., 2011) y la aparición de las CLF (Davidoff et al., 2009). Por lo tanto, algunas células asociadas a la vasculatura, como los pericitos, probablemente también sean progenitoras de las CLF.

#### *Esteroidogénesis en las células de Leydig*

El principal andrógeno sintetizado por las células de Leydig es la testosterona. Esta hormona, mantiene la función reproductiva en los testículos adultos, mientras que, en la etapa fetal, la testosterona es necesaria para la diferenciación de los conductos deferentes y vesículas seminales, así como para la transformación del mesonefros en epidídimo. En el caso de los genitales externos, la testosterona es transformada a dihidrotestosterona ( $5\alpha$ -DHT) en los tejidos precursores de la región del seno urogenital. De esta manera, a partir del tubérculo genital, se forma la cabeza del pene, los pliegues cloacales se fusionan contribuyendo a la formación del falo y el rafe uretral. Además, las tumefacciones genitales se unen y forman las bolsas escrotales. Por otra parte, los andrógenos producidos en la etapa fetal también participan en la masculinización del cerebro (Griswold & Behringer, 2009). El nivel máximo de testosterona en la etapa fetal se alcanza alrededor de los 17-18 *dpc* en el ratón (Gondos et al., 1977; O'Shaughnessy

et al., 2000), en conejos de los 21-26 *dpc* (Veysiere et al., 1976; Anderson & Mendelson, 1988), en tanto que, en humanos, entre las semanas 12 y 14 de la gestación (Tapanainen et al., 1981).

La testosterona puede ser sintetizada utilizando como sustrato al colesterol de *novo*, el colesterol asociado a lipoproteínas de fuentes extracelulares o también utilizando productos intermedios de la vía de síntesis de andrógenos. En el caso de las CLF, el colesterol es internalizado a la mitocondria por la proteína STAR (B. J. Clark et al., 1994; Miller & Bose, 2011; Stocco & Clark, 1996). Una vez en la mitocondria, el colesterol se transforma a pregnenolona, por acción de la enzima P450<sub>scc</sub> (Enzima de escisión de la cadena lateral del citocromo P450) codificada por el gen *Cyp11a1* (Figura 3). Posteriormente, la pregnenolona es liberada de la mitocondria y pasa al retículo endoplasmático liso (REL) donde se completa el proceso de biotransformación conducente a la síntesis de andrógenos. En las membranas del REL las enzimas que participan en este proceso son la 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa  $\Delta^{5-4}$  isomerasa, (tipo II en humanos, y tipo I en ratones)), la CYP17A1 (17 $\alpha$ -hidroxilasa, 17,20-liasa) y la 17 $\beta$ -HSD (17 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa) (Fig.1) (Payne & Youngblood, 1995; Payne & Hales, 2004; Miller & Bose, 2011).



**Figura 3.** Esquema del proceso de esteroidogénesis que ocurre en el testículo para realizar la biotransformación de colesterol a testosterona y dihidrotestosterona, hormonas que se requiere para masculinizar el tracto y para la diferenciación del seno urogenital y los genitales externos. (Modificada de Payne and Hales, 2004).

La respuesta a la actividad esteroidogénica de las CLF es mediada por el receptor de andrógenos (RA) por un cambio conformacional que ocurre cuando los andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona) se unen al RA. A continuación, el receptor se dimeriza, se fosforila, y, finalmente se transloca al núcleo, donde se une a los elementos de respuesta a andrógenos, y regula la transcripción génica. Sin embargo, es importante resaltar que, la expresión espacio-temporal del RA durante el desarrollo de los testículos fetales difiere entre especies (Rouiller-Fabre et al., 2015). En ratones, el RA se expresa en células germinales y células peritubulares a los 15.5 *dpc* (Merlet et al., 2007), mientras que en humanos el RA se ha localizado

en células peritubulares y células estromales a la séptima semana de gestación (Shapiro et al., 2005). Aunque en ratones deficientes de *RA* las CLF se desarrollan normalmente, la maduración de las CLA se ve afectada, observándose una diferenciación incompleta y una expresión esteroideogénica alterada, lo que sugiere que la señalización de *RA* es necesaria para el equilibrio en el desarrollo temprano de la población fetal y posterior establecimiento testículo adulto (Kaftanovskaya et al., 2015).

#### *Bisfenol A como disruptor endocrino*

El Bisfenol A (2, 2'-bis (4-hidroxifenilpropano; BPA) es un compuesto químico que fue sintetizado por primera vez en 1891 y hacia la década de 1930 se buscaba comercializarlo por sus propiedades estrogénicas (Dodds & Lawson, 1936), sin embargo, su uso fue sustituido por el dietilestilbestrol (DES), un estrógeno sintético más potente que fue administrado a mujeres embarazadas para evitar abortos y partos prematuros. No obstante, se observó una alta incidencia de niñas con cáncer cervical y vaginal que fueron expuestas *in útero* al DES por lo que su uso se discontinuó (Al Jishi & Sergi, 2017).

En la industria del plástico el uso del BPA se disparó en la década de 1950, y se empezó a utilizar como monómero para la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi, por los que su principal uso fue la producción de envases para almacenar alimentos y bebidas (Rubin, 2011). Aproximadamente el porcentaje de materiales hechos con BPA es del 90% y en el 2006 fue uno de los

productos químicos más fabricados en el mundo con una producción de 3,8 millones de toneladas (FitzGerald & Wilks, 2014).

Debido al uso frecuente, el BPA se ha convertido en un contaminante ambiental ubicuo al que todos los organismos están altamente expuestos. Las altas temperaturas inducen la liberación de monómeros de BPA que contaminan los alimentos y bebidas que consumen los humanos y contaminan el medio ambiente en todo el mundo. El BPA ingresa al cuerpo a través del tracto respiratorio, la piel y el tracto digestivo, y se acumula en varios tejidos, sobre todo el tejido graso (Geens et al., 2012). El BPA atraviesa la barrera placentaria tanto en roedores como en humanos, lo que significa que la exposición materna al BPA puede afectar al feto en desarrollo (Balakrishnan et al., 2010). En humanos, el BPA está presente en la sangre, la orina, el líquido amniótico y la sangre del cordón umbilical (Minatoya et al., 2017).

Por sus propiedades estrogénicas y por la alta exposición a las que los organismos estamos expuestos, el BPA es considerado como un compuesto disruptor endocrino. Los compuestos disruptores endocrinos se consideran como moléculas o compuestos exógenos (Ismanto et al., 2022) que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, acción de unión o eliminación de hormonas naturales transportadas por la sangre que están presentes en el cuerpo y sean responsables de la homeostasis, la reproducción y el proceso de desarrollo (Kumar et al., 2020). Enfermedades como el cáncer (Buoso et al., 2020), problemas cardiovasculares (Heindel et al., 2017), trastornos del comportamiento (Shoaff et al., 2020), defectos autoinmunes (Kuo et al., 2012) y enfermedades reproductivas

(Zlatnik, 2016) están relacionadas con estos disruptores endocrinos. Estudios epidemiológicos en humanos han relacionado la exposición del feto a contaminantes ambientales con actividad estrogénica como el BPA, con trastornos del desarrollo del testículo (Fénichel et al. 2019; Gingrich, Ticiani, y Veiga-Lopez 2020). Algunos de estos estudios indican que los niveles de BPA en suero, así como los niveles de BPA en placentas a término, son mayores en niños que presentaban alteraciones como criptorquidia o hipospadias (Fernández et al., 2016; Komarowska et al., 2015).

Por lo tanto, la exposición a contaminantes químicos con actividad estrogénica como BPA, puede interferir con la biosíntesis, el metabolismo o la acción hormonal normal en el organismo y durante el desarrollo temprano puede alterar la diferenciación de los CLF, perturbando su función paracrina con las células de Sertoli y las CGPs dentro del testículo fetal. Estas alteraciones de las células de Sertoli y/o las células germinales durante la etapa fetal se han propuesto como responsables de generar cierta inestabilidad cromosómica en las poblaciones de gonocitos e inhibir su diferenciación a espermatogonias, lo que parece ser crítico para el desarrollo del carcinoma *in situ* en adolescentes y adultos (Jacobsen et al., 2000; Jørgensen et al., 1997). Existe evidencia de que las gónadas del conejo son susceptibles de sufrir disgenesias por contaminantes ambientales (Higuchi et al., 2003) e incluso carcinomas *in situ* (D. N. R. Veeramachaneni, 2006; D. N. Veeramachaneni & Vandewoude, 1999).

Por otra parte, los andrógenos sintetizados y la señalización mediada por el RA durante el desarrollo embrionario, determina la diferenciación completa y la

función esteroidogénica correcta de las células de Leydig en la vida adulta (Kaftanovskaya et al., 2015). Por lo tanto, incluso una breve interrupción y/o inhibición sutil del establecimiento del CLF, puede reflejarse en consecuencias teratológicas y patológicas durante la vida postnatal como testículos hipoplásicos, criptorquidia, hipospadias y la persistencia de los conductos mullerianos (Asklund et al., 2004).

Los trastornos reproductivos masculinos, conocidos colectivamente como el "Síndrome de disgenesia testicular" (SDT), son el resultado de alteraciones en el desarrollo de los testículos durante la vida fetal (Minatoya et al., 2017). En la disgenesia testicular los túbulos seminíferos y el estroma son anormales, no desaparecen completamente los conductos de Müller, los conductos de Wolff no se mantienen o su diferenciación es parcial y los genitales externos no se virilizan o lo hacen parcialmente. En consecuencia estos individuos presentan genitales ambiguos, criptorquidia uni o bilateral, además de presentar un elevado riesgo de malignización testicular (Audí et al., 2006). El BPA modifica el metabolismo de las hormonas esteroides, mediante su unión a sus proteínas receptoras, lo que a su vez modifica las vías de transducción de genes, alterando el desarrollo fetal (N'Tumba-Byn et al., 2012). Por lo tanto, el BPA es un candidato potencial para engendrar SDT posnatal. La exposición fetal al BPA puede afectar el establecimiento de la población de CLF al interrumpir el proceso esteroidogénico en los testículos en desarrollo. Por lo tanto, incluso una breve interrupción del proceso esteroidogénico en los testículos fetales, puede tener consecuencias perturbadoras en la vida posnatal (Shima et al., 2015).

Existen variaciones importantes según las diferentes especies, en cuanto a los efectos de la exposición intrauterina al BPA sobre las CLF y la función esteroidogénica de los testículos fetales. Los estudios de cultivos de órganos informaron que el BPA reduce la actividad endocrina de los testículos fetales en humanos, ratas y ratones (N'Tumba-Byn et al., 2012) y los estudios *in vitro* en células de Leydig TM3 indicaron que el BPA inhibe la acción de los andrógenos a través del RA (Teng et al., 2013).

El efecto del BPA sobre la actividad proliferativa de las células de Leydig sigue siendo controversial. Mientras que, durante el período prepuberal, las células de Leydig en ratas aumentaron su proliferación *in vivo* e *in vitro* (Chen et al., 2018), otros estudios también en rata informaron que el BPA inhibe la proliferación de células de Leydig *in vitro* (Nanjappa et al., 2012). Otros reportes indican que, aunque el efecto del BPA sobre la proliferación de las CLF en ratones, ratas y humanos es similar; el nivel más bajo sin efecto adverso observado (NOAEL, por sus siglas en inglés), establecido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es más de 100 veces menor en humanos que en roedores. Además, las vías de señalización específicas para BPA difieren entre roedores y humanos (N'Tumba-Byn et al., 2012). Aunque se han realizado muchos estudios principalmente en roedores para conocer los efectos del BPA durante el desarrollo testicular, la relación con lo que ocurre en humanos aún no está clara, específicamente durante el proceso de diferenciación de CLF.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a la preocupación por el uso frecuente de roedores como modelos para evaluar el riesgo de disruptores endocrinos en testículos fetales humanos, se ha recomendado el uso de modelos animales alternativos en los que los testículos fetales muestran un patrón de desarrollo más cercano a los humanos (Rouiller-Fabre et al., 2015). En comparación con el ratón, donde la diferencia entre los compartimentos cortical y medular no son evidentes, el conejo tiene ventajas para evaluar los efectos de los agentes tóxicos en el desarrollo temprano de los testículos. Por ejemplo, el patrón gonadal de desarrollo en el conejo se parece al de los humanos; ambos forman una gónada bi-potencial con dos compartimentos tisulares: la médula y la corteza, en los que se producen las interacciones somático-célula germinal según el compartimento.

Es importante destacar que, en contraste con las células germinales casi sincronizadas en ratones (Bullejos & Koopman, 2004), en el conejo y el humano la población de células germinales en proliferación coexiste durante mucho tiempo con células germinales que entran en meiosis o en detención mitótica en ovario y testículo, respectivamente. Por lo tanto, en comparación con los roedores, el efecto del BPA puede diferir en especies con un período de gestación más prolongado. Al igual que los humanos, la población de CLF en conejos contiene células troncales proliferantes y células diferenciadas no proliferantes. Por lo tanto, las células troncales proliferantes y de Leydig diferenciadas se exponen simultáneamente al BPA, cuando se producen interacciones críticas de células germinales somáticas paracrinas (Daniel-Carlier et al., 2013; Díaz-Hernández et al., 2008).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La presencia de contaminantes ambientales con efecto estrogénico como el BPA, puede alterar los procesos de diferenciación y esteroidogénesis de las células de Leydig en la etapa fetal, alterando su interacción con las células de Sertoli y los gonocitos, aumentando el riesgo de generar alteraciones que se podrían ver reflejados en disgenesias o cáncer testicular en la vida posnatal. Aunque la mayor parte de mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de las gónadas derivan de estudios hechos en el ratón como modelo experimental, su corta gestación y pequeño tamaño, difieren en varios aspectos morfogénéticos de los observados en especies de mayor tamaño. Por lo que proponemos que el estudio del efecto del BPA en modelos animales con gónadas grandes y poblaciones asincrónicas de gonocitos como el conejo podría brindarnos información más próxima a lo que ocurre en humanos acerca del patrón de desarrollo de testicular, especialmente en la diferenciación y actividad esteroidogénica de las células de Leydig en etapa fetal.

## **HIPÓTESIS**

El BPA modifica la diferenciación y esteroidogénesis de las células de Leydig del conejo al inicio de la maduración de los cordones testiculares. Tales modificaciones explicarían las alteraciones patológicas en la vida adulta, incluido el cáncer testicular reportado en humanos

## **OBJETIVO GENERAL**

Conocer el efecto del BPA sobre la proliferación, diferenciación y esteroidogénesis de las células de Leydig durante el periodo fetal y postnatal del conejo.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar mediante el uso de RT-qPCR el efecto del BPA sobre el patrón de expresión de los genes *SF1*, (marcador de células precursoras de células de Leydig fetales), *CYP11A1* (enzima marcadora de células Leydig), *3 $\beta$ -HSD* (enzima marcadora de células de Leydig) y *RA* (receptor a andrógenos, marcador de células de Sertoli y células germinales) en testículos fetales y postnatales del conejo.
- Conocer el efecto del BPA sobre el patrón proliferativo de las células de Leydig fetales y postnatales, correlacionando por inmunofluorescencia la distribución espacial de la proteína CYP11A1 y la proteína KI67 (marcador de proliferación).
- Analizar mediante ELISA el efecto del BPA sobre los niveles de testosterona en suero de los fetos y gazapos de conejo.
- Determinar por microscopía electrónica el efecto del BPA sobre el proceso de diferenciación morfológica de las células de Leydig.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Animales*

Se utilizaron hembras preñadas de conejo de la cepa Nueva Zelanda, las cuales se mantuvieron en jaulas individuales con alimento y agua a voluntad en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. La hembra tiene ovulación refleja inducida por la monta, por lo que el inicio de la gestación se estableció en el momento en que se observó la cópula. El día del coito se denominó el día "0".

### *Tratamiento*

Las hembras preñadas fueron tratadas vía oral, introduciendo una jeringa por la zona de la mejilla, entre los dientes para administrar el BPA. Las dosis diarias fueron de 50 mg/kg/día de BPA (Sigma-Aldrich, USA) (Nutrition, 2023) disuelto en etanol. Esta concentración representa el nivel más bajo en el que se observan efectos adversos (LOAEL por sus siglas en inglés) en mamíferos, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). El BPA fue administrado a partir de los 15 días post coito (*dpc*) a los 31 *dpc*. Las hembras preñadas del grupo control solo se trataron vía oral con etanol. El tratamiento inició a los 15 *dpc* cuando comienza la diferenciación de la cresta gonadal en el conejo (Díaz-Hernández et al., 2008).

### *Obtención de las muestras*

Las hembras preñadas y los recién nacidos fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (PiSA, México), siguiendo los lineamientos del protocolo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio). Los testículos fueron muestreados los días 17, 21, 26, 27, 28, 29, 30 y 31 *dpc* y 1, 2 y 3 días posparto (*dpp*). Se diseccionaron pares de gónadas de al menos cinco animales en cada etapa, una gónada de cada par se procesó para inmunofluorescencia y la contralateral para extracción de RNA.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

### *Sexado de embriones*

El sexo gonadal se identificó visualmente con la ayuda de un microscopio estereoscópico, a excepción de las gónadas de 17 y 21 *dpc*, en las que el sexo se determinó mediante la amplificación del gen *SRY* por RT-PCR, tal como lo describe Díaz-Hernández et al., 2008. El DNA genómico se obtuvo de las patas delanteras de los fetos. Cada reacción de PCR consistió en DNA genómico. Se realizaron reacciones de PCR de 30µl utilizando 1.5 UI Taq DNA Polymerase Platinum®, 3µl de Buffer de PCR 10X, 1µl Mg<sup>2+</sup> [50mM], 1µl d’NTP’s [10mM], 1µl de cada oligonucleótido [10mM], 1µ DNA y agua ultrapura.

### *Extracción de RNA total y transcripción reversa*

Las gónadas se disecaron y almacenaron rápidamente en congelación a -70°C. La extracción del RNA total se realizó usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para evitar la contaminación con DNA genómico, el RNA fue incubado con RNase-Free DNase (Qiagen) a temperatura ambiente durante 30 minutos. La concentración y la calidad del RNA total se evaluaron determinando la densidad óptica en la relación A260:A280 (2,0 ~ 0,15) en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y mediante electroforesis en gel (gel de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio).

### *Síntesis de DNA complementario*

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA), se colocó el RNA total (2 µg) en 20 µl de 10 UI de la enzima transcriptasa reversa (Transcriptor Reverse Transcriptase, Roche, Life Science). La síntesis de cDNA se realizó a partir de 2µg de RNA total, en un volumen final de 20µl, con 10 UI de la enzima transcriptasa reversa (Transcriptor Reverse Transcriptase, Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizó 1 µl de oligo dT [0.5µg/µl] 1 µL de Random Primers [1µg/µl], 2 µl de dNTP's [10 mM], 4 µl de Buffer RT, 0.5 µL de RNAasa out, 0.5 µL de transcriptasa reversa (Trancriptor Roche). Las reacciones fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. Los productos de las reacciones de PCR fueron cargados en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio y las imágenes fueron capturadas digitalmente. Los controles negativos se prepararon sin templado.

### *PCR en tiempo real*

La expresión génica se determinó mediante PCR en tiempo real (qPCR) (Applied Bio Systems, California, EE. UU.) a las edades de 17, 21, 26-31 *dpc* y 1-3 *dpp*. Los oligonucleótidos se diseñaron en el programa BLAST a partir de las secuencias específicas reportadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés) para conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de *SF1*, *CYP11A1*, *3 $\beta$ -HSD* y *RA* (Tabla 1). Como genes constitutivos se probaron cuatro genes Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*HPRT*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), H2A histone family member X (*H2AX*) y Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta (*YWHAZ*) (Tabla 1). Los oligonucleótidos de los genes constitutivos de *H2AX* y *YWHAZ* se diseñaron de acuerdo con lo reportado por Daniel-Carlier et al., 2013. En nuestras condiciones, *HPRT* resultó ser la opción más estable; por lo tanto, se utilizó como control interno para validar los niveles de expresión génica. Los oligonucleótidos y las temperaturas de fusión se presentan en la Tabla 1. La autenticidad de los fragmentos se verificó mediante secuenciación. Para estandarizar las condiciones de qPCR de cada gen, se determinó la alineación óptima de los oligonucleótidos por gradiente de temperatura y se obtuvo la eficiencia de amplificación de cada gen. La validación de cada gen se realizó a partir de una curva estándar utilizando al menos 4 diluciones seriales del templado 1:10 (100ng, 10 ng, 1 ng, 0.1 ng y hasta 0.01 ng). Los valores de Ct obtenidos a partir de la amplificación se graficaron contra el logaritmo de la cantidad de cDNA (diluciones seriadas 1:10 a partir de 100ng/ $\mu$ l de cDNA).

Para validar cada gen, la regresión semilogarítmica cumplió con los siguientes parámetros:

- Valor de pendiente de  $-3.32 \pm 10\%$ , que nos indica la eficiencia de amplificación.
- Índice de correlación ( $R^2$ ) = 0.99, que nos indica la reproducibilidad del sistema.

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando SYBR Select Mix (Applied Biosystems, California, USA) 1x, oligonucleótidos (10 mM), 1 ml de cDNA diluido en 9 ml de agua libre de RNasase y agua ultrapura en un volumen total de 10 ml. En todos los ensayos se corrieron controles negativos sin templado y las condiciones de amplificación fueron 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto. Posteriormente, se generaron curvas de fusión para asegurar la amplificación de un solo producto.

La expresión de los genes se cuantificó mediante la comparación relativa Ct. El Ct se define como el número de ciclo fraccionario en el que la fluorescencia indicadora alcanza un determinado nivel. Para calcular los cambios relativos en la expresión de cada gen se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Gen	Secuencia 5'→ 3'	Tamaño del amplicón	Temperatura de fusión	Referencia NCBI
<b>Steroidogenic factor 1</b>				
<i>SF1</i>	S: CGCAGGTGCATGGTCTTCAA AS: CGTACTGGATCTGGCGGTAG	112 pb	60°C 60°C	XM_008273334.2
<b>Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1</b>				
<i>CYP11A1</i>	S: CCGTGGTATCCTCTACAGCC AS: CCCCATCTCATACAGGTGCC	136 pb	60°C 60°C	XM_008253734.2
<b>3 beta-Hydroxy-steroid dehydrogenase</b>				
<i>3β-HSD</i>	S: CAGGTGTCATTCACCGAGACA AS: GTGGGTCCAGCTACTTCCA	131 pb	60°C 60°C	XM_002715686.3
<b>Androgen receptor</b>				
<i>AR</i>	S: GTGCCCTATCCCAATCCCAG AS: ACGTGGTCCCTAGCAGTCTC	107 pb	60°C 60°C	NM_001195724.1
<b>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</b>				
<i>HPRT</i>	S: GCAGACCTTGCTTTCTT AS: GTCTGGCCTGTATCCAACACT	103 pb	60°C 60°C	EF219063.1
<b>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</b>				
<i>GAPDH</i>	S: GTATGATTCCACCCACGGCA AS: CCAGCATCACCCCACTTGAT	129	60°C 60°C	NM_001082253.1
<b>H2A histone family member X</b>				
<i>H2AX</i>	S: ACCTGACGGCCGAGATCCT AS: CGCCCAGCAGCTTGTTGAG	126	60°C 60°C	Daniel-Carlier et al., 2013.
<b>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta</b>				
<i>YWHAZ</i>	S: GGGTCTGGCCCTTAACTTCTCT AS: AGCAATGGCTTCATCAAAGC	100	60°C 60°C	Daniel-Carlier et al., 2013.
<b>Sex-determining region Y</b>				
<i>SRY</i>	S: GTGGTCCCAACATCAGA AS: ACCTCGTCGGAAGGTAAAATC	202 pb	56°C 56°C	Díaz-Hernández et al., 2008.

Tabla 1. Condiciones y características de los oligonucleótidos utilizados para PCR en tiempo real.

S: secuencia sentido, AS: secuencia antisentido, pb: pares de bases.

### *Inmunofluorescencia para la detección de las proteínas CYP11A1 Y KI67*

Para las inmunofluorescencias, los testículos disecados se fijaron en 4% de paraformaldehído en PBS. Las muestras se deshidrataron en series ascendentes de sacarosa, se incluyeron en Tissue Tek y se congelaron a -70°C. Para analizar la proliferación de las células de Leydig se utilizó la colocación del marcador nuclear anti-KI67 (M740, clon MIB-1, Dako, Denmark) y el marcador citoplasmático anti-CYP11A1 (sc-18043, Santa Cruz, Biotechnology). Se procesaron testículos de 19, 21, 27, 28 y 31 *dpc* y 1, 2 y 3 *dpp*. Se utilizaron criosecciones de testículo de 30 µm, orientadas longitudinalmente. Cada criosección se colocó alternadamente en una de cuatro laminillas para incluir secciones representativas de cada gónada en cada laminilla. Para la recuperación de antígenos inducida por calor, las laminillas se colocaron en un buffer Tris pH 10 durante 45 min a 90 °C, luego se transfirieron a PBS y Triton X-100 al 0,5 % en PBS en una secuencia de rack para inmunofluorescencia. Para bloquear la tinción inespecífica, las secciones se incubaron con suero de caballo al 10 % en PBT (0,5 % Triton 100X/PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se lavaron y se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpo primario de cabra anti-CYP11A1, diluido 1:70. Luego, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-cabra burro Alexa Fluor 488 (A11055, Molecular probes, Invitrogen) durante 20 min a temperatura ambiente y se dejó durante la noche a 4 °C con el segundo anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-Ki67, diluido 1:150. El anti-ratón burro Alexa Fluor 555 (A31570, Molecular probes, Invitrogen) se utilizó como anticuerpo secundario. Los núcleos celulares se contrastaron con yoduro de TOTO-3 (azul) (T3604, Molecular Probes, Invitrogen) y se montaron con medio fluorescente (S3023, Dako,

Agilent Technologies, Dinamarca). Las imágenes fueron recolectadas y procesadas con un microscopio confocal Zeiss Pascal LSM5. En los controles negativos se omitieron los anticuerpos primarios y se incubaron exclusivamente con anticuerpos secundarios. Células de Leydig teñidas en verde y Ki67 en color rojo. El número de células marcadas con CYP11A1 Y Ki67 colocalizados se midió con el software de imagen Zeiss LSM5 en cuatro criosecciones para testículos (n = 4 testículos por edad). Las células marcadas se identificaron claramente en pilas confocales 3D de secciones ópticas de 3,0  $\mu\text{m}$  y se contó su número por unidad de área (325,67  $\text{mm}^2$ ).

#### *Obtención de suero y ensayo de testosterona*

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardiaca, se colectaron en tubos eppendorf sin solución anticoagulante y se dejaron reposar durante 1hr a temperatura ambiente para favorecer la coagulación, posteriormente las muestras se almacenaron a 4 °C durante 24 h, se centrifugaron a 3000 rpm x 15 min a 4 °C, se recuperaron los sueros y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se analizaron muestras de al menos cinco animales de cada edad. Los niveles de testosterona sérica se cuantificaron mediante inmunoanálisis competitivo de ELISA (ENZO, testosterone ELISA kit, Farmingdale, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### *Secciones semifinas y microscopía electrónica de transmisión*

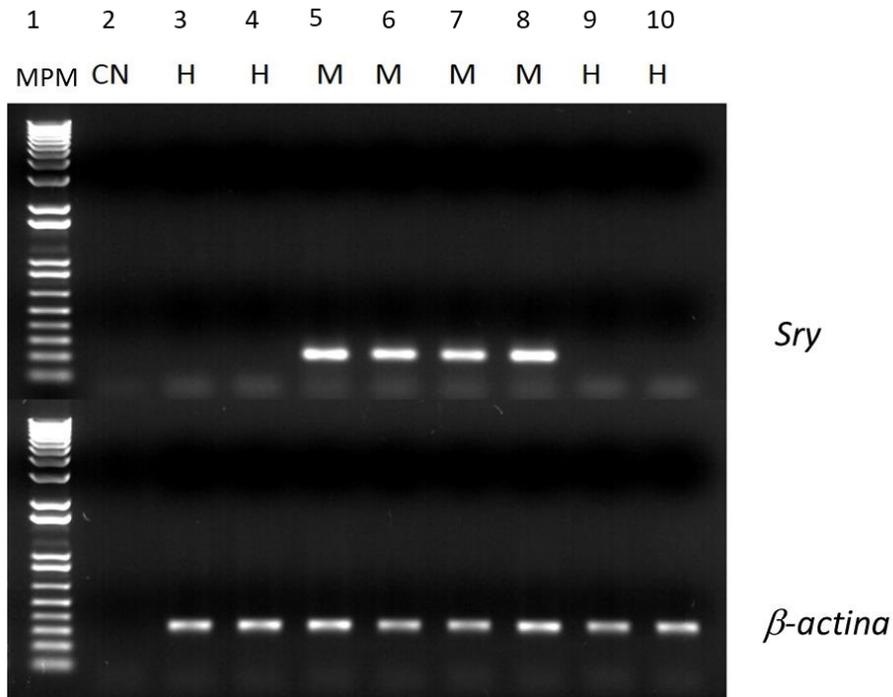
Los testículos de cada grupo se fijaron en solución de KRNAovsky y posteriormente se post fijaron con OsO<sub>4</sub> al 1 % en buffer Zetterqvist. Después, los testículos fueron deshidratados en una serie ascendente de concentraciones de etanol y se incluyeron en Epon 812. Se cortaron secciones semifinas (1 µm de espesor) con un ultramicrotomo (Power Tome Microtomy XL, RMC) y se tiñeron con azul de toluidina. Las secciones finas de 60 nm se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las imágenes fueron recolectadas y procesadas con microscopio de luz o con microscopio electrónico de transmisión (Jeol EM1010).

### *Análisis estadístico*

Los datos se presentan como media y error estándar (SEM). Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron y compararon mediante una prueba ANOVA de una vía, seguida de la corrección de Welch. La significación estadística se estableció como  $p < 0,05$ .

### *Sexado de los embriones*

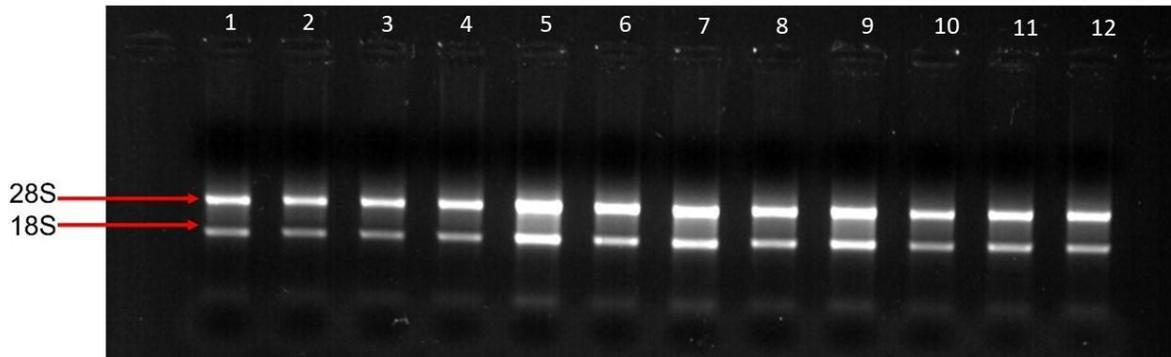
El sexo de los embriones de 17 y 21 *dpc* se determinó por PCR mediante la amplificación de un fragmento del gen *Sry* presente únicamente en el DAN de machos, por lo que no se detecta en hembras ni en el control negativo sin templado (Figura 4).



**Figura 4. Sexado de embriones de conejo de 21 *dpc* mediante la amplificación de un fragmento del gen *Sry*.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril-1 marcador de peso molecular (MPM), Carril-2 control sin templado, Carriles 3-4, 9-10 muestras de diferentes embriones hembras (H), Carriles 5-8 muestras de diferentes embriones machos (M). CN: control negativo.

#### *Extracción de RNA*

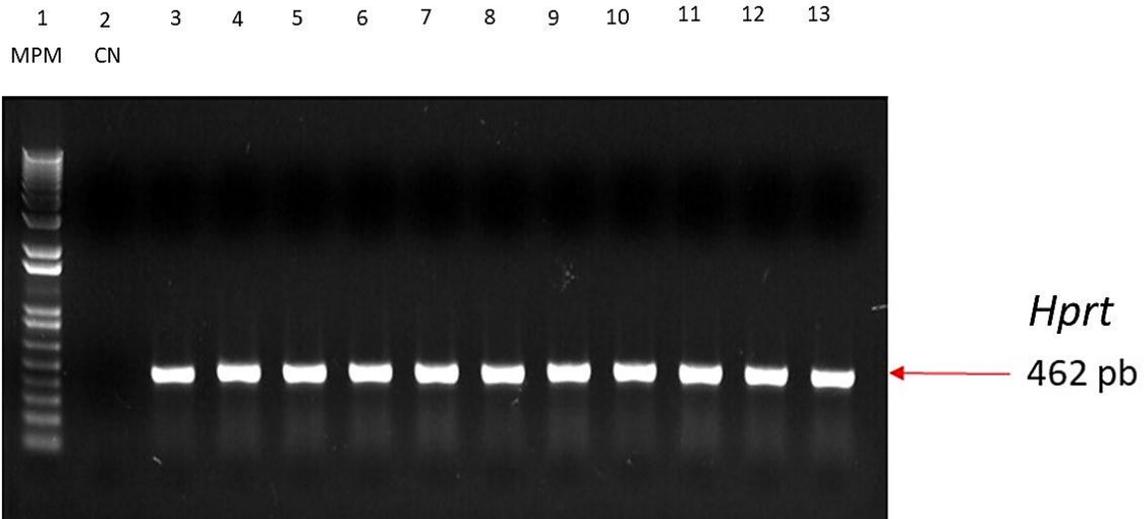
Las extracciones de RNA total se verificaron corriendo las muestras en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. La presencia de las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S corrobora la integridad del RNA obtenido. No se aprecia contaminación por DNA genómico (Figura 5).



**Figura 5. Fotografía de un gel de agarosa donde se muestra la integridad del RNA total obtenido de testículos de conejo de 31 *dpc*.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, en cada carril se cargó la cantidad de 0.2  $\mu\text{g}$  de RNA, las flechas rojas indican las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S. Cada número indica el carril en el que se corrió el RNA total de cada testículo de conejo de 31 *dpc* procesado.

### *Síntesis de cDNA*

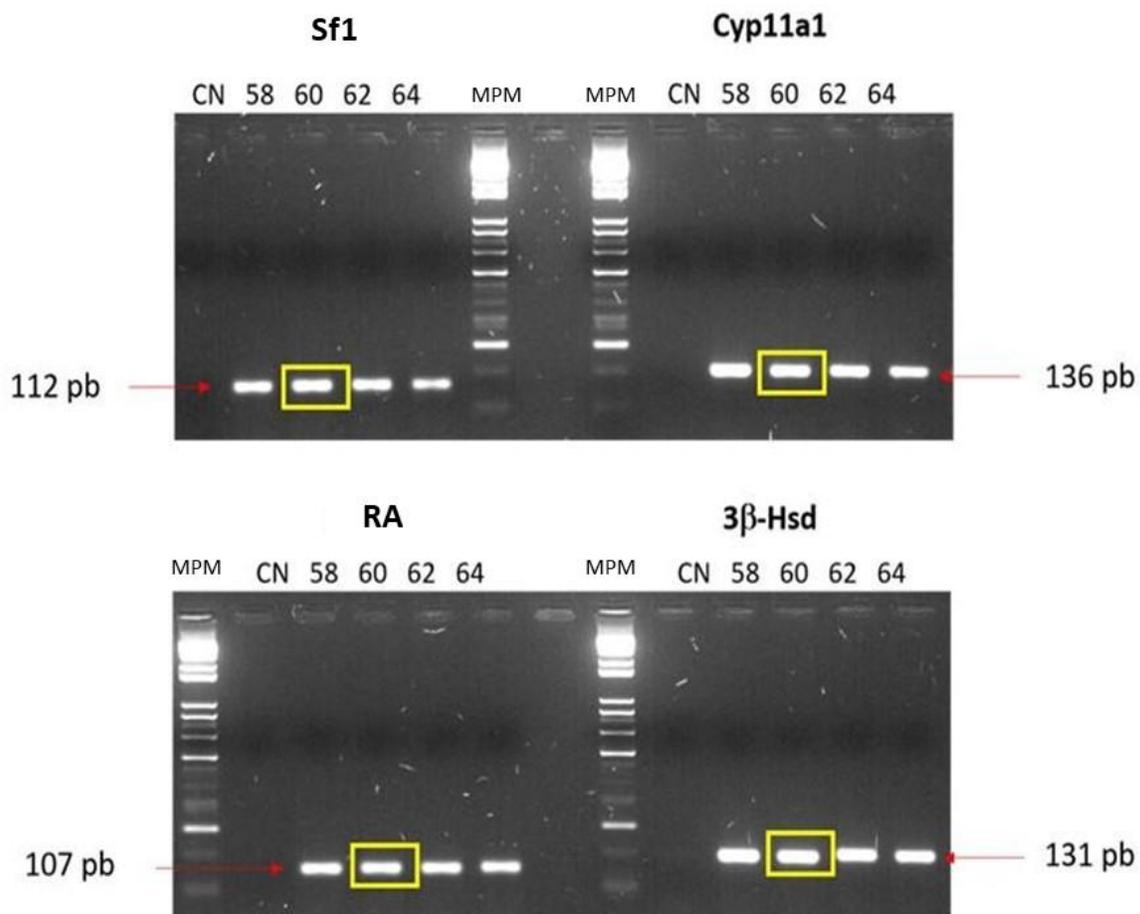
Para corroborar la eficiencia de la síntesis de cDNA utilizando la transcriptasa reversa, se realizó la amplificación del gen endógeno de *Hprt* (462 pares de bases). En la figura 6 se puede observar la integridad del cDNA sintetizado a partir del RNA total extraído de testículos de conejo de 31 *dpc*.



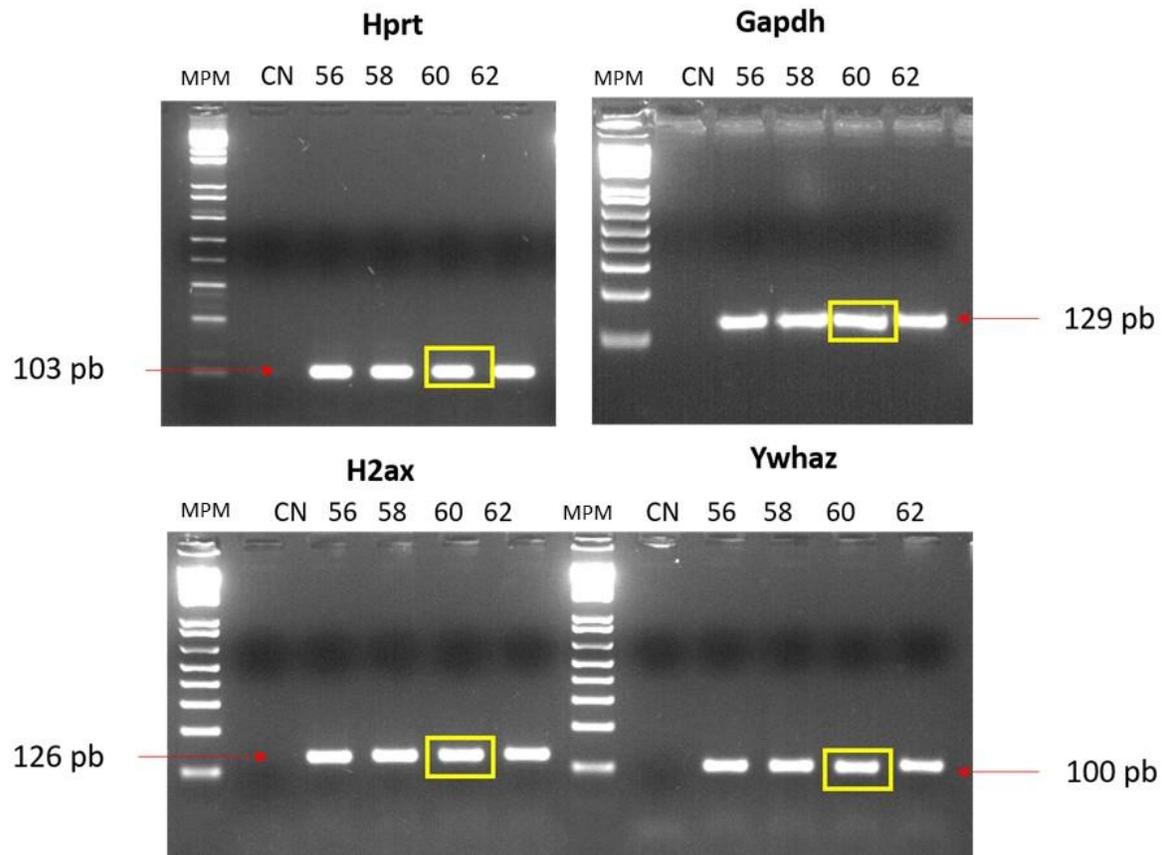
**Figura 6. Fotografía de un gel de agarosa donde se aprecia la integridad del cDNA sintetizado a partir del RNA total extraído de testículos de conejo de 31 *dpc*.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril-1 marcador de peso molecular (MPM), Carril-2 control sin templado, Carriles 3-13 muestran las bandas únicas que corresponden a la amplificación del gen endógeno *Hprt* a partir del cDNA de testículos de conejo de 31 *dpc*. pb: pares de bases, CN: control negativo.

### *Gradientes de temperatura*

Para estandarizar las temperaturas óptimas de alineamiento de los oligonucleótidos para qPCR se realizaron gradientes de temperatura. En las figuras 7 y 8 se muestran los geles representativos de los gradientes de temperatura de los genes utilizados, el recuadro amarillo indica el producto amplificado a la temperatura óptima de alineamiento.



**Figura 7. Fotografías de geles de agarosa donde se muestran los gradientes de temperatura de los genes blanco *Sf-1*, *Cyp11a1*, *RA* y *3β-Hsd*.** Se utilizaron gradientes de temperatura de 58°C a 64°C. La temperatura óptima de cada gen fue de 60°C y se indica en el recuadro amarillo. CN: Control negativo, pb: pares de bases. MPM: marcador de peso molecular.



**Figura 8. Fotografías de geles de agarosa donde se muestran los gradientes de temperatura de los genes endógenos *Hprt*, *Gapdh*, *H2ax* y *Ywhaz*.** Se utilizaron gradientes de temperatura de 56°C a 62°C. La temperatura óptima de cada gen fue de 60°C y se indica en el recuadro amarillo. pb: pares de bases, CN: Control negativo. MPM: marcador de peso molecular.

### *Validaciones para qPCR*

Los valores obtenidos de la pendiente, así como el índice de correlación ( $R^2$ ) de cada gen se resumen en la Tabla 2. Los valores de los genes analizados cumplieron los parámetros establecidos excepto el gen endógeno *Ywhaz* por lo tanto se descartó como gen de referencia. En nuestras condiciones, *Hprt* resultó ser el gen endógeno más estable; por lo tanto, se utilizó como control interno para

validar los niveles de expresión génica de *Cyp11a1*, *Sf1*, *3b-Hsd* y *RA*. Las gráficas y las curvas de disociación de cada gen analizado se muestran en el material anexo.

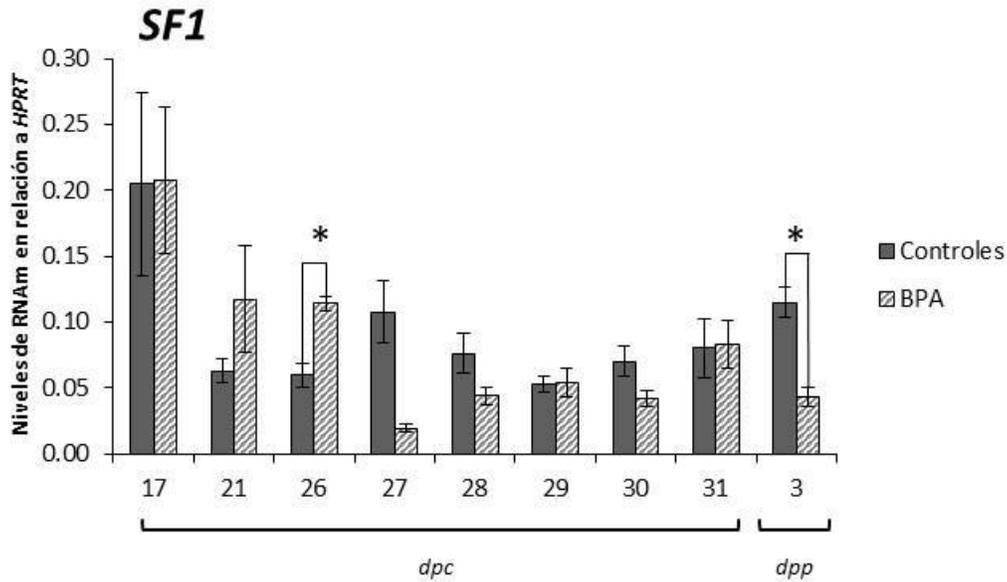
Nombre	Valor de la pendiente	Índice de correlación
<b>Genes blanco</b>		
<i>CYP11A1</i>	-3.64	0.99
<i>3β -HSD</i>	-3.46	0.99
<i>RA</i>	-3.25	0.99
<i>SF1</i>	-3.29	0.99
<b>Genes endógenos</b>		
<i>HPRT</i>	-3.65	0.99
<i>GAPDH</i>	-3.61	0.99
<i>H2AX</i>	-3.45	0.99
<i>YWHAZ</i>	-4.17	0.99

Tabla 2. Valores de las curvas de validación de cada gen obtenidas a partir de del valor de la pendiente y el índice de correlación ( $R^2$ ).

## RESULTADOS

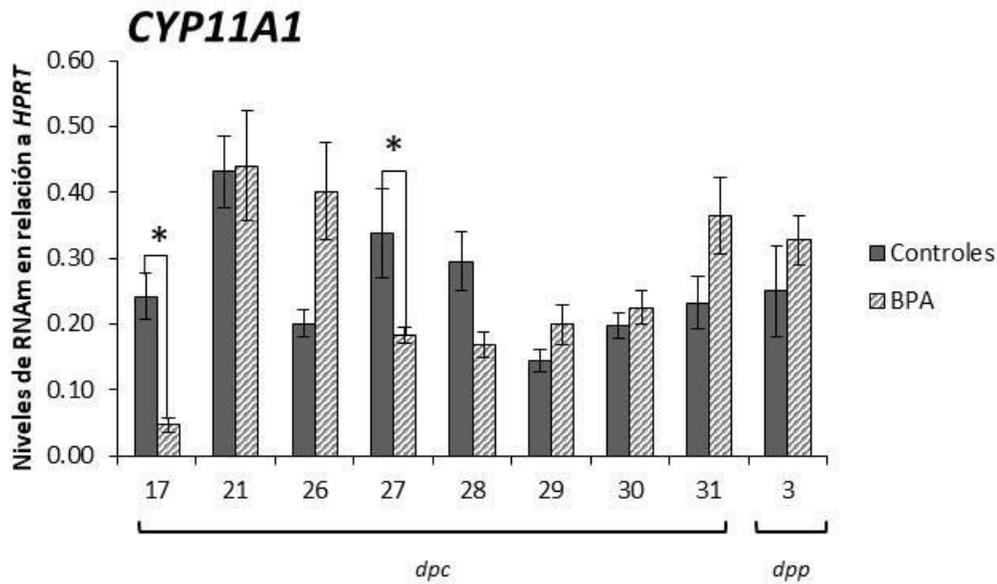
*Niveles de expresión de SF1, CYP11A1, 3 $\beta$ -HSD y RA en testículos de fetos de conejos y recién nacidos de controles y tratados con BPA*

Para comprender cómo el BPA puede alterar las vías reguladoras de la esteroidogénesis durante el establecimiento de la población fetal de las células de Leydig, se extrajo el RNA total de testículos de conejos a los 17, 21, 26, 27, 28, 29, 30 y 31 *días post coito (dpc)* y 3 días posparto (*dpp*). y se analizaron los niveles de expresión por medio de PCR de tiempo real de tres factores: un receptor nuclear *SF1* y las enzimas esteroidogénicas *CYP11A1* y *3 $\beta$ -HSD*. Se detectaron altos niveles de expresión de *SF1* a los 17 *dpc* en los grupos control y tratados con BPA (Figura 9). Posteriormente, aunque los niveles disminuyeron en ambos grupos, el grupo tratado con BPA mostró niveles significativamente más altos que los controles a los 26 *dpc*. Luego, el perfil de expresión del grupo BPA disminuyó y se mantuvo similar o inferior al grupo control, hasta los 31 *dpc*. Sin embargo, a los tres *dpp*, los niveles relativos de *SF1* en el grupo de BPA disminuyeron significativamente por debajo de los controles (Figura 9).



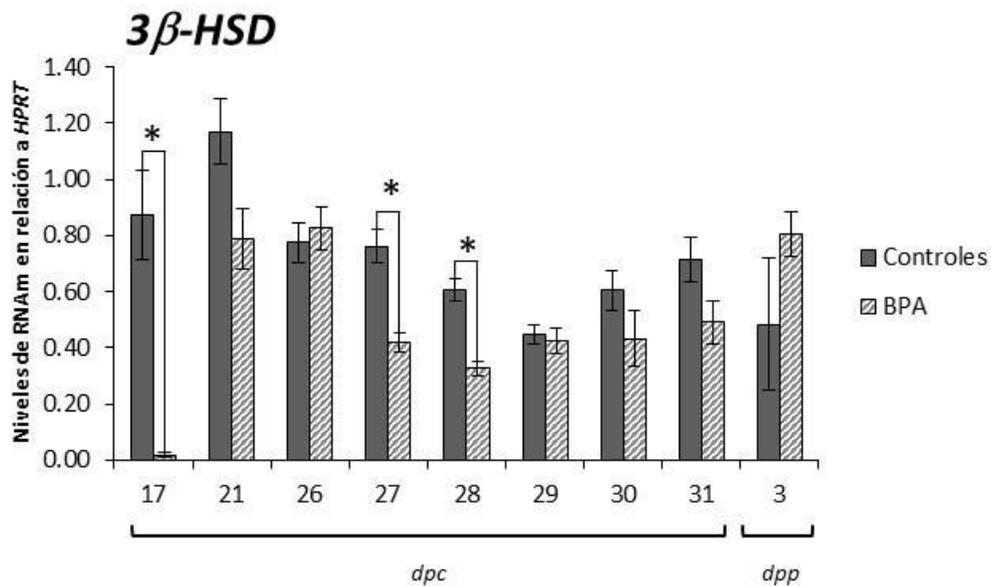
**Figura 9. Efectos del bisfenol A (BPA) sobre los niveles de expresión génica en *SF1*.** El BPA alteró los niveles de expresión de *SF1*, observándose los niveles significativamente más altos en los controles a los 26 *dpc*. Sin embargo, a los tres *dpp*, los niveles relativos de *SF1* en el grupo de BPA disminuyeron significativamente por debajo de los controles. Cada barra representa la media de expresión relativa de *SF1* a *HPRT* ~ SEM. Los asteriscos indican una diferencia significativa con el control. \* $P < 0,05$ . *dpc*: días post coito, *dpp*: días post parto. La barra representa la media de una  $n=5$  los cuales corresponden al menos a 3 camadas distintas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Asimismo, aunque se detectó *CYP11A1* en los testículos de ambos grupos a los 17 *dpc*, los niveles en el grupo BPA fueron significativamente más bajos (Figura 10). En contraste, cuatro días después, a los 21 *dpc*, los niveles de *CYP11A1* en el grupo de BPA aumentaron hasta igualar a los del grupo control. Los niveles del grupo de BPA luego disminuyeron nuevamente, hasta 27 *dpc*, cuando los niveles se registraron significativamente más bajos que los controles. La diferencia entre grupos de niveles de *CYP11A1* no fue significativa, hasta los tres *dpp* (Figura 10).



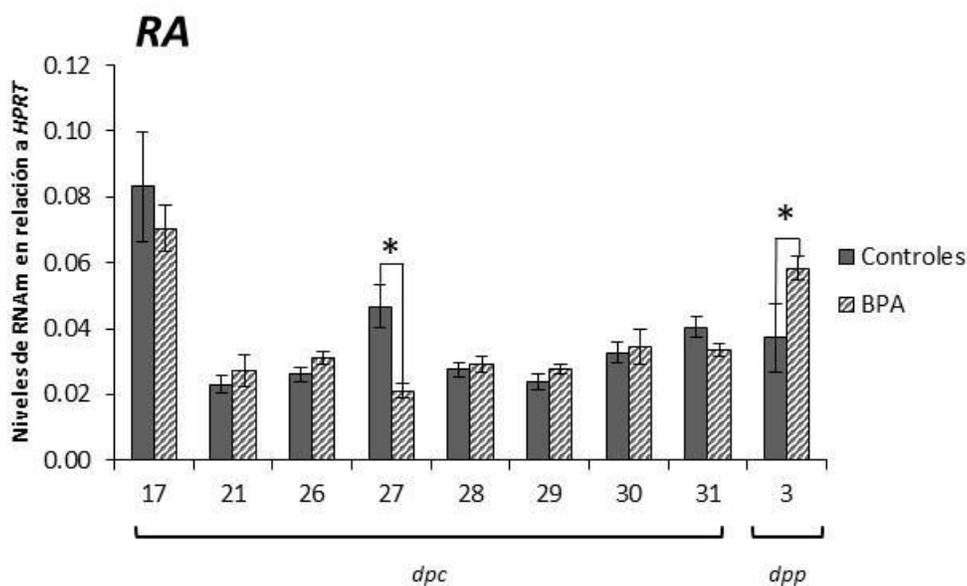
**Figura 10. Efectos del bisfenol A (BPA) sobre los niveles de expresión génica en *CYP11A1*.** La exposición al BPA alteró la expresión de *CYP11A1*, observándose una marcada disminución hacia los 17 y 27 *dpc*, contrario a los tres *dpp* donde la expresión de *CYP11A1* fue mayor en el grupo tratado con BPA respecto a los controles. Cada barra representa la media de expresión relativa de *CYP11A1* a *HPRT* ~ SEM. Los asteriscos indican una diferencia significativa con el control. \*P < 0,05. *dpc*: días post coito, *dpp*: días post parto. La barra representa la media de una n=5 los cuales corresponden al menos a 3 camadas distintas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Al igual que *CYP11A1*, el perfil de transcripción de *3β-HSD* fue significativamente menor en los testículos de los conejos tratados con BPA que entre los controles. En general, el perfil de expresión en muestras de animales tratados con BPA estuvo por debajo del perfil de los controles, con diferencias significativas a los 17, 27 y 28 *dpc*. Sin embargo, los niveles de *3β-HSD* aumentaron a los tres *dpp* (Figura 11).



**Figura 11. Efectos del bisfenol A (BPA) sobre los niveles de expresión génica en *3β-HSD*.** La exposición al BPA alteró la expresión de *3β-HSD*, observándose una marcada disminución hacia los 17, 27 y 28 *dpc*, contrario a los tres *dpp* donde la expresión de *3β-HSD* fue mayor en el grupo tratado con BPA respecto a los controles. Cada barra representa la media de expresión relativa de *3β-HSD* a *HPRT* ~ SEM. Los asteriscos indican una diferencia significativa con el control. \*P < 0,05. *dpc*: días post coito, *dpp*: días post parto. La barra representa la media de una n=5 los cuales corresponden al menos a 3 camadas distintas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Interesantemente, a los 17 *dpc*, los niveles de RA fueron similares tanto en los testículos tratados con BPA como en los de control. Después de eso, los niveles disminuyeron significativamente a los 27 *dpc* en el grupo de BPA, permaneciendo similares en ambos grupos hasta el día 31. Por el contrario, después del nacimiento, la expresión de RA aumentó significativamente en los testículos de gazapos de madres tratadas con BPA, en comparación con sus controles (Figura 12).

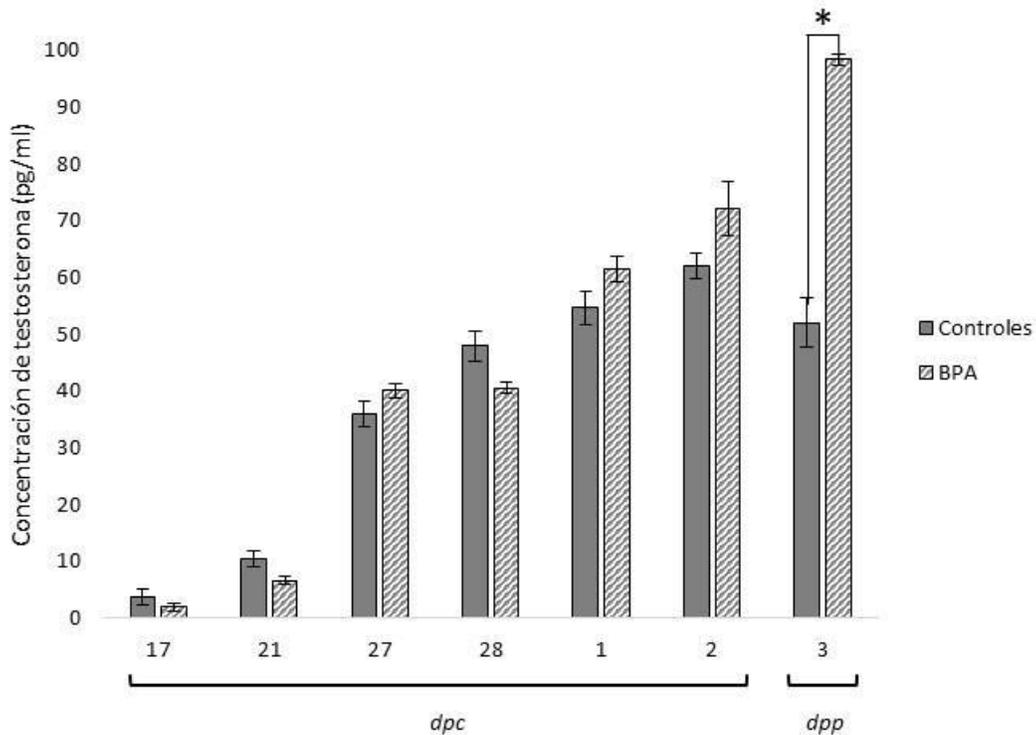


**Figura 12. Efectos del bisfenol A (BPA) sobre los niveles de expresión génica de RA.** La expresión de RA fue menor en el grupo tratado con BPA respecto al grupo control, excepto a los tres *dpp*, donde la expresión fue significativamente mayor. Cada barra representa la media de expresión relativa de RA a HPRT ~ SEM. Los asteriscos indican una diferencia significativa con el control. \*P < 0,05. *dpc*: días post coito, *dpp*: días post parto. La barra representa la media de una n=5 los cuales corresponden al menos a 3 camadas distintas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Las variaciones en los niveles de expresión de los genes analizados se atribuyen principalmente al efecto del BPA sobre los procesos de diferenciación y esteroidogénesis de las células de Leydig fetales. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el resultado puede derivar de diferencias en la proporción de células que expresan los genes analizados, así como de las múltiples vías involucradas en la regulación del proceso esteroidogénico alterado por el BPA.

*Concentración de testosterona en suero de fetos de conejos y recién nacidos controles y tratados con BPA*

Para definir si el efecto disruptor esteroideogénico del BPA afecta los niveles de la testosterona secretada por los testículos en desarrollo, se determinaron los niveles de testosterona sérica en fetos y recién nacidos. La figura 13 presenta los niveles de testosterona medidos en suero de muestras del feto a los 17, 21, 27 y 28 *dpc* y recién nacidos a los 1-3 *dpp*. Aunque durante el período fetal, los niveles de testosterona fueron similares en los testículos de los grupos BPA y control, se evidenció un nivel significativamente más alto en los gazapos nacidos de madres tratadas con BPA, a los tres *dpp* (Figura 13).

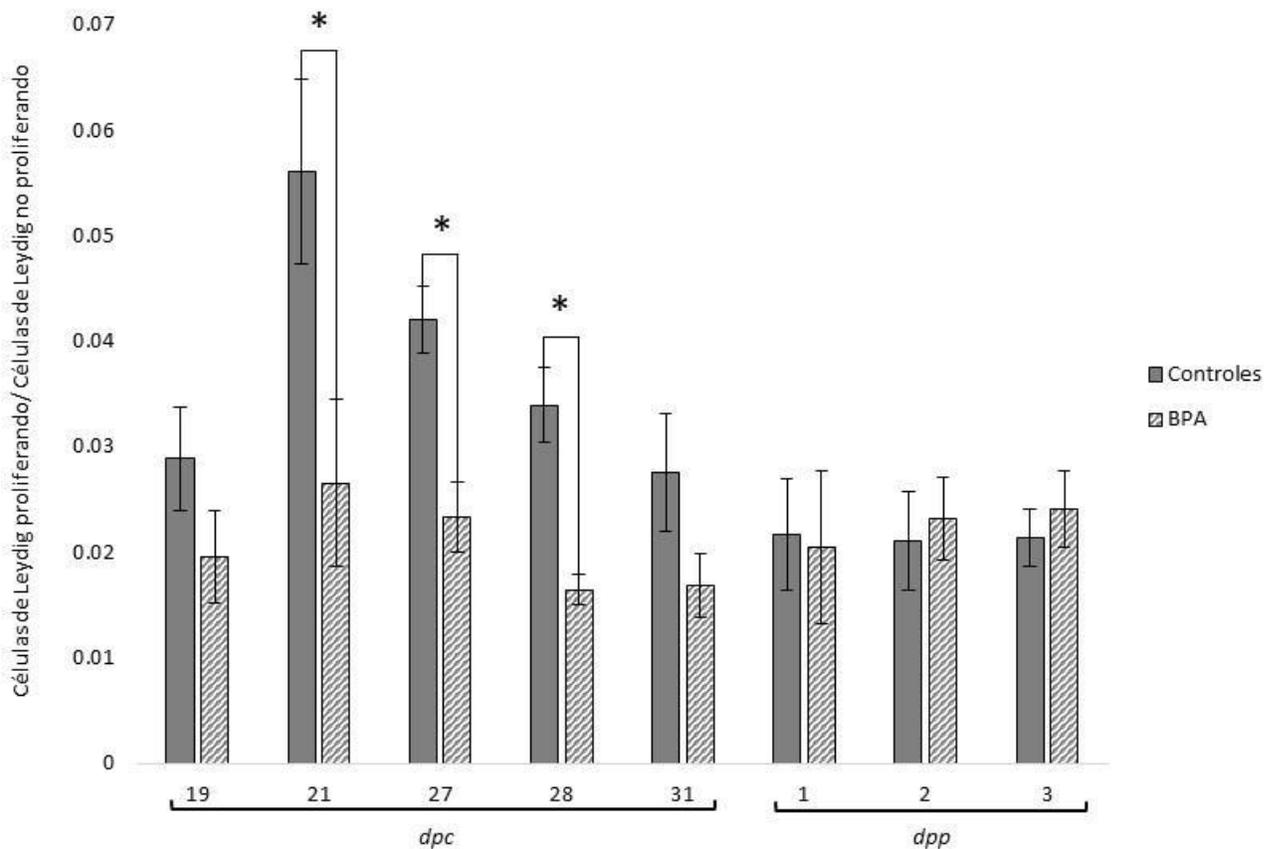


**Figura 13. Efectos del bisfenol A (BPA) sobre la concentración de testosterona medida en suero.** El nivel de testosterona fue significativamente más alto en los gazapos nacidos de madres tratadas con BPA a los tres *dpp*. El asterisco indica diferencias significativas en comparación con el control. Las barras representan la media  $\pm$  SEM, \* $P < 0,05$ . *dpc*: días post coito, *dpp*: días post parto. La barra representa la media de una  $n=5$ , los cuales corresponden al menos a 3 camadas distintas. El experimento se realizó por triplicado.

Los niveles en la concentración de testosterona sérica aumentaron sustancialmente en las crías posnatales, lo que se podría correlacionar positivamente tanto con el aumento en los niveles de expresión de *RA* como en el de las enzimas esteroidogénicas *CYP11A1* Y *3 $\beta$ -HSD* en las CLF tratadas con BPA.

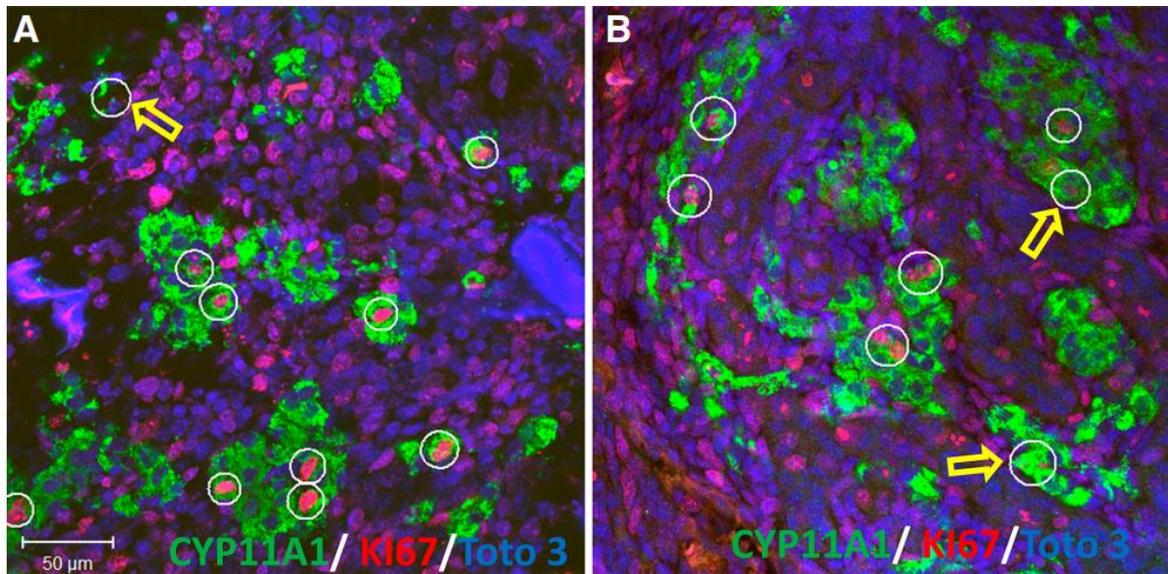
*Proliferación de las células de Leydig fetales en testículos de conejos de controles y tratados con BPA*

Para estudiar el efecto del BPA en el tejido esteroideogénico en testículos de conejo en desarrollo, correlacionamos la expresión de CYP11A1 y KI67. El anticuerpo contra CYP11A1 marca la primera enzima en el proceso esteroideogénico, lo que nos permitió identificar a las células de Leydig fetales. Sin embargo, la capacidad de proliferación de las células de Leydig se identificó por el anticuerpo contra KI67, que marca a las células en proliferación. A medida que las células de Leydig diferenciadas dejan de proliferar y entran gradualmente en reposo, el análisis de las células de Leydig proliferando y no proliferando revela el efecto del BPA en el transcurso normal del tiempo durante el establecimiento de la población de células de Leydig *in situ*. Se contaron dos poblaciones de células de Leydig: (1) células de Leydig proliferando, positivas a KI67 (CYP11A1+/KI67+) y (2) células de Leydig no proliferando, negativas a KI67 (CYP11A1+/KI67-). La proporción de células de Leydig en proliferación en la población de control parecía similar en los testículos tratados con BPA y de control a los 19 *dpc*. Sin embargo, posteriormente el número de células de Leydig proliferativas fue significativamente menor en los testículos tratados con BPA que en los controles de 21-28 *dpc*. Una vez más, las diferencias no fueron significativas en el día 31 y entre los gazapos recién nacidos (Figura 14).



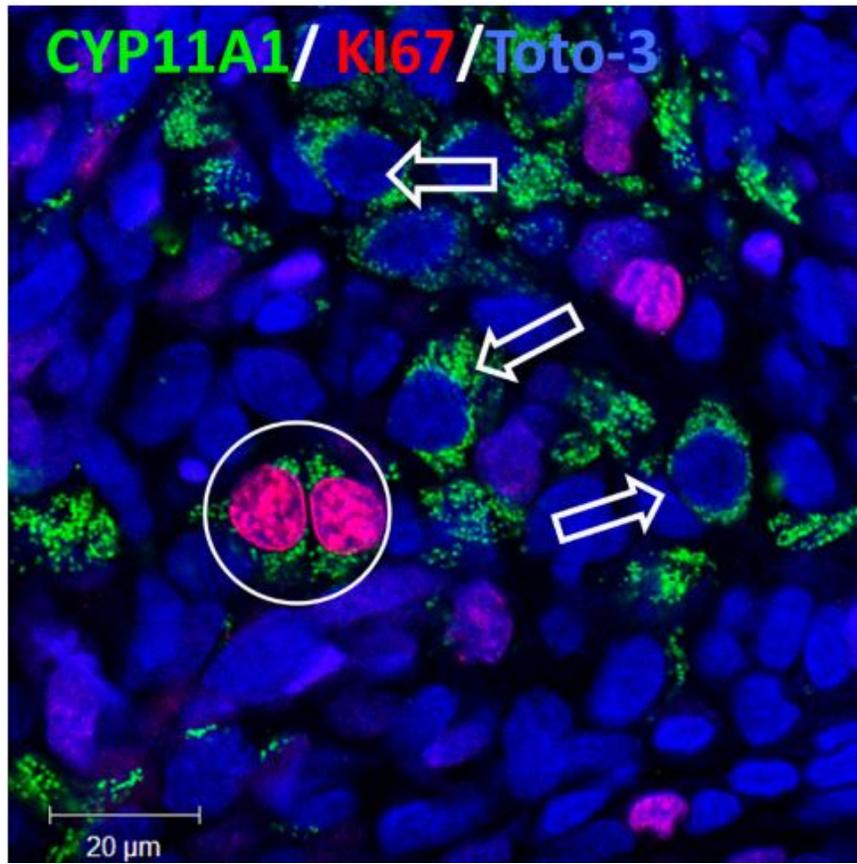
**Figura 14.** La proporción de las células de Leydig que proliferan fue menor en los testículos de conejos tratados *in útero* con Bisfenol A (BPA) respecto a los controles. Hay diferencias significativas aparentes en el número de células de Leydig proliferativas en los testículos tratados con BPA en comparación con los controles a los 21-28 *dpc* (\* $p < 0,05$ ). Las barras representan la media de una  $n=4$ ~ SEM. *dpc*: días post coito, *dpp*: días post parto.

Debido a que el recuento de células de Leydig presentado en la figura 14 se realizó utilizando secciones congeladas de 30  $\mu\text{m}$  de espesor, se hicieron reconstrucciones de imágenes confocales de 3,0  $\mu\text{m}$  de espesor para aumentar la resolución de las células de Leydig proliferativas y las no proliferativas. La figura 15 muestra secciones congeladas representativas de embriones controles y tratados con BPA a los 21 *dpc*.



**Figura 15.** Inmuntinciones representativas de secciones congeladas de testículos de embriones controles (A) y tratados con bisfenol A (BPA) (B) a 21 *dpc*. Las células de Leydig en proliferación, positivas para KI67, están encerradas en círculos blancos. Las flechas amarillas señalan a células de Leydig en proliferación, en las que el núcleo rojo se encuentra en otra capa óptica de la pila confocal. *dpc*: días post coito. El núcleo de todas las células fue teñido con TOTO.

La figura 16 muestra una colocación de inmunofluorescencia representativa en células de Leydig fetales de un testículo de control a los 28 *dpc*. Las células de Leydig identificadas expresaron CYP11A1 (verde) en las mitocondrias KI67 (rojo) se localizó en el núcleo de todos los tipos de células proliferando en los testículos. La fusión de la imagen confocal facilitó la identificación precisa de las células de Leydig proliferando de las que no se encuentra proliferando.

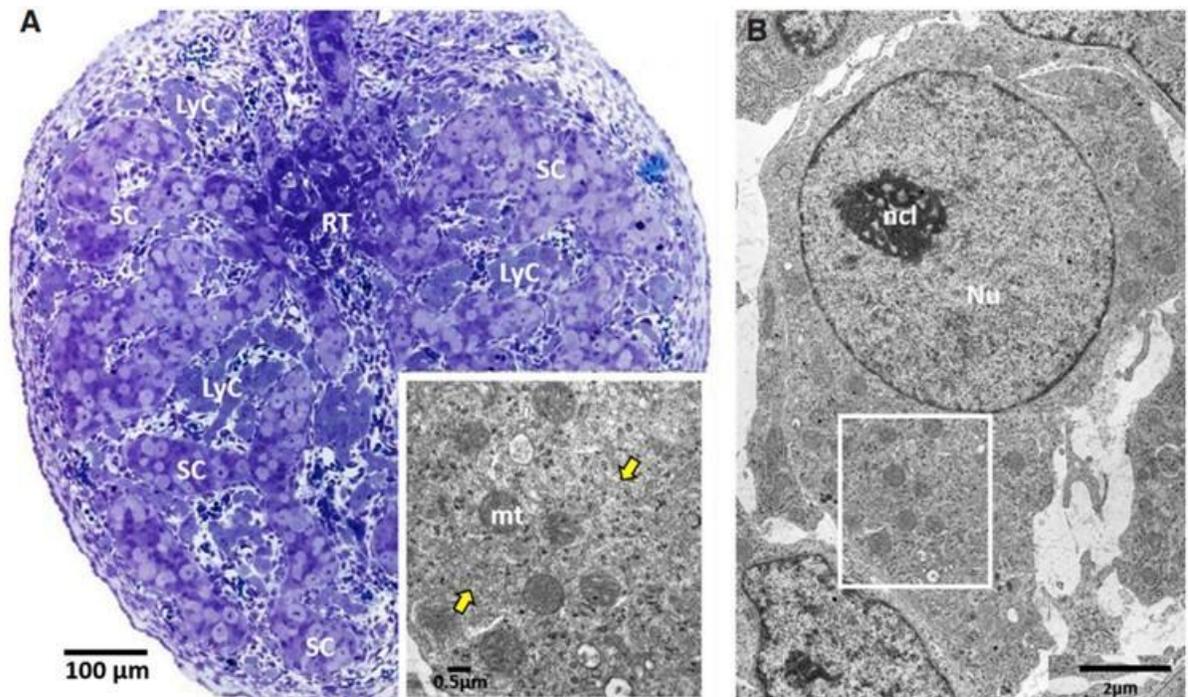


**Figura 16. Colocalización inmunofluorescente de alta resolución de CYP11A1 (verde) y KI67 (rojo) para identificar células de Leydig fetales proliferativas (círculo) y no proliferativas (flechas) de un testículo de control a los 28 *dpc*. *dpc*: días post coito. El núcleo de todas las células fue teñido con TOTO.**

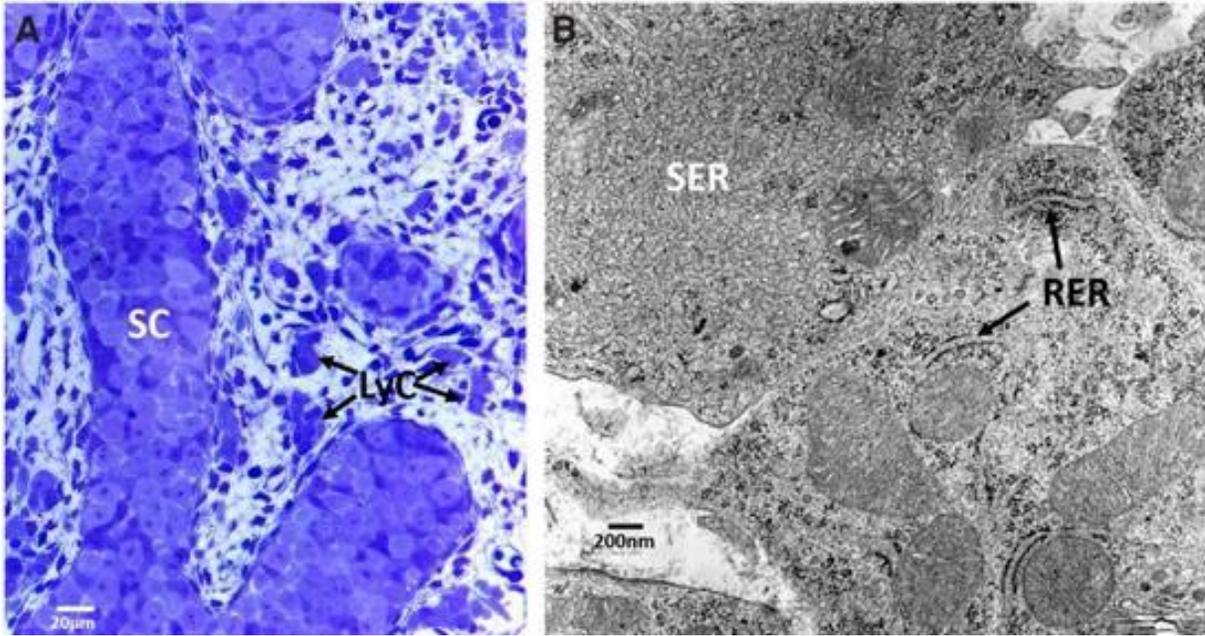
La proporción de células de Leydig proliferando fue menor en los grupos tratados respecto a los controles, lo que nos indica el efecto del BPA en el establecimiento de la población de las células de Leydig fetales. Por otra parte, la mayor proporción de células proliferando en los controles se correlaciona con los niveles de expresión significativamente más altos de los dos genes *CYP11A1* y *3 $\beta$ -HSD* analizados.

### *Diferenciación de las células de Leydig fetales*

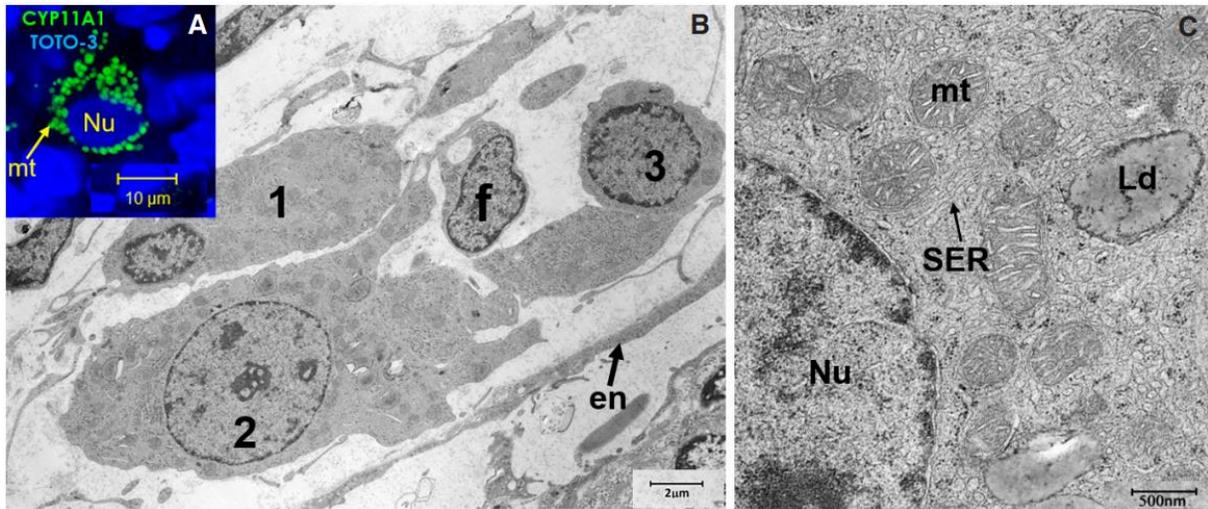
En el estudio ultraestructural para evaluar la cito diferenciación en células de Leydig proliferativas y no proliferativas, durante el tratamiento con BPA, se observó que a los 21 *dpc*, los testículos de conejo muestran los cordones seminíferos rodeados por el tejido estromal, entre los cuales se están diferenciando grupos de células de Leydig (Figura. 17 A, B). Además de ser más grandes que otras células del estroma, las células de Leydig diferenciadas desarrollan dos orgánulos celulares notables: las mitocondrias y el retículo endoplásmico liso. En contraste con las mitocondrias de las células de Leydig adultas con crestas tubulares, las células de Leydig fetales y recién nacidas del conejo en su mayoría mantienen crestas laminares en sus mitocondrias (Figuras 18B, 19C). Sin embargo, el retículo endoplásmico liso desplaza gradualmente a otros orgánulos y ocupa la mayor parte del espacio citoplasmático (Figuras 18B, 19C). A medida que los testículos fetales crecen considerablemente con la edad, principalmente debido al mayor espacio ocupado por el tejido del estroma (vasos sanguíneos, fibroblastos y matriz extracelular), los grupos de células de Leydig a los 28 *dpc* se vuelven más dispersos (Figura 18A). Interesantemente, los grupos incluían células de Leydig con diferentes grados de retículo endoplásmico liso y rugoso. Las células con predominio de retículo endoplásmico rugoso probablemente corresponden a células de Leydig que todavía están proliferando (Figura 18B).



**Figura 17. Imágenes representativas de microscopio óptico y electrónico de testículos fetales de conejo de control a los 21 *dpc*.** (A) Sección semifina teñida con azul de toluidina que muestra los cordones seminíferos (SC) conectados a la rete testis (RT), rodeados por grupos de células de Leydig (LyC) entre el tejido estromal. (B) Micrografía electrónica que muestra una célula de Leydig que empieza a formar cisternas de retículo endoplásmico liso (flechas amarillas). El recuadro en (A) muestra un área de gran aumento del cuadrado blanco en la imagen B. mt, mitocondrias redondas; Nu, núcleo; Ncl, nucléolo. *dpc*: días post coito.



**Figura 18. Micrografías de luz y electrónica de un testículo tratado con bisfenol A (BPA) a 28 *dpc*.** (A) Sección semifina que muestra los cordones seminíferos (SC) rodeados por racimos de Leydig ubicados entre el tejido estromal (LyC). (B) Ultraestructura de parte del citoplasma de dos células de Leydig unidas en un grupo. La célula superior muestra un retículo endoplásmico liso predominante (SER). Por el contrario, la célula de la parte inferior tiene un retículo endoplásmico rugoso (RER) predominante, que probablemente corresponden a células proliferativas y no proliferativas respectivamente. *dpc*: días post coito.



**Figura 19. Inmunofluorescencia y microscopía electrónica de una sección de testículo de control a los 28 *dpc*.** (A) Inmunotinción de CYP11A1 (verde), localizado en la mitocondria de la célula de Leydig, los núcleos se tiñen con yoduro de toto-3 (azul). (B) Micrografía electrónica que muestra un grupo de células en el estroma: tres células de Leydig (1, 2 y 3), un fibroblasto en corte transversal (f) y una célula endotelial (en). (C) Ultraestructura de una célula de Leydig, el citoplasma, muestra abundantes mitocondrias prominentes con cisternas laminares, retículo endoplásmico liso (SER) y gotitas de lípidos (Ld). Nu, núcleo. *dpc*: días post coito.

A nivel ultraestructural, la cantidad de cisternas lisas del retículo endoplásmico liso en las CLF en el conejo nos indica la presencia de una población heterogénea en términos de diferenciación, por lo tanto, el efecto del BPA actúa sobre una población de células de Leydig fetales asincrónicas probablemente aumentando su efecto sobre la vía esteroidogénica normal.

## DISCUSIÓN

Los estudios sobre la toxicidad del BPA en el desarrollo y la reproducción de los roedores llevaron a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) a proponer que 50 mg/kg por día representan el nivel más bajo en el que se observan efectos adversos (LOAEL por sus siglas en inglés) en mamíferos. Con dicho criterio, en el presente estudio, suministramos diariamente 50 mg/kg de BPA a conejas preñadas. El tratamiento se inició a los 15 *dpc*, correspondiente al establecimiento de las crestas genitales en el embrión del conejo, seguido del inicio de la especificación de las células de Sertoli y las células de Leydig en el testículo fetal (Díaz-Hernández et al., 2008). Para evaluar el efecto del BPA en la diferenciación de la población de las CLF, analizamos los perfiles de expresión de tres genes que codifican factores implicados en la producción de testosterona: *SF1*, *CYP11A1*, *3 $\beta$ -HSD* y el del receptor de andrógenos *RA*, durante el período fetal y al tercer día postparto (3 *dpp*).

Diferentes estudios en los que se ha empleado al ratón como modelo, encontraron que *SF1* juega un papel central en la especificación de las células de Leydig, regulando los genes que codifican para las enzimas involucradas en el proceso de esteroidogénesis (Hatano et al., 1996; Leers-Sucheta et al., 1997). Los cambios en los niveles de *SF1* alteran la diferenciación y la capacidad esteroidogénica de las células de Leydig durante la etapa fetal, lo que a su vez compromete la población de las células de Leydig en el testículo adulto (Barsoum et al., 2013). *SF1* se expresa por primera vez en la cresta urogenital en E9.5 y luego continúa en las células de Sertoli y las células de Leydig durante toda la vida

posnatal y adulta en roedores, mientras que, en humanos, *SF1* se comienza a expresar en la cresta genital hacia el día 33 de gestación y hacia las 18 SG los niveles de expresión son detectados principalmente en el estroma (Hanley et al., 1999; Mamsen et al., 2017).

En la cresta genital, el testículo es determinado por la expresión del gen *SRY* en las células de pre-Sertoli de los cordones seminíferos. A su vez, dichas células producen factores de señalización que especifican a las células progenitoras de las CLF ubicadas en el estroma testicular. El factor *SF1* se dimeriza con *SRY* y *AMH* en las células de pre-Sertoli embrionarias y células de Sertoli fetales y perinatales, respectivamente. Los testículos de conejo controles mostraron los niveles más altos de *SF1* a los 17 *dpc*. Posteriormente, los niveles disminuyeron mostrando variaciones considerables a lo largo de todo el período analizado. Sin embargo, en los animales tratados con BPA los niveles de *SF1* fueron significativamente diferentes en el periodo perinatal. Resultaron más altos a los 27 *dpc* y más bajos a los tres *dpp*. Los niveles de expresión de *SF1* detectados en el presente estudio, pueden corresponder al cambio en la proporción de células de los dos tipos de poblaciones celulares que expresan *SF1* o a una evidente la alteración provocada por el disruptor endócrino durante el proceso de diferenciación normal de las células de Leydig.

El hecho de que los niveles de transcripción de *SF1* corresponden a las células de Sertoli y Leydig en el testículo fetal de conejo, la falta de una correlación directa entre los niveles de *SF1*, *CYP11A1*, *3 $\beta$ -HSD* y *RA* puede deberse a las múltiples vías involucradas en la regulación del proceso esteroidogénico que puede

ser alterado por el BPA. A nivel testicular, el BPA actúa como antagonista de los receptores de andrógenos (Wolstenholme et al., 2011) y puede inhibir la actividad enzimática de CYP11A1 y 3 $\beta$ -HSD (Peretz & Flaws, 2013; Ye et al., 2011). Además, el BPA interrumpe el equilibrio de las hormonas esteroides en los testículos, alterando los niveles de CYP11A1 y CYP19 a través de la vía de señalización de JNK/c-jun, independientemente de SF1 (Lan et al., 2017).

La mayoría de los estudios sobre el mecanismo del efecto del BPA en las células de Leydig corresponden a estudios *in vitro* o con roedores posnatales. En el presente trabajo, el diseño experimental para observar el efecto del BPA sobre las CLF del conejo pretendió imitar la condición real en la que el BPA afecta a los testículos fetales desde un punto de vista holístico. Dado que el BPA se suministró por vía oral a conejas preñadas, la alteración tanto de la proliferación como de la esteroidogénesis de la población de CLF observado aquí resulta de múltiples factores. El BPA puede interrumpir la expresión génica de SF1 y las enzimas esteroidogénicas CYP11A1 y 3 $\beta$ -HSD, a través de vías de señalización alternativas, que incluyen JNK/c-jun, control de retroalimentación de esteroides y metabolismo hormonal. Por lo tanto, la falta de correlación paralela entre los niveles génicos del receptor nuclear SF1 y las enzimas esteroidogénicas puede explicarse por los efectos multifactoriales del BPA en el desarrollo de la población de CLF.

Aunque el BPA tiene efectos adversos sobre las enzimas que participan en el proceso de esteroidogénesis de las células de Leydig, los resultados varían según el modelo animal y el diseño experimental. El tratamiento *in utero* de ratas preñadas con 400 mg/kg de BPA reguló a la baja los niveles RNAm de CYP11A1 y su proteína

(Lv et al., 2019). En crías machos de ratones expuestas a 50 mg/Kg/día de BPA durante el período prenatal, hubo una disminución evidente de los niveles de *CYP11A1* en los testículos (Xi et al., 2011). En ratones, la amplificación testicular tanto de *CYP11A1* como de *3 $\beta$ -HSD* se detectó de los 13 a los 20 *dpc* (Greco & Payne, 1994).

En hembras preñadas de conejo, los esteroides C21 de origen placentario son precursores potenciales en la biosíntesis de testosterona antes del inicio de esta función en el testículo fetal, donde el inicio de la síntesis de testosterona por parte de la *3 $\beta$ -HSD* ocurre entre los 17 y 19 *dpc* (Wilson & Siiteri, 1973). Usando qRT-PCR en CLF de conejos controles confirmamos que los niveles de *CYP11A1* y *3 $\beta$ -HSD* comienzan a los 17 *dpc* y alcanzan su punto máximo a los 21 *dpc*. Posteriormente, los niveles de expresión de la transcripción de los dos genes oscilan hasta 3 *dpp*.

Contrario a los testículos de controles a los 17 *dpc*, dos días después del inicio del tratamiento, los niveles de *CYP11A1* y *3 $\beta$ -HSD* fueron significativamente más bajos en los testículos tratados con BPA. Aunque los niveles aumentan a los 21 y 26 *dpc*, en el día 27, *CYP11A1* disminuye significativamente más que en los controles, mientras que el nivel de expresión de *3 $\beta$ -HSD* es más bajo a los 27 y 28 *dpc*. Finalmente, aunque durante el período perinatal (20 *dpc* a 3 *dpp*), los diferentes niveles de transcripción de los dos genes aparecieron entre los testículos de control y tratados con BPA, estos no fueron significativos. Un mecanismo propuesto para el efecto anti-androgénico del BPA es que compite con los andrógenos por el RA, evitando su translocación al núcleo celular. Así, el BPA inhibe la formación de

complejos funcionales necesarios para la transcripción (Teng et al., 2013). Además, en un trabajo reciente en *in vitro* (Wang et al., 2017) observaron que la proliferación de células TM4 de Sertoli de ratón, disminuye por la acción antagonista del el BPA sobre el RA, ya que por una parte se inhibe las interacción de las regiones amino y carboxilo terminales de RA y por otra aumentan las interacciones de AR con los co-represores Mediador silenciador de los receptores de la hormona tiroidea (SMRT, por sus siglas en inglés) y el Correpresor del receptor nuclear (NCoR, por sus siglas en inglés), lo que indica un mecanismos antiandrogénicos mediante los cuales el BPA antagoniza la señalización AR.

Además de las células de Sertoli, las células peritubulares y los gonocitos también expresan el RA en los testículos fetales. Por lo tanto, los efectos perturbadores causados por el BPA en la diferenciación, proliferación y actividad esteroidogénica de la población de CLF también afectan el tiempo de señalización entre las células, lo que pueden diferir entre especies (Hazra et al., 2013). Las células de Leydig de fetos de humanos y testículos de recién nacidos expresan el RA (Boukari et al., 2009). Por el contrario, las CLF en roedores son independientes de los andrógenos (Shima et al., 2015). En las gónadas fetales de ratas macho, el RA se expresó a los 17 *dpc* y posteriormente aumentó. Nuestros resultados actuales muestran que, en comparación con los controles, los niveles de RA de los animales tratados con BPA son significativamente más bajos a los 27 *dpc*. Sin embargo, después del nacimiento, los testículos de los recién nacidos a los tres *dpp* manifiestan niveles significativamente más altos.

Al igual que los pacientes humanos con síndrome de insensibilidad a los andrógenos (Brinkmann, 2001), los ratones deficientes en RA (ArKO) muestran una inversión sexual de macho a hembra (Yeh et al., 2002). Aunque los ratones ArKO desarrollan testículos fetales más pequeños con células de Sertoli y germinales degeneradas, las células de Leydig se vuelven hipertróficas. Aunque en el conejo encontramos alteraciones en la expresión de RA en el desarrollo de los testículos perinatales, las posibles consecuencias patológicas y/o reproductivas no fueron estudiadas.

Las oscilaciones en los niveles de expresión génica observados en nuestros resultados se atribuyen principalmente al efecto del BPA sobre los procesos de diferenciación y esteroidogénesis de las células de Leydig fetales. Sin embargo, es posible que estas variaciones en los perfiles de expresión también puedan derivar de las múltiples vías involucradas en la regulación del proceso esteroidogénico o a las diferencias en la proporción de células que expresan los genes analizados. Los genes constitutivos se definen como genes que son expresados de manera estable en todas las células de un organismo, independientemente del tipo de tejido, etapa de desarrollo, estado del ciclo celular o señal externa, o como marcadores del estado biológico saludable de un organismo (Joshi et al., 2022); por lo tanto, se utilizan como control interno para validar los niveles de expresión génica. En nuestras condiciones experimentales *Hprt* resultó ser el gen más estable y se utilizó para validar los niveles de la expresión de los genes blanco analizados, sin embargo actualmente el gen *Hprt* se ha descrito como un marcador que promueve la proliferación celular (Wang et al., 2021), por lo tanto es importante considerar que

los patrones aleatorios observados en los perfiles de expresión del presente estudio también pudieran ser el reflejo de un artefacto experimental derivados del gen constitutivo utilizado.

La enzima CYP11A1 es el primer paso limitante que regula la conversión de colesterol a pregnenolona en la mitocondria. Después, la enzima 3 $\beta$ -HSD, en conjunto con otras enzimas ubicadas en el retículo endoplásmico liso, completan la síntesis de testosterona. A nivel ultraestructural, las CLF diferenciadas en el conejo presentan mitocondrias redondeadas, la mayoría con crestas laminares y abundantes cisternas del retículo endoplásmico liso. Sin embargo, durante el desarrollo de los testículos de conejo, las CLF representan una población heterogénea en términos de diferenciación. A los 21 *dpc*, la mayoría de las células de la población de CLF contienen menos cisternas lisas del retículo endoplásmico liso; sin embargo, las CLF forman grupos intersticiales masivos mayores que la posterior población de CLF de los testículos fetales. Interesantemente, a los 21 *dpc*, los niveles de *CYP11A1* y *3 $\beta$ -HSD* son más altos, al igual que el número de CLF en proliferación. Por lo tanto, aunque un posible artefacto no puede descartarse, el mayor número de células de Leydig encontradas en los testículos tratadas pudiera explicar los niveles significativamente mayores *CYP11A1* y *3 $\beta$ -HSD*.

Usando a la rata como modelo, se encontró que el BPA acelera la diferenciación de las células de Leydig posnatales sin afectar su proliferación (Chen et al., 2018). En contraste, nuestros resultados actuales en el conejo mostraron que, además de alterar la diferenciación, hubo también una disminución significativa en la proliferación de células de Leydig en los fetos de conejas tratadas con el disruptor.

Además de las diferencias entre especies, el diseño experimental difiere entre ambos estudios. El efecto del BPA en la rata fue analizado en las células de Leydig posnatales de dos meses. Por el contrario, aquí analizamos el desarrollo temprano de las CLF. Por lo tanto, el efecto del BPA puede explicarse por las diferentes etapas de las poblaciones de Leydig y la vía en que el BPA fue suministrado: directo en las crías de la rata e indirecto en los fetos del conejo. Los contextos histológicos de las poblaciones de Leydig y el ambiente endocrino de los testículos difieren considerablemente.

En el conejo, los conductos de Müller y los conductos de Wolff se desarrollan de forma similar en ambos sexos entre los 15 y 20 *dpc*. Los resultados presentados muestran que las células de Leydig comienzan a producir testosterona a los 17 *dpc*. En experimentos clásicos, los fetos machos de conejo que fueron castrados a los 19–21 *dpc*, de manera sorprendente, desarrollaron un fenotipo femenino (Jost, 1948). Alfred Jost encontró que el testículo fetal produce dos factores indispensables para la masculinización del aparato reproductor del feto: la hormona antimulleriana y la testosterona. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en los niveles séricos de testosterona fetal entre los tratados con BPA y los controles. Por lo tanto, el fenotipo somático masculino se desarrolló normalmente.

Los niveles de testosterona sérica medidos en fetos de rata tratados con BPA a los 21 *dpc* fueron más bajos que los controles (Lv et al., 2019). De manera similar, nuestros resultados muestran que los niveles séricos de testosterona fueron más moderados tanto en el control como en los fetos tratados con BPA a los 17 y 21 *dpc*.

Posteriormente, los niveles aumentaron tanto en los testículos tratados con BPA como en los no tratados sin diferencias significativas hasta los 28 *dpc*. Sin embargo, se produjeron diferencias significativas tres días después del nacimiento, siendo mayores en los testículos de los conejos tratados con BPA. El aumento sustancial de la testosterona sérica en las crías posnatales se correlaciona positivamente con el aumento de los niveles de *RA* en las CLF tratadas con BPA. Bjerregaard, Bro-Rasmussen, y Reumert (1974) en su estudio ultraestructural proponen que, el desarrollo de células de Leydig en el testículo fetal del conejo se puede dividir en tres fases: Fase 1 (16-17 *dpc*) aparecen células de Leydig inmaduras, Fase 2 (18-21 *dpc*), las CLF se diferencian con un aumento en la presencia de retículo endoplasmático liso y disminución de retículo endoplasmático rugoso y Fase 3 (22 *dpc* hasta el nacimiento 31 *dpc*). Los autores describieron que durante las fases 1 y 2, la diferenciación en las células de Leydig no es sincrónica y, posteriormente evoluciona hacia la diferenciación sincrónica en la fase 3.

Sin embargo, nuestros resultados muestran que las CLF de conejo en diferenciación persisten como una población asincrónica durante la fase 3. Encontramos además que de la variable presencia del retículo endoplásmico liso entre las células de Leydig, la capacidad proliferativa de las células de Leydig menos diferenciadas sugiere la presencia de una población de células de Leydig asincrónica. Por lo tanto, el efecto perturbador del BPA que actúa sobre una población de células de Leydig fetales asincrónicas probablemente aumenta el efecto perturbador multifactorial del BPA sobre la vía esteroidogénica normal.

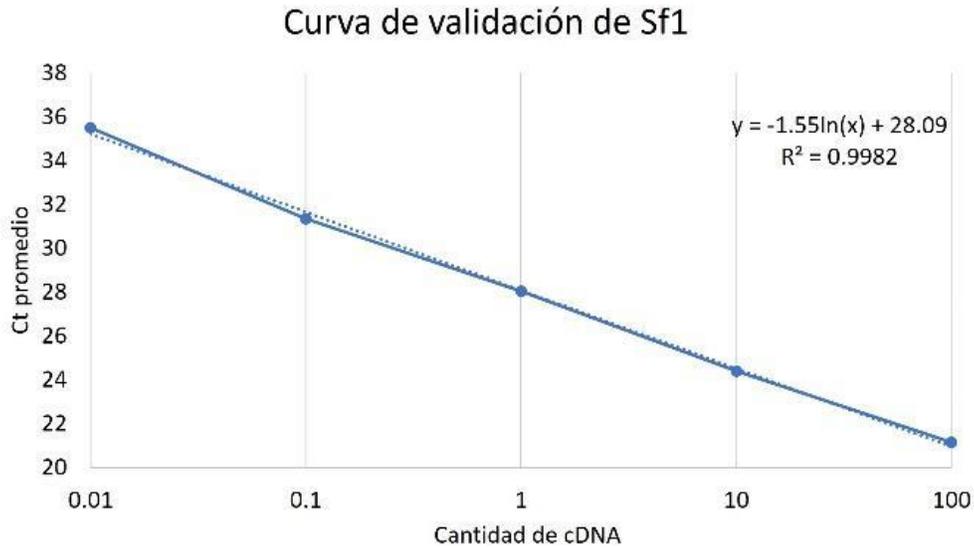
En el presente trabajo algunas limitantes son importantes a considerar, una de estas son la diferencia en la proporción de células que expresan los genes que fueron analizados. Para estudios futuros, separar e identificar a las poblaciones de células de Leydig, células de Sertoli y células germinales en etapas fetales y posnatales en testículos de conejo, permitiría determinar mejor la expresión génica para cada tipo celular y conocer el efecto del BPA sobre estas. Por otro lado, los reportes sobre la localización del receptor a andrógenos en el testículo fetal indican variaciones entre especies por lo que no queda claro sobre que células ejerce el BPA su efecto disruptor. En nuestro estudio no se localizó espacialmente al receptor a andrógenos sin embargo, para estudios posteriores sería importante conocer su ubicación en las diferentes poblaciones celulares del testículo fetal, utilizando técnicas como hibridación *in situ* o inmunofluorescencias, lo que permitiría por una parte conocer sobre que células estaría actuando el BPA y por otra parte conocer sus posibles efectos sobre la vía de señalización esteroidogénica establecida por las células de Leydig fetales durante el desarrollo testicular.

## CONCLUSIÓN

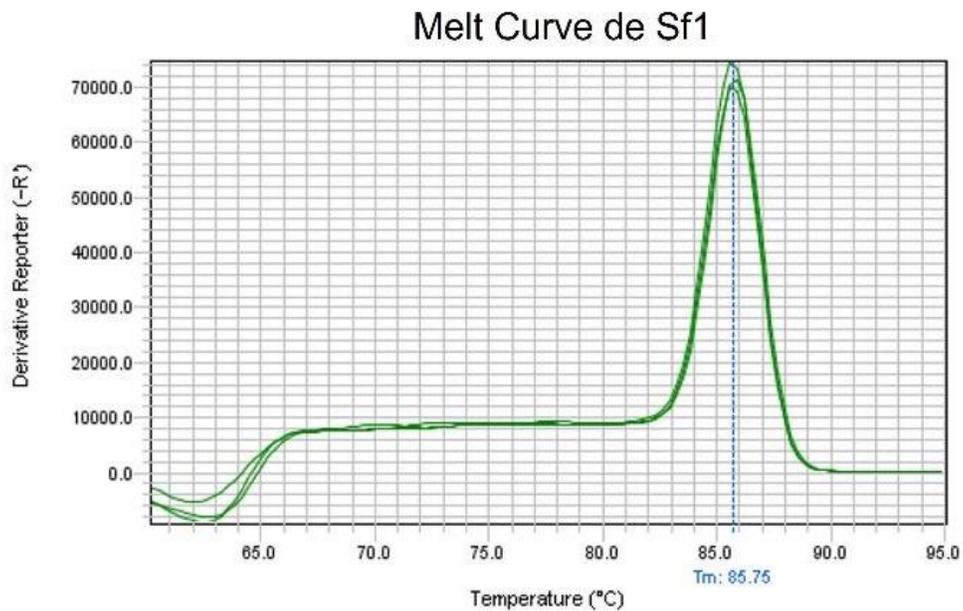
Los resultados presentados muestran la complejidad de los efectos disruptivos del BPA sobre el desarrollo de células de Leydig fetales *in situ*. Para conocer el efecto con una perspectiva holística, el disruptor endócrino fue suministrado a las conejas preñadas por vía oral, tal como ocurre en ambientes contaminados. Encontramos que, en el conejo, las células de Leydig fetales constituyen una población asincrónica que puede compensar los efectos nocivos causados a la vía esteroidogénica normal durante el período fetal. Sin embargo, aunque la mayoría de las células de Leydig fetales citodiferenciadas desaparece alrededor de los 10 *dpp*, los niveles de RA y testosterona sérica fueron más altos en los recién nacidos tratados con BPA a los 3 *dpp*. Quedan por estudiar los posibles efectos permanentes sobre la capacidad reproductiva, y el potencial efecto oncogénico en los conejos adultos como se ha postulado en los testículos humanos.

## ANEXO IMÁGENES DE CURVAS DE VALIDACIÓN Y DE FUSIÓN

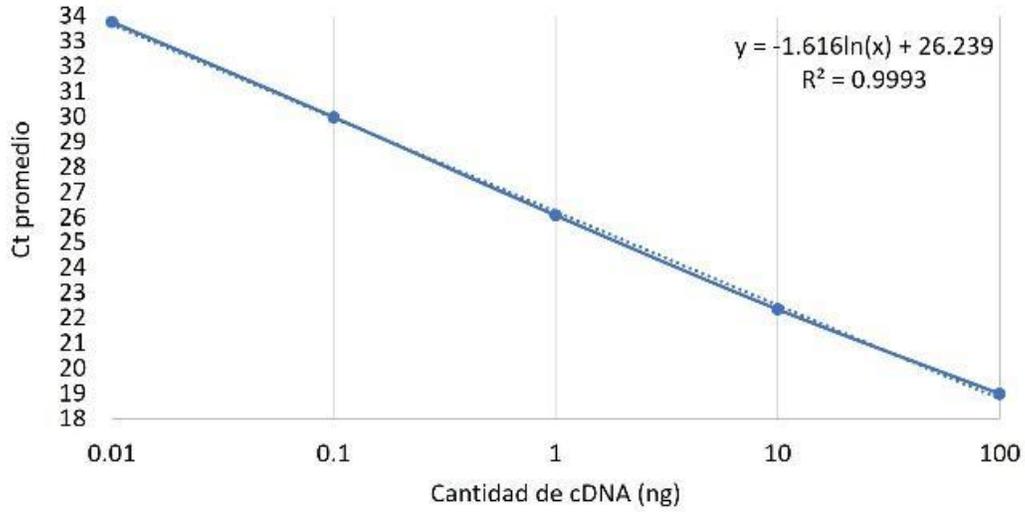
Curvas de validación y curvas de fusión (melt curves) de los genes *SF1*, *CYP11A1*, *3β-HSD* Y *RA* y de los genes endógenos *HPRT*, *GAPDH*, *H2AX* Y *YWHA2*.



$$\text{Pendiente} = -1.55 \Delta \text{e} = -3.29$$

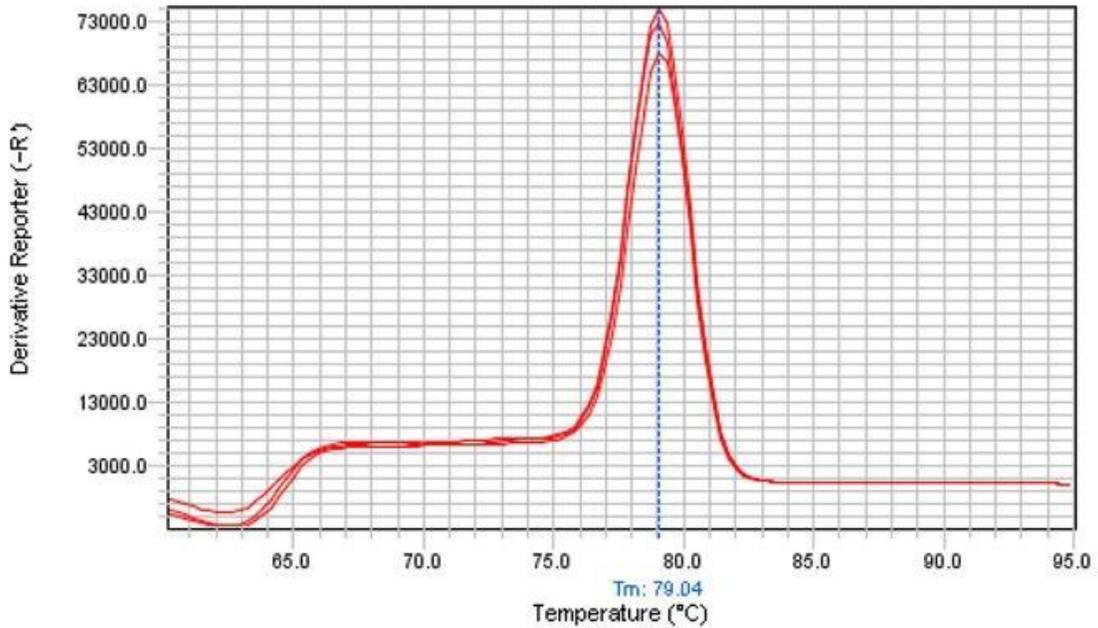


### Curva de validación de Cyp11a1

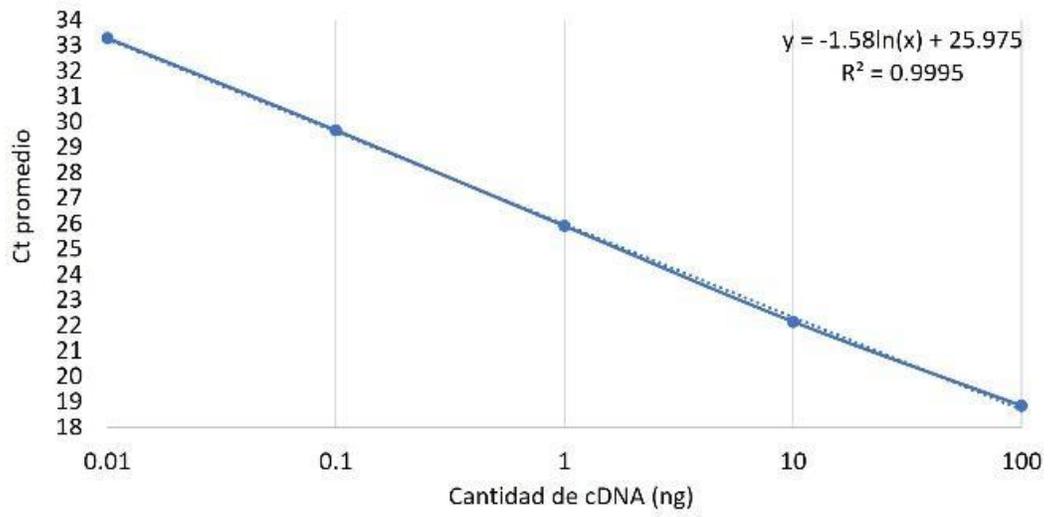


Pendiente= -1.616  $\Delta\text{-e} = -3.64$

### Melt Curve de Cyp11a1

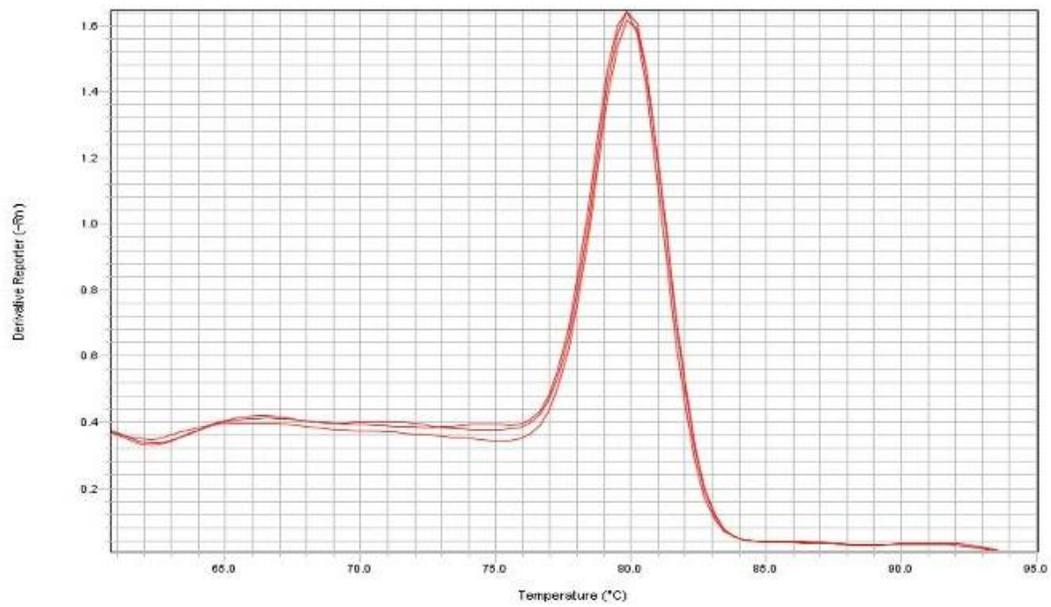


### Curva de validación de 3β-Hsd

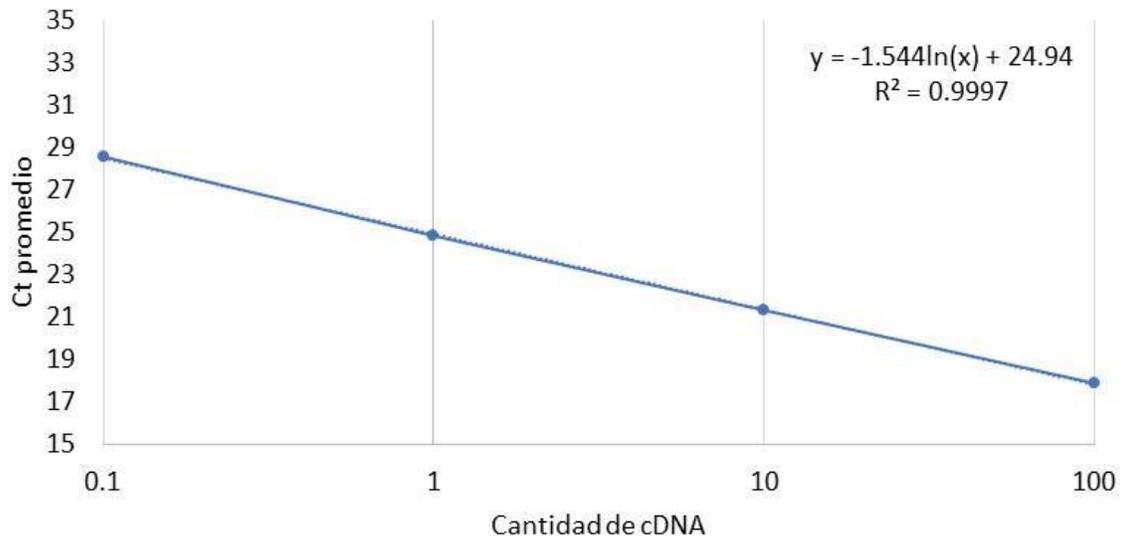


Pendiente= -1.58  $\wedge$ -e = -3.46

### Melt Curve de 3β-Hsd

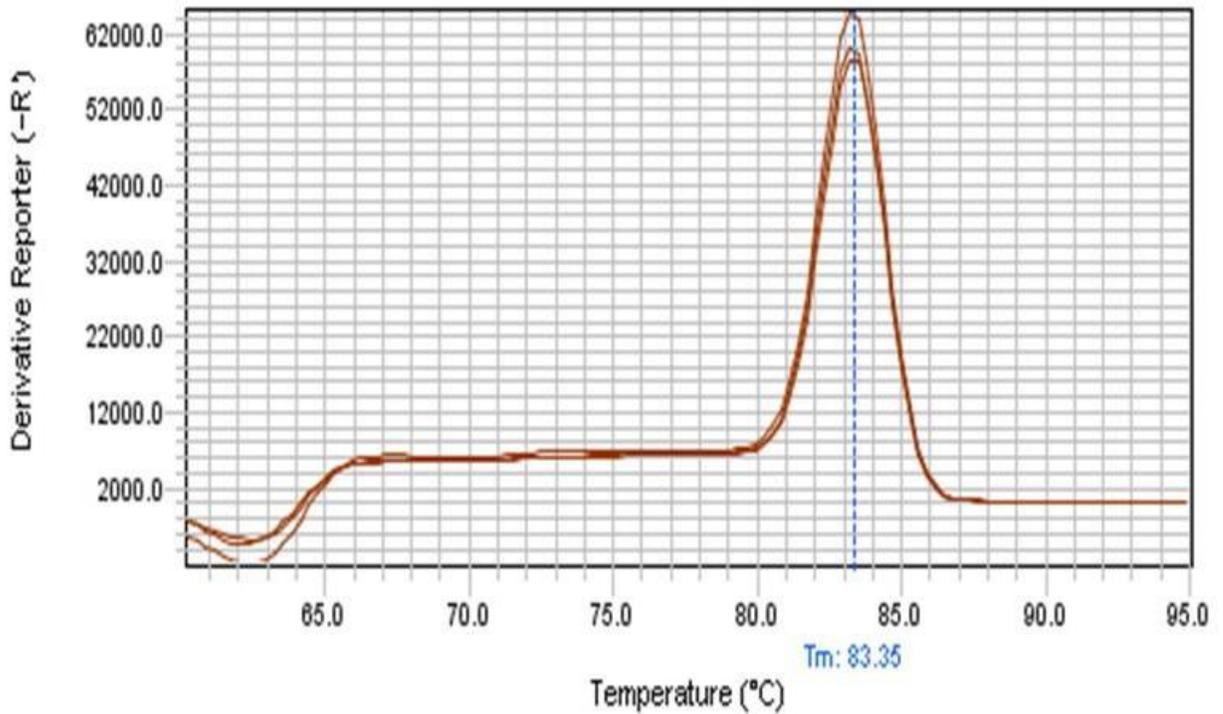


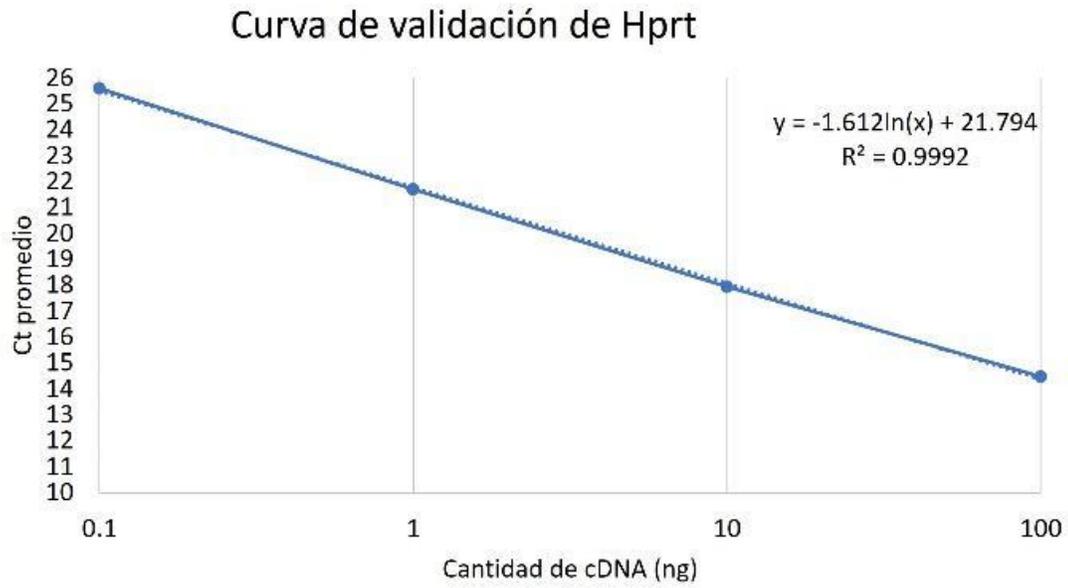
### Curva de Validación de RA



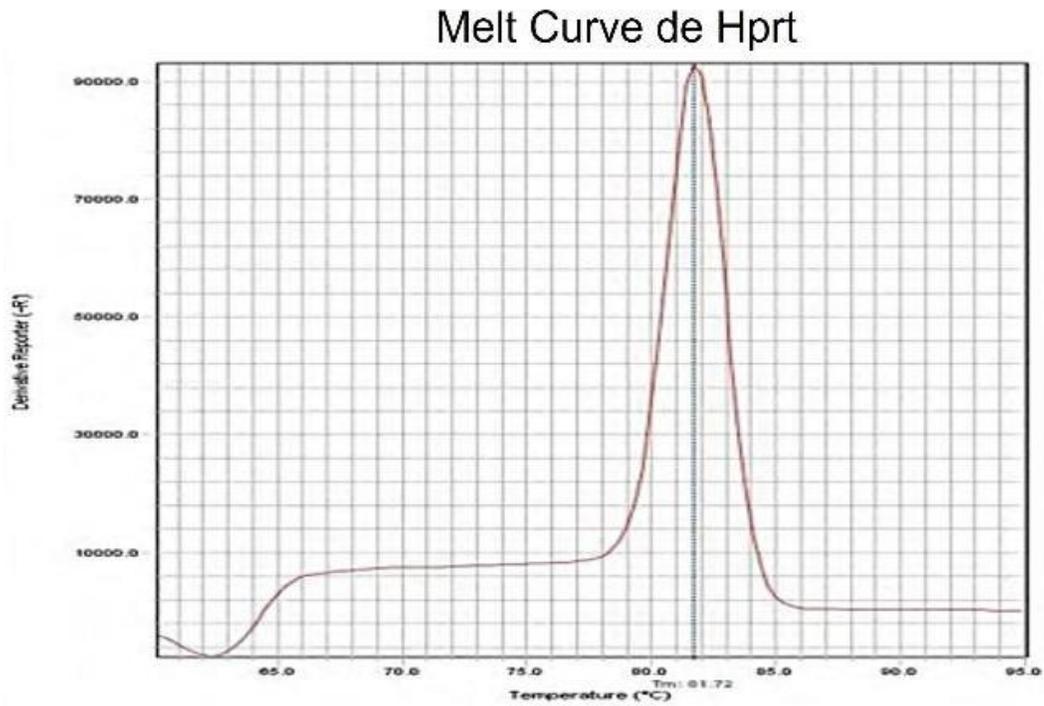
Pendiente= -1.544  $\Delta C_t = -3.25$

### Melt Curve de RA

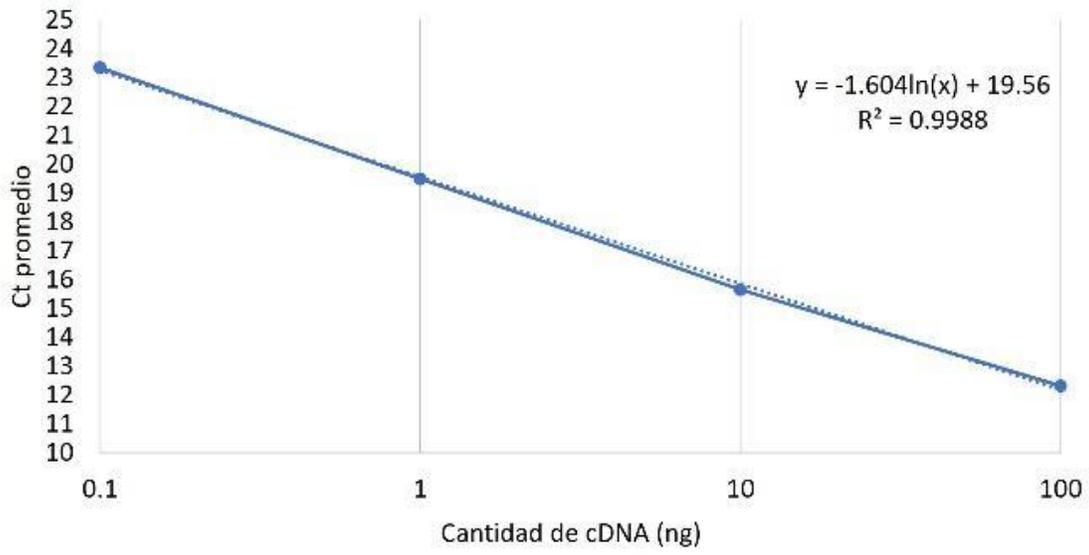




Pendiente= -1.612  $\Delta$ -e = -3.65

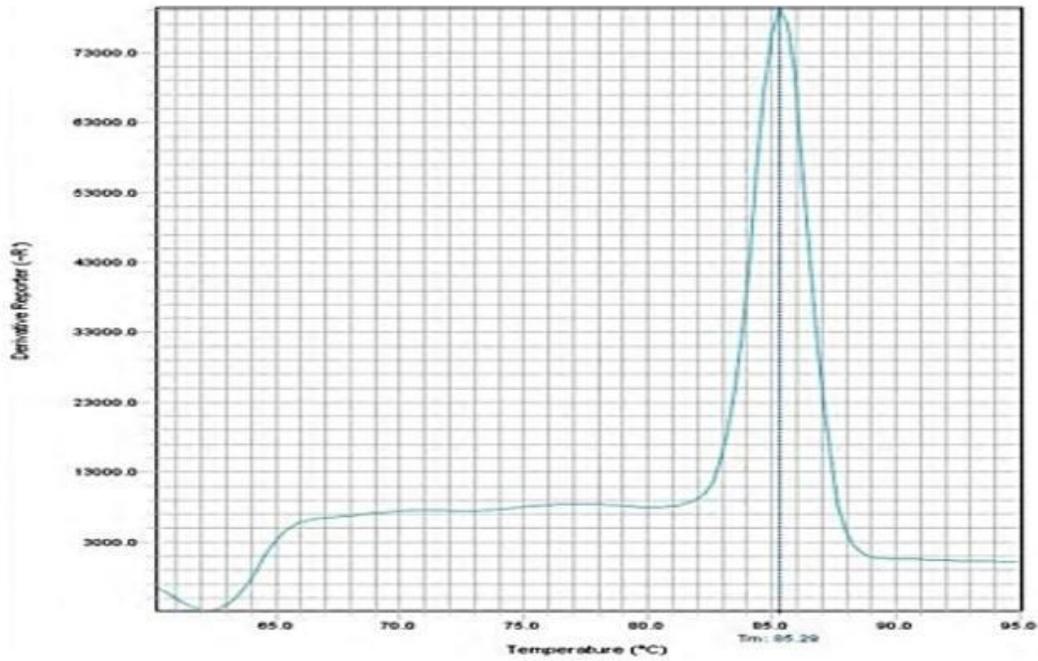


### Curva de validación de Gapdh

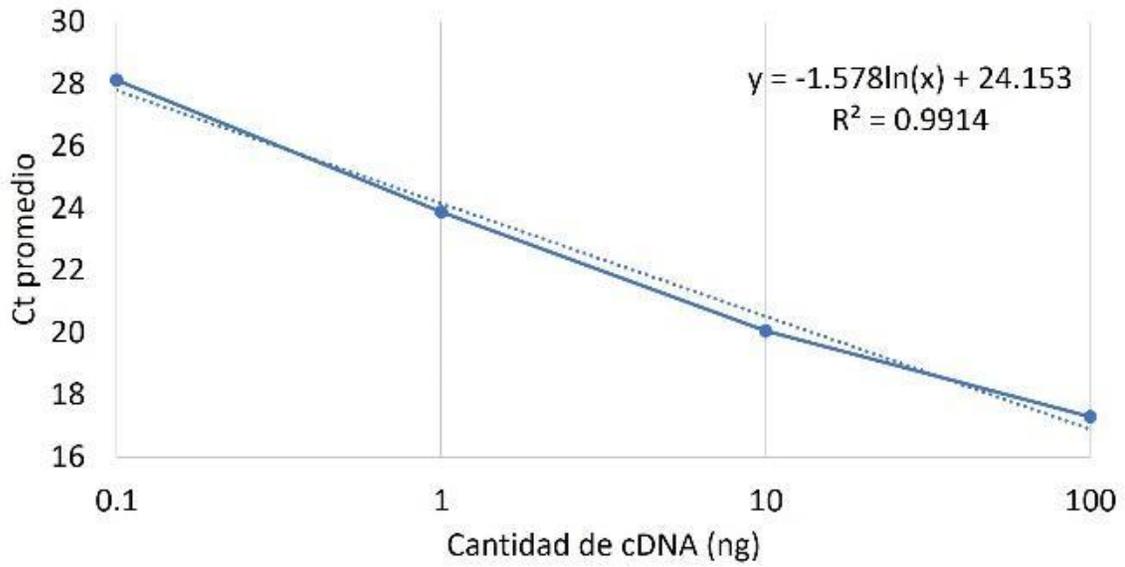


Pendiente= -1.604  $\Delta -e = -3.61$

### Melt Curve de Gapdh

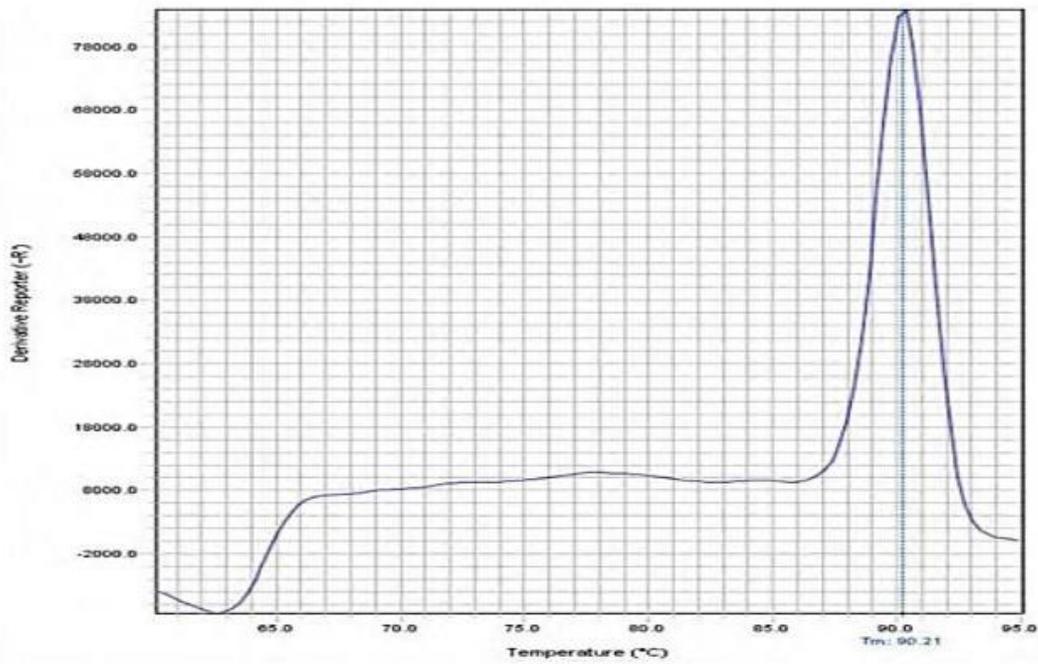


Curva de validación de H2AX

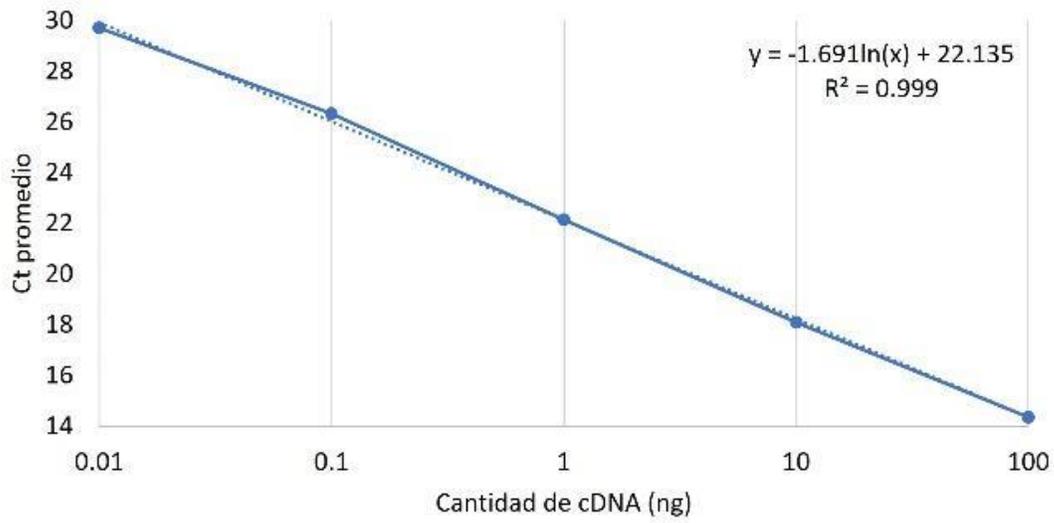


Pendiente= -1.578  $\Delta$ -e = -3.45

Melt Curve de H2AX

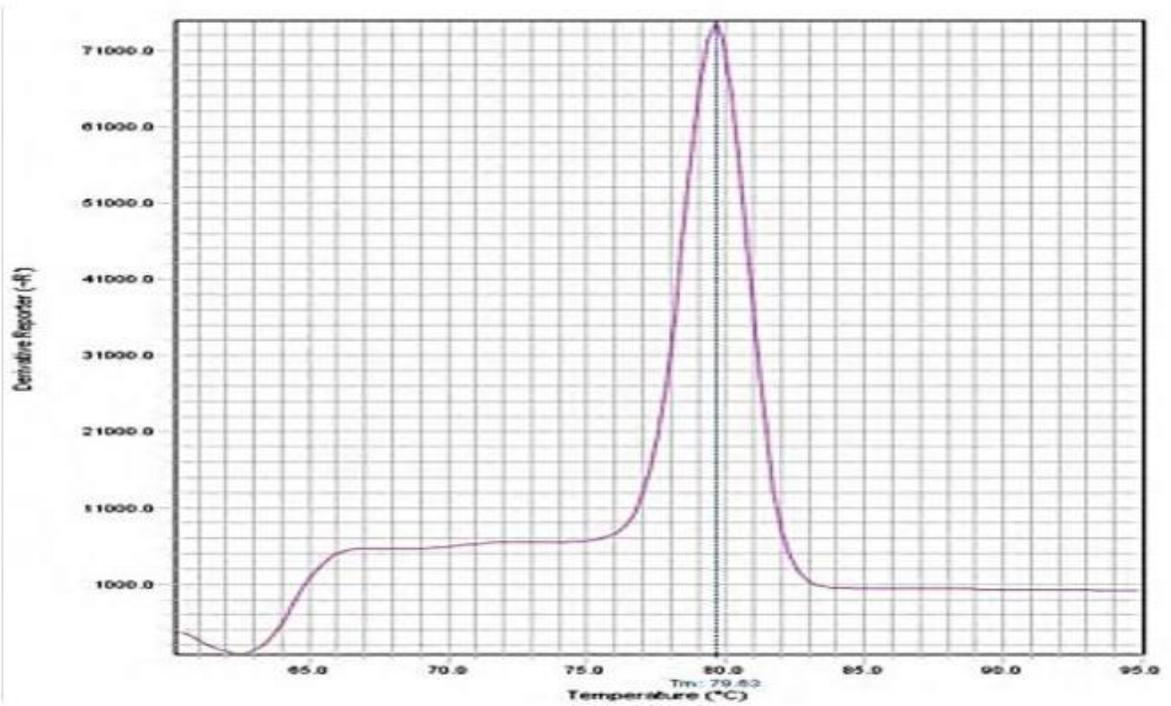


### Curva de validación de Ywha2



Pendiente= -1.691  $\Delta$ -e = -4.17

### Melt Curve de Ywha2



## BIBLIOGRAFÍA

- Al Jishi, T., & Sergi, C. (2017). Current perspective of diethylstilbestrol (DES) exposure in mothers and offspring. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N. Y.)*, 71, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.04.009>
- Andrae, J., Gallini, R., & Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development*, 22(10), 1276-1312. <https://doi.org/10.1101/gad.1653708>
- Archambeault, D. R., & Yao, H. H.-C. (2010). Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), 10526-10531. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000318107>
- Asklund, C., Jørgensen, N., Kold Jensen, T., & Skakkebaek, N. E. (2004). Biology and epidemiology of testicular dysgenesis syndrome. *BJU International*, 93 Suppl 3, 6-11. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2004.04703.x>
- Audí, L., Fernández-Cancio, M., Pérez De Nanclares, G., & Castaño, L. (2006). Disgenesias gonadales y pseudohermafroditismo masculino. *Anales de Pediatría*, 64(Supl.2), 23-37.
- Baillie, A. H. (1964). Age changes in the mitochondria and succinoxidase system of the Leydig cell. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 62(1), 72-79. <https://doi.org/10.1007/BF00339052>
- Balakrishnan, B., Henare, K., Thorstensen, E. B., Ponnampalam, A. P., & Mitchell, M. D. (2010). Transfer of bisphenol A across the human placenta. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 202(4), 393.e1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.01.025>
- Barsoum, I. B., Kaur, J., Ge, R. S., Cooke, P. S., & Yao, H. H.-C. (2013). Dynamic changes in fetal Leydig cell populations influence adult Leydig cell populations in mice. *The FASEB Journal*, 27(7), 2657-2666. <https://doi.org/10.1096/fj.12-225060>

- Barsoum, I. B., & Yao, H. H.-C. (2010). Fetal Leydig cells: Progenitor cell maintenance and differentiation. *Journal of Andrology*, 31(1), 11-15. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.008318>
- Behringer, R. R., Finegold, M. J., & Cate, R. L. (1994). Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell*, 79(3), 415-425. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90251-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90251-8)
- Bitgood, M. J., Shen, L., & McMahon, A. P. (1996a). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Current Biology*, 6(3), 298-304. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00480-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00480-3)
- Bitgood, M. J., Shen, L., & McMahon, A. P. (1996b). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Current Biology: CB*, 6(3), 298-304. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00480-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00480-3)
- Bjerregaard, P., Bro-Rasmussen, F., & Reumert, T. (1974). Ultrastructural development of fetal rabbit testis. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 147(3), 401-413. <https://doi.org/10.1007/BF00307473>
- Boukari, K., Meduri, G., Brailly-Tabard, S., Guibourdenche, J., Ciampi, M. L., Massin, N., Martinerie, L., Picard, J.-Y., Rey, R., Lombès, M., & Young, J. (2009). Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Müllerian hormone repression during early human testis development. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(5), 1818-1825. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1909>
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M. J., Rossant, J., Hamada, H., & Koopman, P. (2006). Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. *Science*, 312(5773), 596-600. <https://doi.org/10.1126/science.1125691>
- Brennan, J., Tilmann, C., & Capel, B. (2003). Pdgfr- $\alpha$  mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes & Development*, 17(6), 800-810. <https://doi.org/10.1101/gad.1052503>

- Brinkmann, A. O. (2001). Molecular basis of androgen insensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179(1-2), 105-109. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00466-x](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00466-x)
- Buehr, M., Gu, S., & McLaren, A. (1993). Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development (Cambridge, England)*, 117(1), 273-281. <https://doi.org/10.1242/dev.117.1.273>
- Bullejos, M., & Koopman, P. (2004). Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Molecular Reproduction and Development*, 68(4), 422-428. <https://doi.org/10.1002/mrd.20105>
- Buoso, E., Masi, M., Racchi, M., & Corsini, E. (2020). Endocrine-Disrupting Chemicals' (EDCs) Effects on Tumour Microenvironment and Cancer Progression: Emerging Contribution of RACK1. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9229. <https://doi.org/10.3390/ijms21239229>
- Chen, L., Zhao, Y., Li, L., Xie, L., Chen, X., Liu, J., Li, X., Jin, L., Li, X., & Ge, R.-S. (2018). Bisphenol A stimulates differentiation of rat stem Leydig cells in vivo and in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 474, 158-167. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.03.003>
- Clark, A. M., Garland, K. K., & Russell, L. D. (2000). Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biology of Reproduction*, 63(6), 1825-1838. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1825>
- Clark, B. J., Wells, J., King, S. R., & Stocco, D. M. (1994). The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *The Journal of Biological Chemistry*, 269(45), 28314-28322.
- Daniel-Carlier, N., Harscoët, E., Thépot, D., Auguste, A., Pailhoux, E., & Jolivet, G. (2013). Gonad Differentiation in the Rabbit: Evidence of Species-Specific Features. *PLOS ONE*, 8(4), e60451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060451>

- Davidoff, M. S., Middendorff, R., Müller, D., & Holstein, A. F. (2009). The neuroendocrine Leydig cells and their stem cell progenitors, the pericytes. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 205, 1-107.
- DeFalco, T., Takahashi, S., & Capel, B. (2011). Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Developmental Biology*, 352(1), 14-26. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.01.011>
- Díaz-Hernández, V., León del Río, A., Zamora, M., & Merchant-Larios, H. (2008). Expression Profiles of SRY and SOX9 in Rabbit Gonads: The Classical Model of Mammalian Sex Differentiation. *Sexual Development*, 2(3), 152-166. <https://doi.org/10.1159/000143433>
- Dodds, E. C., & Lawson, W. (1936). Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature*, 137(3476), Article 3476. <https://doi.org/10.1038/137996a0>
- Fénichel, P., Chevalier, N., Lahlou, N., Coquillard, P., Wagner-Mahler, K., Pugeat, M., Panaïa-Ferrari, P., & Brucker-Davis, F. (2019). Endocrine Disrupting Chemicals Interfere With Leydig Cell Hormone Pathways During Testicular Descent in Idiopathic Cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 786. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00786>
- Fernández, M. F., Arrebola, J. P., Jiménez-Díaz, I., Sáenz, J. M., Molina-Molina, J. M., Ballesteros, O., Kortenkamp, A., & Olea, N. (2016). Bisphenol A and other phenols in human placenta from children with cryptorchidism or hypospadias. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 59, 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.11.002>
- FitzGerald, R. E., & Wilks, M. F. (2014). Bisphenol A--Why an adverse outcome pathway framework needs to be applied. *Toxicology Letters*, 230(2), 368-374. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.05.002>
- Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J.-P., Goeyens, L., Lecomte, P., Maghuin-Rogister, G., Pironnet, A.-M., Pussemier, L., Scippo, M.-L., Van Loco, J., & Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal*

*Published for the British Industrial Biological Research Association, 50(10), 3725-3740. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.059>*

- Gondos, B., Morrison, K. P., & Renston, R. H. (1977). Leydig Cell Differentiation in the Prepubertal Rabbit Testis. *Biology of Reproduction, 17(5)*, 745-748. <https://doi.org/10.1095/biolreprod17.5.745>
- Greco, T. L., & Payne, A. H. (1994). Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology, 135(1)*, 262-268. <https://doi.org/10.1210/endo.135.1.8013361>
- Griswold, S. L., & Behringer, R. R. (2009). Fetal Leydig cell origin and development. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation, 3(1)*, 1-15. <https://doi.org/10.1159/000200077>
- Habert, R., Lejeune, H., & Saez, J. M. (2001). Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology, 179(1)*, 47-74. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00461-0](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00461-0)
- Hatano, O., Takakusu, A., Nomura, M., & Morohashi, K. (1996). Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms, 1(7)*, 663-671. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.00254.x>
- Hazra, R., Jimenez, M., Desai, R., Handelsman, D. J., & Allan, C. M. (2013). Sertoli cell androgen receptor expression regulates temporal fetal and adult Leydig cell differentiation, function, and population size. *Endocrinology, 154(9)*, 3410-3422. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2273>
- Heindel, J. J., Blumberg, B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M. A., Nadal, A., Palanza, P., Panzica, G., Sargis, R., Vandenberg, L. N., & Vom Saal, F. (2017). Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 68, 3-33. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.10.001>

- Higuchi, T. T., Palmer, J. S., Gray, L. E., & Veeramachaneni, D. N. R. (2003). Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *72*(2), 301-313. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg036>
- Ismanto, A., Hadibarata, T., Kristanti, R. A., Maslukah, L., Safinatunnajah, N., & Kusumastuti, W. (2022). Endocrine disrupting chemicals (EDCs) in environmental matrices: Occurrence, fate, health impact, physio-chemical and bioremediation technology. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, *302*, 119061. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119061>
- Ivell, R., Mamsen, L. S., Andersen, C. Y., & Anand-Ivell, R. (2022). Expression and Role of INSL3 in the Fetal Testis. *Frontiers in Endocrinology*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.868313>
- Jacobsen, R., Bostofte, E., Engholm, G., Hansen, J., Olsen, J. H., Skakkebaek, N. E., & Moller, H. (2000). Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: Cohort study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *321*(7264), 789-792. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7264.789>
- Jeyasuria, P., Ikeda, Y., Jamin, S. P., Zhao, L., De Rooij, D. G., Themmen, A. P. N., Behringer, R. R., & Parker, K. L. (2004). Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *18*(7), 1610-1619. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0404>
- Jørgensen, N., Müller, J., Jaubert, F., Clausen, O. P., & Skakkebaek, N. E. (1997). Heterogeneity of gonadoblastoma germ cells: Similarities with immature germ cells, spermatogonia and testicular carcinoma in situ cells. *Histopathology*, *30*(2), 177-186. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1997.d01-580.x>
- Jost, P. A. (1948). Le Controle Hormonal De La Différenciation Du Sexe. *Biological Reviews*, *23*(2), 201-236. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1948.tb00462.x>
- Kaftanovskaya, E. M., Lopez, C., Ferguson, L., Myhr, C., & Agoulnik, A. I. (2015). Genetic ablation of androgen receptor signaling in fetal Leydig cell lineage affects Leydig cell functions in adult testis. *FASEB Journal: Official Publication*

- of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(6), 2327-2337. <https://doi.org/10.1096/fj.14-263632>
- Karl, J., & Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*, 203(2), 323-333. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9068>
- Kashimada, K., Svingen, T., Feng, C.-W., Pelosi, E., Bagheri-Fam, S., Harley, V. R., Schlessinger, D., Bowles, J., & Koopman, P. (2011). Antagonistic regulation of Cyp26b1 by transcription factors SOX9/SF1 and FOXL2 during gonadal development in mice. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(10), 3561-3569. <https://doi.org/10.1096/fj.11-184333>
- Kerr, J. B., & Knell, C. M. (1988). The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development (Cambridge, England)*, 103(3), 535-544. <https://doi.org/10.1242/dev.103.3.535>
- Kitamura, K., Yanazawa, M., Sugiyama, N., Miura, H., Iizuka-Kogo, A., Kusaka, M., Omichi, K., Suzuki, R., Kato-Fukui, Y., Kamiirisa, K., Matsuo, M., Kamijo, S., Kasahara, M., Yoshioka, H., Ogata, T., Fukuda, T., Kondo, I., Kato, M., Dobyns, W. B., ... Morohashi, K. (2002). Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nature Genetics*, 32(3), 359-369. <https://doi.org/10.1038/ng1009>
- Komarowska, M. D., Hermanowicz, A., Czyzewska, U., Milewski, R., Matuszczak, E., Milyk, W., & Debek, W. (2015). Serum Bisphenol A Level in Boys with Cryptorchidism: A Step to Male Infertility? *International Journal of Endocrinology*, 2015, 973154. <https://doi.org/10.1155/2015/973154>
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351(6322), 117-121. <https://doi.org/10.1038/351117a0>
- Koubova, J., Menke, D. B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M. D., & Page, D. C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2474-2479. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510813103>
- Kumar, M., Sarma, D. K., Shubham, S., Kumawat, M., Verma, V., Prakash, A., & Tiwari, R. (2020). Environmental Endocrine-Disrupting Chemical Exposure: Role in Non-Communicable Diseases. *Frontiers in Public Health*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2020.553850>
- Kuo, C.-H., Yang, S.-N., Kuo, P.-L., & Hung, C.-H. (2012). Immunomodulatory effects of environmental endocrine disrupting chemicals. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 28(7 Suppl), S37-42. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2012.05.008>
- Lan, H.-C., Wu, K.-Y., Lin, I.-W., Yang, Z.-J., Chang, A.-A., & Hu, M.-C. (2017). Bisphenol A disrupts steroidogenesis and induces a sex hormone imbalance through c-Jun phosphorylation in Leydig cells. *Chemosphere*, 185, 237-246. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.004>
- Lee, M. M., & Donahoe, P. K. (1993). Mullerian inhibiting substance: A gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine Reviews*, 14(2), 152-164. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-2-152>
- Leers-Sucheta, S., Morohashi, K., Mason, J. I., & Melner, M. H. (1997). Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(12), 7960-7967. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.7960>
- Lording, D. W., & De Kretser, D. M. (1972). Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *Journal of Reproduction and Fertility*, 29(2), 261-269. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0290261>
- Luo, X., Ikeda, Y., & Parker, K. L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77(4), 481-490. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90211-9)
- Lv, Y., Li, L., Fang, Y., Chen, P., Wu, S., Chen, X., Ni, C., Zhu, Q., Huang, T., Lian, Q., & Ge, R.-S. (2019). In utero exposure to bisphenol A disrupts fetal testis

- development in rats. *Environmental Pollution*, 246, 217-224.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.006>
- Mamsen, L. S., Ernst, E. H., Borup, R., Larsen, A., Olesen, R. H., Ernst, E., Anderson, R. A., Kristensen, S. G., & Andersen, C. Y. (2017). Temporal expression pattern of genes during the period of sex differentiation in human embryonic gonads. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-15931-3>
- Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R., & Capel, B. (1997). Male-specific cell migration into the developing gonad. *Current Biology: CB*, 7(12), 958-968. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(06\)00415-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00415-5)
- Mendis-Handagama, S. M., & Ariyaratne, H. B. (2001). Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of Reproduction*, 65(3), 660-671. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.660>
- Merchant-Larios, H., & Moreno-Mendoza, N. (1998). Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. *Experimental Cell Research*, 244(1), 230-238. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4215>
- Merlet, J., Moreau, E., Habert, R., & Racine, C. (2007). Development of fetal testicular cells in androgen receptor deficient mice. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(18), 2258-2262. <https://doi.org/10.4161/cc.6.18.4654>
- Miller, W. L., & Bose, H. S. (2011). Early steps in steroidogenesis: Intracellular cholesterol trafficking. *Journal of Lipid Research*, 52(12), 2111-2135. <https://doi.org/10.1194/jlr.R016675>
- Minatoya, M., Sasaki, S., Araki, A., Miyashita, C., Itoh, S., Yamamoto, J., Matsumura, T., Mitsui, T., Moriya, K., Cho, K., Morioka, K., Minakami, H., Shinohara, N., & Kishi, R. (2017). Cord Blood Bisphenol A Levels and Reproductive and Thyroid Hormone Levels of Neonates: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 28 Suppl 1, S3-S9. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000716>
- Mishina, Y., Rey, R., Finegold, M. J., Matzuk, M. M., Josso, N., Cate, R. L., & Behringer, R. R. (1996). Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation.

- Genes & Development*, 10(20), 2577-2587.  
<https://doi.org/10.1101/gad.10.20.2577>
- Nanjappa, M. K., Simon, L., & Akingbemi, B. T. (2012). The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cells. *Biology of Reproduction*, 86(5), 135, 1-12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095349>
- NIEMI, M., & KORMANO, M. (1964). Cell Renewal in the Interstitial Tissue of Postnatal Prepuberal Rat Testis. *Endocrinology*, 74(6), 996-998. <https://doi.org/10.1210/endo-74-6-996>
- N'Tumba-Byn, T., Moison, D., Lacroix, M., Lecureuil, C., Lesage, L., Prud'homme, S. M., Pozzi-Gaudin, S., Frydman, R., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., & Habert, R. (2012). Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PloS One*, 7(12), e51579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051579>
- Nutrition, C. for F. S. and A. (2023). Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact Application. *FDA*. <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/bisphenol-bpa-use-food-contact-application>
- O'Shaughnessy, P. J., Baker, P. J., Heikkilä, M., Vainio, S., & McMahon, A. P. (2000). Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis—Androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal leydig cells. *Endocrinology*, 141(7), 2631-2637. <https://doi.org/10.1210/endo.141.7.7545>
- Payne, A. H., & Hales, D. B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*, 25(6), 947-970. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>
- Payne, A. H., & Youngblood, G. L. (1995). Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biology of Reproduction*, 52(2), 217-225. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.2.217>
- Peretz, J., & Flaws, J. A. (2013). Bisphenol A down-regulates rate-limiting Cyp11a1 to acutely inhibit steroidogenesis in cultured mouse antral follicles. *Toxicology*

- and Applied Pharmacology*, 271(2), 249-256.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.04.028>
- Racine, C., Rey, R., Forest, M. G., Louis, F., Ferré, A., Huhtaniemi, I., Josso, N., & di Clemente, N. (1998). Receptors for anti-müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), 594-599. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.594>
- Roosen-Runge, E. C., & Anderson, D. (1959). The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. *Acta Anatomica*, 37, 125-137. <https://doi.org/10.1159/000141460>
- Rouiller-Fabre, V., Guerquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Muczynski, V., Moison, D., Tourpin, S., Messiaen, S., Habert, R., & Livera, G. (2015). Nuclear receptors and endocrine disruptors in fetal and neonatal testes: A gapped landscape. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 58. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00058>
- Rubin, B. S. (2011). Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1-2), 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.05.002>
- Sadovsky, Y., Crawford, P. A., Woodson, K. G., Polish, J. A., Clements, M. A., Tourtellotte, L. M., Simburger, K., & Milbrandt, J. (1995). Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), 10939-10943. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.10939>
- Schmahl, J., Eicher, E. M., Washburn, L. L., & Capel, B. (2000). Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development (Cambridge, England)*, 127(1), 65-73. <https://doi.org/10.1242/dev.127.1.65>
- Sekido, R., & Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*, 453(7197), 930-934. <https://doi.org/10.1038/nature06944>

- Shapiro, E., Huang, H., Masch, R. J., McFadden, D. E., Wu, X.-R., & Ostrer, H. (2005). Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in human fetal testis and epididymis. *Journal of Urology*, *174*(4 Part 2), 1695-1698. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000179540.28209.de>
- Shima, Y., Matsuzaki, S., Miyabayashi, K., Otake, H., Baba, T., Kato, S., Huhtaniemi, I., & Morohashi, K. (2015). Fetal Leydig Cells Persist as an Androgen-Independent Subpopulation in the Postnatal Testis. *Molecular Endocrinology*, *29*(11), 1581-1593. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1200>
- Shima, Y., Miyabayashi, K., Haraguchi, S., Arakawa, T., Otake, H., Baba, T., Matsuzaki, S., Shishido, Y., Akiyama, H., Tachibana, T., Tsutsui, K., & Morohashi, K. (2013). Contribution of Leydig and Sertoli Cells to Testosterone Production in Mouse Fetal Testes. *Molecular Endocrinology*, *27*(1), 63-73. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1256>
- Shoaff, J. R., Coull, B., Weuve, J., Bellinger, D. C., Calafat, A. M., Schantz, S. L., & Korrick, S. A. (2020). Association of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals During Adolescence With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder-Related Behaviors. *JAMA Network Open*, *3*(8), e2015041. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.15041>
- Stocco, D. M., & Clark, B. J. (1996). Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochemical Pharmacology*, *51*(3), 197-205. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)02093-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)02093-4)
- Svingen, T., & Koopman, P. (2013). Building the mammalian testis: Origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes & Development*, *27*(22), 2409-2426. <https://doi.org/10.1101/gad.228080.113>
- Tapanainen, J., Kellokumpu-Lehtinen, P., Pelliniemi, L., & Huhtaniemi, I. (1981). Age-related changes in endogenous steroids of human fetal testis during early and midpregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *52*(1), 98-102. <https://doi.org/10.1210/jcem-52-1-98>
- Tapanainen, J., Kuopio, T., Pelliniemi, L. J., & Huhtaniemi, I. (1984). Rat Testicular Endogenous Steroids and Number of Leydig Cells Between the Fetal Period

- and Sexual Maturity. *Biology of Reproduction*, 31(5), 1027-1035. <https://doi.org/10.1095/biolreprod31.5.1027>
- Teng, C., Goodwin, B., Shockley, K., Xia, M., Huang, R., Norris, J., Merrick, B. A., Jetten, A. M., Austin, C. P., & Tice, R. R. (2013). Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*, 203(3), 556-564. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.03.013>
- Tilman, C., & Capel, B. (1999). Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development (Cambridge, England)*, 126(13), 2883-2890. <https://doi.org/10.1242/dev.126.13.2883>
- Val, P., Lefrançois-Martinez, A.-M., Veyssi re, G., & Martinez, A. (2003). SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nuclear Receptor*, 1, 8. <https://doi.org/10.1186/1478-1336-1-8>
- Veeramachaneni, D. N. R. (2006). Germ cell atypia in undescended testes hinges on the aetiology of cryptorchidism but not the abdominal location per se. *International Journal of Andrology*, 29(1), 235-240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00565.x>
- Veeramachaneni, D. N., & Vandewoude, S. (1999). Interstitial cell tumour and germ cell tumour with carcinoma in situ in rabbit testes. *International Journal of Andrology*, 22(2), 97-101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1999.00154.x>
- Voutilainen, R. (1992). Differentiation of the fetal gonad. *Hormone Research*, 38 Suppl 2, 66-71. <https://doi.org/10.1159/000182601>
- Wang, H., Ding, Z., Shi, Q.-M., Ge, X., Wang, H.-X., Li, M.-X., Chen, G., Wang, Q., Ju, Q., Zhang, J.-P., Zhang, M.-R., & Xu, L.-C. (2017). Anti-androgenic mechanisms of Bisphenol A involve androgen receptor signaling pathway. *Toxicology*, 387, 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.007>
- Wilson, J. D., & Siiteri, P. K. (1973). Developmental pattern of testosterone synthesis in the fetal gonad of the rabbit. *Endocrinology*, 92(4), 1182-1191. <https://doi.org/10.1210/endo-92-4-1182>

- Wolstenholme, J. T., Rissman, E. F., & Connelly, J. J. (2011). The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Hormones and Behavior*, *59*(3), 296-305. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.10.001>
- Xi, W., Lee, C. K. F., Yeung, W. S. B., Giesy, J. P., Wong, M. H., Zhang, X., Hecker, M., & Wong, C. K. C. (2011). Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *31*(4), 409-417. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.12.002>
- Yao, H. H.-C., & Barsoum, I. (2007). Fetal Leydig Cells. En A. H. Payne & M. P. Hardy (Eds.), *The Leydig Cell in Health and Disease* (pp. 47-54). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-453-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-453-7_3)
- Yao, H. H.-C., & Capel, B. (2002). Disruption of Testis Cords by Cyclopamine or Forskolin Reveals Independent Cellular Pathways in Testis Organogenesis. *Developmental biology*, *246*(2), 356-365. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0663>
- Yao, H. H.-C., Whoriskey, W., & Capel, B. (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes & Development*, *16*(11), 1433-1440. <https://doi.org/10.1101/gad.981202>
- Ye, L., Zhao, B., Hu, G., Chu, Y., & Ge, R.-S. (2011). Inhibition of human and rat testicular steroidogenic enzyme activities by bisphenol A. *Toxicology Letters*, *207*(2), 137-142. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.09.001>
- Yeh, S., Tsai, M.-Y., Xu, Q., Mu, X.-M., Lardy, H., Huang, K.-E., Lin, H., Yeh, S.-D., Altuwajiri, S., Zhou, X., Xing, L., Boyce, B. F., Hung, M.-C., Zhang, S., Gan, L., & Chang, C. (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(21), 13498-13503. <https://doi.org/10.1073/pnas.212474399>
- Zlatnik, M. G. (2016). Endocrine-Disrupting Chemicals & Reproductive Health. *Journal of midwifery & women's health*, *61*(4), 442-455. <https://doi.org/10.1111/jmwh.12500>

## Bisphenol A alters differentiation of Leydig cells in the rabbit fetal testis

ALEXIS P. ORTEGA-GARCÍA<sup>1</sup>, VERÓNICA DÍAZ-HERNÁNDEZ<sup>2</sup>, PEDRO COLLAZO-SALDAÑA<sup>1</sup>  
and HORACIO MERCHANT-LARIOS<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas and <sup>2</sup>Department of Embryology, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

**ABSTRACT** The endocrine disruptor Bisphenol A (BPA) crosses the placental barrier and reaches the fetal organs, including the gonads. In the testis, fetal Leydig cells (FLC) produce testosterone required for the male phenotype and homeostatic cell-cell signaling in the developing testis. Although it is known that BPA affects cell proliferation and differentiation in FLC, results concerning the mechanism involved are contradictory, mainly due to differences among species. Fast developing fetal gonads of rodents lack cortex and medulla, whereas species with more extended gestation periods form these two tissue compartments. The rabbit provides a good subject for studying the disruptive effect of BPA in fetal Leydig and possible postnatal endocrine consequences in adult Leydig cells. Here, we investigated the impact of BPA administered to pregnant rabbits on the FLC population of the developing testes. Using qRT-PCR, we assessed the levels of *SF1*, *CYP11A1*, *3 $\beta$ -HSD*, and androgen receptor genes, and levels of fetal serum testosterone were measured by ELISA. These levels correlated with both the mitotic activity and the ultrastructural differentiation of the FLC by confocal and electron microscopy, respectively. Results indicate that BPA alters the expression levels of essential genes involved in androgen paracrine signaling, modifies the proliferation and differentiation of the FLCs, and alters the levels of serum testosterone after birth. Thus, BPA may change the postnatal levels of serum testosterone due to the impaired FLC population formed by the proliferating stem and non-proliferating cytodifferentiated FLC.

**KEY WORDS:** *Bisphenol A*, *Leydig cell*, *testis*, *rabbit*, *steroidogenesis*

### Introduction

Due to prevalent use, BPA (BPA, 4,4'-dihydroxy-2,2-diphenyl propane) has become a ubiquitous environmental contaminant to which all organisms are extremely exposed. High temperatures induce the release of BPA monomers that contaminate human food and beverages and pollute the environment worldwide (Vom Saal *et al.*, 2007). BPA enters the body through the respiratory tract, the skin, and orally, where it accumulates in various tissues (Geens *et al.*, 2012). BPA crosses the placental barrier in both rodents and humans, meaning that maternal exposure to BPA may affect the developing fetus (Balakrishnan *et al.*, 2010). In humans, BPA is present in urine, blood, amniotic fluid, and umbilical cord blood (Minatoya *et al.*, 2017).

Male reproductive disorders, collectively known as the “Tes-

ticular Dysgenesis Syndrome” (TDS), result from alterations in testis development during fetal life (rev Skakkebaek *et al.*, 2016). BPA modifies the metabolism of steroid hormones, their receptor proteins, and the gene transduction pathways, disturbing fetal development (N'Tumba-Byn *et al.*, 2012). Thus, BPA is a potential

*Abbreviations used in this paper:* 17 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase; 3 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase; AR, androgen receptor; BPA, bisphenol A; CYP11A1, Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A member 1; *dpc*, days post-coitus; *dpp*, days post-partum; en, endothelial cell; FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations; FLC, fetal Leydig cell; GW, gestational weeks; KO, knockout mice; Ld, lipid droplets; LOAEL, lowest-observed-adverse-effect level; RT, rete testis; SC, seminiferous cords; SF1, Steroidogenic factor 1 nuclear receptor; StAR, Steroidogenic acute regulatory protein; TDS, testicular dysgenesis syndrome; WHO, World Health Organization.

\*Address correspondence to: Horacio Merchant-Larios. Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, CP. 04510, Ciudad de México. Tel: (+55) 56223833. E-mail: merchant@unam.mx

 <https://orcid.org/0000-0001-5330-6634>

Supplementary Material (1 figure) for this paper is available at: <https://doi.org/10.1387/ijdb.200185hm>

Submitted: 3 May, 2020; Accepted: 10 July, 2020; Published online: 26 August, 2020.

candidate for engendering postnatal TDS. Fetal exposure to BPA can affect the establishment of the FLC population by disrupting the steroidogenic process in developing testis. Thus, even short interruption to the steroidogenic process in the fetal testis can lead to disturbing consequences in postnatal life (Shima *et al.*, 2015).

SF1 regulates the expression of the genes that code steroidogenic enzymes such as CYP11A1 (P450 side-chain cleavage), CYP17A1 (cytochrome P450C17), 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase), 17 $\beta$ -HSD (17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase) and StAR (steroidogenic acute regulatory protein) (Shima *et al.*, 2015). Mild functional changes in SF1 are associated with severe reproductive phenotypes. SF1 deficient mice show defects in terms of gonad and adrenal gland development, indicating its essential role in the establishment of fetal steroidogenic tissue (Sadovsky *et al.*, 1995).

Studies on the role of the androgen receptor (AR) during fetal testis development indicate that the spatiotemporal cellular specificity of AR expression differs between species (Rouiller-Fabre *et al.*, 2015).

In mice, AR is expressed in germ cells and peritubular cells (Merlet *et al.*, 2007). Although in AR knockout (KO) mice, FLC develops normally, maturation of adult Leydig cells (ALC) is impaired (Kaftanovskaya *et al.*, 2015). Organ culture studies reported that BPA reduces the endocrine activity of the fetal testis in humans, rats, and mice (N'Tumba-Byn *et al.*, 2012) and *in vitro* studies in Leydig TM3 cells indicated that BPA inhibits the action of androgens via the AR (Teng *et al.*, 2013).

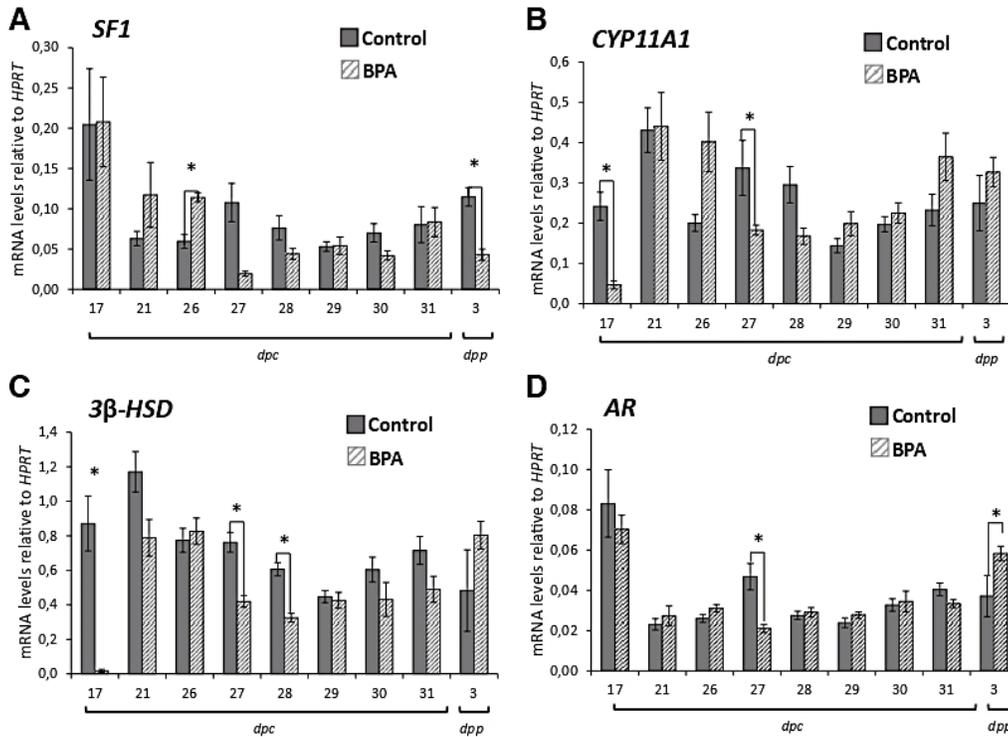
Fetal Leydig cells develop during fetal life, their main function is to produce testosterone, and they are responsible for the masculinization of the male urogenital system. The FLC is differentiated from the interstitial tissue (rev Habert *et al.*, 2001). In mice, the first FLC population appears at 12.5 dpc (days post-coitus). It starts producing testosterone (Merchant-Larios and Moreno-Mendoza, 1998), in rats at 15 dpc, and in humans at eight weeks (Voutilainen, 1992). Their number increases considerably in early fetal testis, and subsequently, FLCs gradually enter mitotic arrest, and the population stabilizes, to almost disappear during the peri-

TABLE 1

EFFECTS OF *IN UTERO* EXPOSURE TO BPA ON FETAL LEYDIG CELLS AND STEROIDOGENIC FETAL TESTIS FUNCTION

Species	Doses of BPA and Experimental design	Major effects induced by BPA	References
Rat (IGS strain)	4, 40, and 400 mg/kg administered by gavage at 6 dpp through lactation day 20. Testis analyzed at 9 and 36 weeks old.	Increased testosterone levels in serum.	Watanabe <i>et al.</i> , 2003
Rat (Long-Evans strain)	2.4 $\mu$ g/kg/day of BPA administered 12 dpc-21 dpp. Testis analyzed at 90 dpp	Decreased testosterone levels in serum.	Akingbemi <i>et al.</i> , 2004
Rat (Sprague-Dawley strain)	0.002–400 mg BPA/kg/day administered at 11 -20 dpc. Testis analyzed at 20 dpc.	-BPA induced downregulation of StAR, CYP17A1, and CYP11A1. -The expression of 3 $\beta$ -HSD was not modified.	Naciff <i>et al.</i> , 2005
Rat (Sprague-Dawley strain)	0.2, 2, 20, and 200 $\mu$ g/mL BPA daily in drinking water at 1-22 dpc. Testis analyzed at 22 or 23 dpp (2 hours after birth).	200 $\mu$ g/mL of BPA exposure decreased serum T levels only in newborn rats 2 hours after birth.	Tanaka <i>et al.</i> , 2006
Human fetal testis of GW 6-11.	10 <sup>-2</sup> to 10 <sup>5</sup> M of BPA	Only in human fetal testis: -A dose of 10 <sup>6</sup> M reduced testosterone secretion regardless of the age of the fetus.	N'Tumba-Byn <i>et al.</i> , 2012
Rat (Long-Evans strain) and Leydig cell culture previously exposed to BPA	2.5 or 25 $\mu$ g/kg/day BPA administered at 12-21 dpc. Testis analyzed at 21 dpc and 35 and 90 days of age.	-Increased Leydig cell numbers at 90 days of age -Testosterone production of the Leydig cell decreased. However, the levels of serum T were similar to controls. -Decreased levels of LH receptor and 17 $\beta$ -HSD.	Nanjappa <i>et al.</i> , 2012
Rat (Sprague-Dawley strain)	0.02, 0.5, and 400 mg/kg/day BPA 11 dpc, subcutaneously. Testis analyzed at 16, 18, and 20 dpc.	400mg/kg/day of BPA decreased the amount of StAR protein in Leydig cells and gene expression at 20 dpc.	Hortsman <i>et al.</i> , 2012
Rat (Sprague-Dawley strain) (Wistar strain)	10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> and 10 <sup>8</sup> M of BPA Organ culture of fetal testis at 14.5 dpc for 72 h.	- 10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> M for 72h Inhibits InsI3 secretion. -10 <sup>6</sup> M and 10 <sup>8</sup> M for 72h, reduced T secretion.	Ben Maamar <i>et al.</i> , 2015
Human testis of 8 – 12 GW	Organ culture incubated 72 h with 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> , and 10 <sup>8</sup> M of BPA.	inhibited testosterone production	Ben Maamar <i>et al.</i> , 2015
Mouse (Kunming strain)	50, 500, or 2500 mg/kg/day. BPA from day 1-21 dpc. Testis analyzed at 8 weeks of age.	-Serum T reduced and was negatively correlated with the dosages of BPA. -mRNA levels of StAR decreased -Doses of 50 and 2500 mg/kg/day: the expression of CYP11A1 decreased -500 mg/kg/day: the expression of Cyp11a1 increased.	Ma <i>et al.</i> , 2017
Human fetal testis of GW 5 – 12 and GW 14-18	0.01 to 10 $\mu$ M of BPA in Fetal testes in organ culture 3 days, and 6 weeks xenografts in nude mice treated with 10 $\mu$ M of BPA in drinking water.	-Testis GW 5 – 12 and GW 14-18 -No significant differences between control and BPA in serum testosterone and expression of StAR, Cyp11A1, CYP17A1, and CYP19 genes.	Eladak <i>et al.</i> , 2018
Rat (Sprague-Dawley)	4, 40 or 400 mg/kg/day <i>in utero</i> exposure on 12 to 21 dpc. Testis analyzed at 21 dpc	-Decreased serum testosterone levels -Disrupts number, distribution, and proliferation of fetal Leydig cell. -Down-regulated mRNA expression of InsI3, 17 $\beta$ -HSD, CYP11A1, and CYP17A1. -Down-regulated protein expression of LH receptor, CYP17A1, and 17 $\beta$ -HSD.	Lv <i>et al.</i> , 2019
Mouse (Kunming)	2.5, 5, 10, 20, and 40 mg/kg/day. BPA at 0.5–17.5 dpc. Testis analyzed at 21 and 56 dpp.	-Doses of 20mg/kg BPA significantly reduced serum testosterone levels	Wei <i>et al.</i> , 2019
Rabbit (New Zealand)	50mg/kg/day. BPA administered orally at 15 – 31 dpc. Testes analyzed at 17, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 31 dpc and 1-3 dpp (proliferative and differentiated) fetal Leydig cells)	BPA treated testes decreased levels of CYP11A1, 3 $\beta$ -HSD, and AR at 27 dpc and reduced the number of proliferating Leydig cells at 21-28 dpc. Increased level of serum T at 3 dpp. Leydig cell clusters are formed by both differentiated cells with abundant SER and less differentiated cells with predominant RER in both control and BPA-treated testes.	Current results, 2020

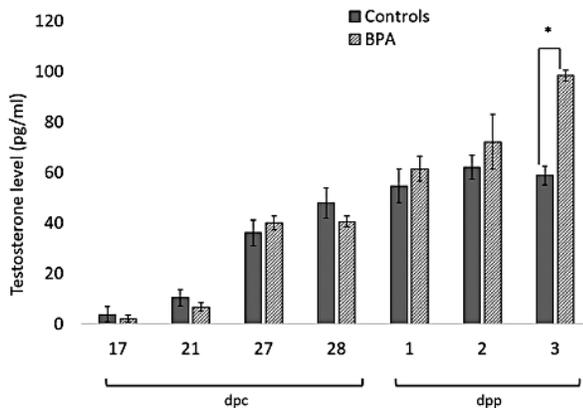
M: molar, GW: gestational weeks, PND: postnatal day, dpc: days post-coitus, dpp: days post-partum, AR: androgen receptor, SER: smooth endoplasmic reticulum, RER: rough endoplasmic reticulum, T: testosterone.



**Fig. 1. Effects of bisphenol A (BPA) on gene expression levels on (A) SF1, (B) CYP11A1, (C) 3β-HSD and (D) AR.** Each bar represents the mean of relative expression of each gene to HPRT ~ SEM. Asterisks indicate a significant difference to the control. \**P* < 0.05.

natal period (Barsoum *et al.*, 2013). However, there are important variations according to different species, in terms of the effects of *in utero* exposure to BPA on FLC and steroidogenic fetal testis function (Table 1).

The effect of BPA on the proliferative activity of Leydig cells remains controversial. Whereas during the prepubertal period, Leydig cells in rats increased their proliferation *in vivo* and *in vitro* (Chen *et al.*, 2018), other studies reported that BPA inhibits the proliferation of Leydig cells *in vitro* (Nanjappa *et al.*, 2012). Moreover, the effect of BPA on the FLC in mice, rats, and humans are qualitatively similar; however, the lowest no observed adverse



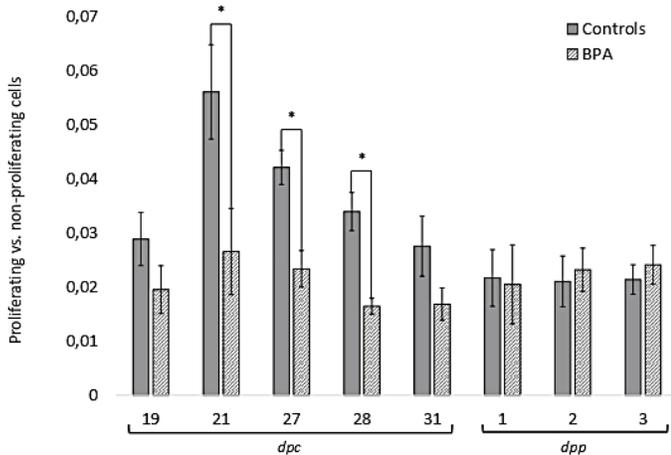
**Fig. 2. Effects of bisphenol A (BPA) on testosterone concentration, measured in serum.** The significantly higher level was evident in pups born from BPA treated mothers at three dpp. The asterisk indicates significant differences compared to the respective control. Bars represent the mean ~ SEM, \**P* < 0.05.

effect level (NOAEL) is more than 100-fold lower in humans than rodents. Furthermore, specific signaling pathways for BPA differ between rodents and humans (N'Tumba-Byn *et al.*, 2012).

Thus, those concerned about the prevalent use of rodents as models to assess the risk of endocrine disruptors on human fetal testis (rev in Habert *et al.*, 2014), have recommended using alternative animal models in which the fetal testis shows a developmental pattern closer to humans (Rouiller-Fabre *et al.*, 2015). Compared to the mouse, the rabbit has advantages for evaluating the effects of toxic agents on early testis development (rev Madeja *et al.*, 2019). For example, the gonadal pattern of development in the rabbit resembles that of humans; both form a bipotential gonad with two tissue compartments: the medulla and the cortex, in which the somatic-germ cell interactions occur according to the compartment (Díaz-Hernández *et al.*, 2019).

Importantly, in contrast to the almost synchronized germ cells in mice (Bullejos and Koopman, 2004), the proliferating germ cell population coexists for a long time with germ cells entering meiosis or mitotic arrest in ovary and testis, respectively (Frydman *et al.*, 2017). Thus, compared to rodents, the effect of BPA can differ in species with a longer gestation period. Like humans, the FLC population contains proliferating stem cells and non-proliferating differentiated cells. Thus, stem and differentiated Leydig cells are simultaneously exposed to BPA, when critical paracrine somatic-germ cell interactions occur (Díaz-Hernandez *et al.*, 2008; Daniel-Carlier *et al.*, 2013).

Here, we investigated the effect of BPA on the fetal steroidogenic process during proliferation and differentiation of the FLC population, using the rabbit as an animal model. For this purpose, we measured the expression profiles of the SF1, CYP11A1, 3β-HSD and AR genes, and serum testosterone levels. Moreover, the proliferation pattern of the FLC was correlated. Our results indicate that BPA



**Fig. 3.** The ratio of proliferating Leydig cells in the control and bisphenol A (BPA)-treated testis. There are apparent significant differences in the number of proliferative Leydig cells in BPA-treated testes compared to controls at 21–28 dpc, ( $*p < 0.05$ ). Bars represent the mean  $\pm$  SEM.

alters the expression patterns of essential genes involved in steroid paracrine signaling, modifies the proliferation and differentiation of the FLC, and alters the levels of testosterone after birth.

## Results

### Levels of SF1, CYP11A1, and $3\beta$ -HSD were lower in BPA treated testis at 27 and 28 dpc

In order to discern how the BPA may perturb the regulatory pathways of steroidogenesis during the establishment of the fetal Leydig population, the expression levels of three factors were analyzed: a nuclear receptor *SF1*, and the steroidogenic enzymes *CYP11A1*, and *3 $\beta$ -HSD*. High levels of *SF1* expression were detected at 17 dpc in both control and BPA groups (Fig. 1A). Subsequently, although the levels decreased in both groups, the BPA-treated group showed significantly higher levels than controls at 26 dpc. Then, the expression profile of the BPA group diminished and remained similar to, or lower than the control group, up to 31 dpc. However, at three dpp, the relative levels of *SF1* in the BPA group decreased significantly below the controls (Fig. 1A).

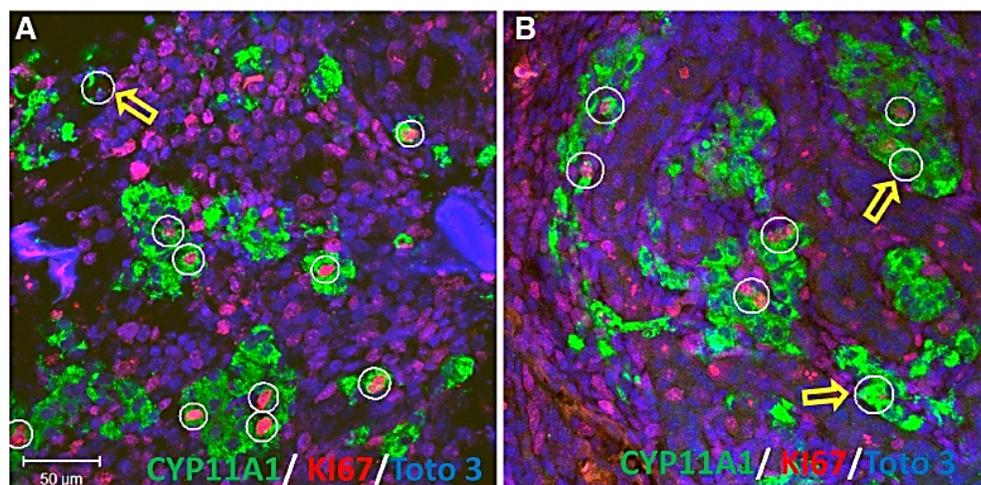
Likewise, even though *CYP11A1* was detected in the testes of both groups at 17 dpc, levels in the BPA group appeared significantly lower (Fig. 1B). In contrast, four days later, at 21 dpc, the levels of *CYP11A1* in the BPA group increased to match those of the control group. The levels of the BPA group then decreased again, down to 27 dpc, when levels registered as significantly lower than the controls. The difference between groups of *CYP11A1* levels was not significant, up to 3 dpp (Fig. 1B). Like *CYP11A1*, the transcript profile of *3 $\beta$ -HSD* was significantly lower in testes treated with BPA than among controls. Overall, the BPA expression profile was below the profile of the controls, with significant differences at 17, 27, and 28 dpc. However, levels of *3 $\beta$ -HSD* increased at three dpp (Fig. 1C). Interestingly at 17 dpc, *AR* levels were similar in both BPA treated and control testes. After that, the levels decreased significantly at 27 dpc in the BPA group, remaining similar in both groups up to day 31. In contrast, after birth, *AR* expression increased significantly in puppy testes of BPA treated mothers, compared to their controls (Fig. 1D).

### Fetal testosterone level is higher in BPA-treated puppies at 3 dpp

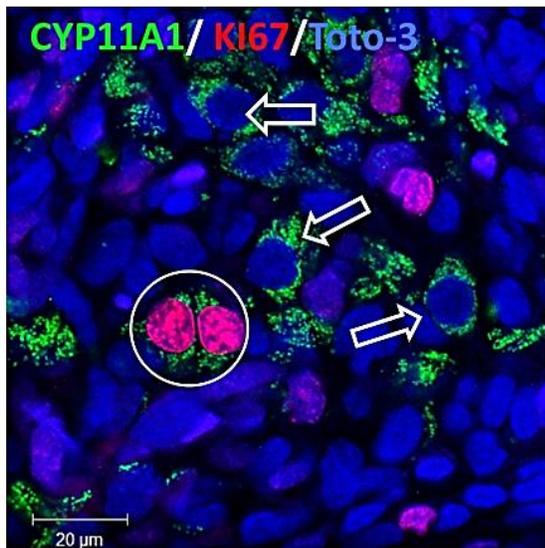
To define whether the steroidogenic disrupting effect of BPA affects the testosterone secreted by the developing testis, the levels of serum testosterone in fetuses and newborns were determined. Fig. 2 presents testosterone levels measured in serum from samples of the fetus at 17, 21, 27, and 28 dpc and newborns at 1–3 dpp. Even though during the fetal period, testosterone levels were similar in the testes of both BPA and control groups, a significantly higher level was evident in puppies born from BPA treated mothers, at three dpp (Fig. 2).

### The number of proliferating fetal Leydig cells is lower in BPA-treated testes

To study the effect of BPA on steroidogenic tissue in developing rabbit testis, we correlated the expression of *CYP11A1* and *Ki67*. As the antibody against *CYP11A1* marks the first enzyme in the steroidogenic process, this probably identifies younger proliferating and non-proliferating mature Leydig cells, respectively. As differentiated Leydig cells cease proliferating and gradually enter quiescence, an analysis of proliferating and non-proliferating Leydig cells reveals the effect of BPA on the normal time course during the establishment of the Leydig cell population *in situ*. Two populations



**Fig. 4.** Representative immunostained frozen sections of testis of control (A) and bisphenol A (BPA) treated (B) embryo at 21 dpc. Proliferating Leydig cells, positive for *Ki67*, are enclosed in white circles. Yellow arrows point to proliferating Leydig cells in which the red nucleus is in another optical layer of the confocal stack.



**Fig. 5.** High-resolution immunofluorescent colocalization of CYP11A1 (green) and KI67 (red) to identify proliferating (circle) and non-proliferating (arrows) fetal Leydig cells of a control testis at 28 dpc. Leydig cells express CYP11A1 in the mitochondria and KI67 in the nucleus.

of Leydig cells were counted: (1) proliferating Leydig cells, positive to KI67 (CYP11A1 + / KI67 +) and (2) non-proliferating Leydig cells, negative to KI67 (CYP11A1 + / KI67 -). The ratio of proliferating Leydig cells in the control population appeared similar in BPA treated and control testis at 19 dpc. Subsequently, however, the number of

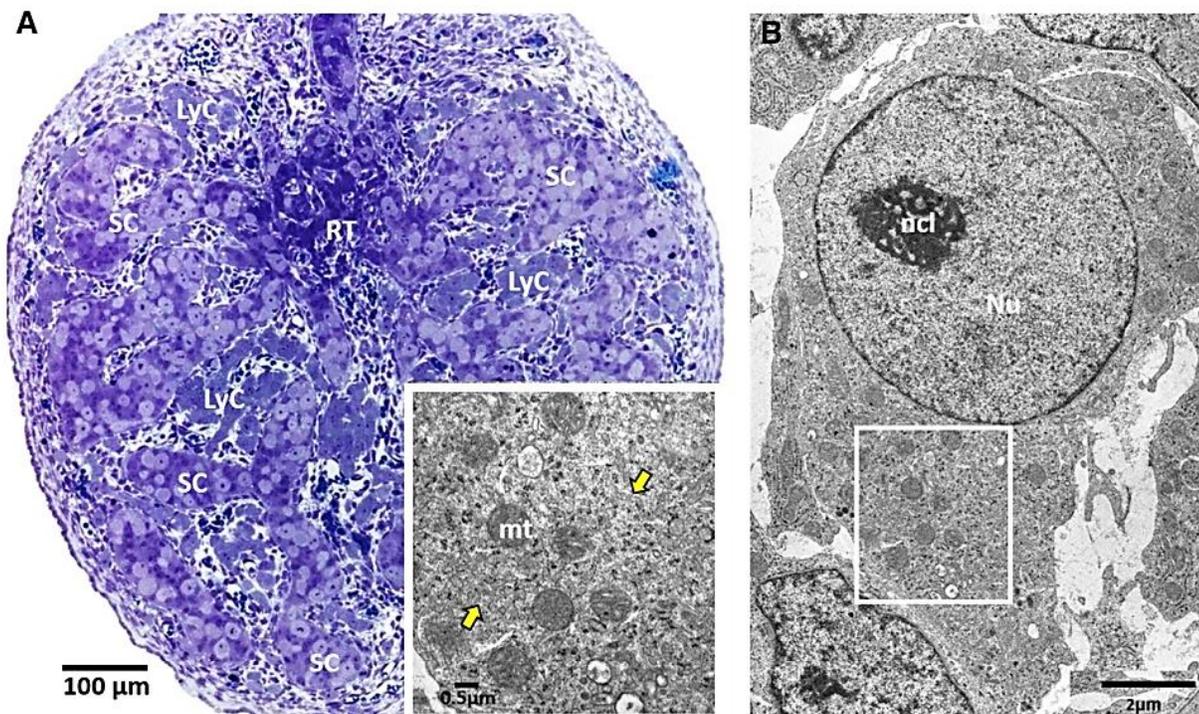
proliferative Leydig cells became significantly lower in BPA treated testes than in controls at 21-28. Once again, differences were not significant at day 31 and among newborn puppies (Fig. 3).

As the Leydig cell count presented in Fig. 3 was made using 30  $\mu\text{m}$  thick frozen sections (Suppl. Fig. S1), stacks of 2.0  $\mu\text{m}$  thick confocal images were made to increase the resolution of proliferating and non-proliferating Leydig cells. Fig. 4 shows representative frozen sections of control and BPA treated embryo at 21 dpc.

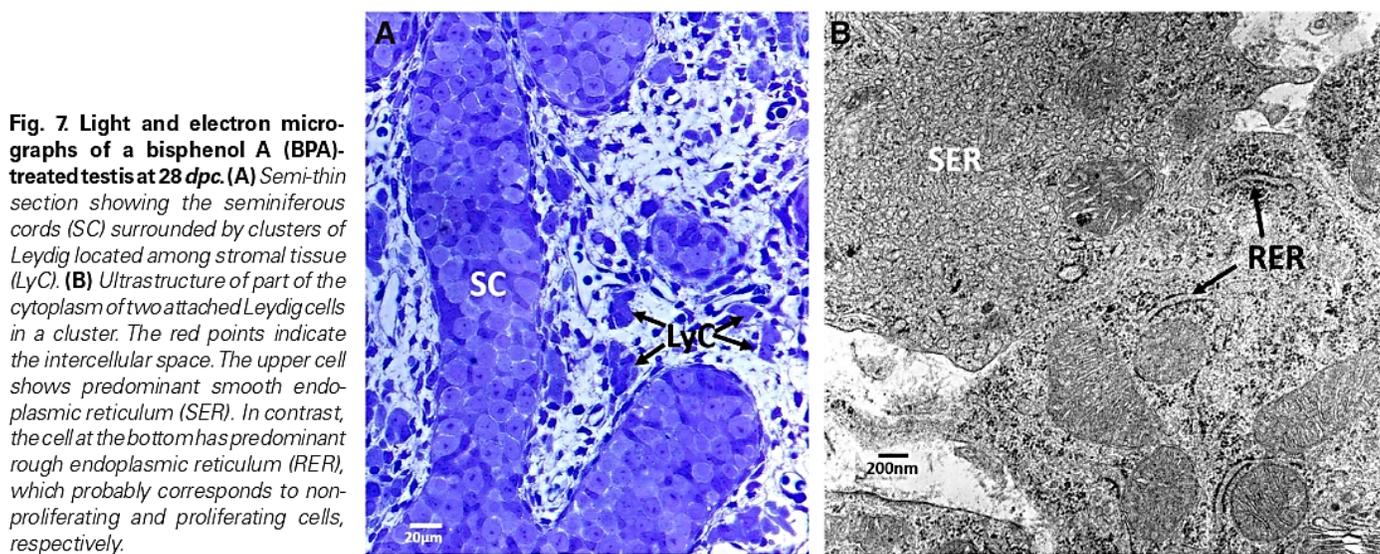
Fig. 5 shows a representative immunofluorescent colocalization in fetal Leydig cells of a control testis at 28 dpc. Leydig cells identified with CYP11A1 (green) were expressed in mitochondria. KI67 (red) was localized in the nucleus of all types of proliferating cells in the testis. The confocal merge image ensured precise identification of proliferating and non-proliferating Leydig cells.

**Fetal Leydig cell clusters contain differentiated cells with abundant smooth endoplasmic reticulum and less differentiating cells with the predominant rough endoplasmic reticulum**

We undertook an ultrastructural study in order to assess cytodifferentiation in proliferating and non-proliferating Leydig cells, during BPA treatment. At 21 dpc, rabbit testis shows the seminiferous cords surrounded by the stromal tissue, among which clusters of Leydig cells are undergoing differentiation (Fig. 6 A,B). Besides being larger than other stromal cells, the differentiated Leydig cells develop two conspicuous cell organelles: the mitochondria and the smooth endoplasmic reticulum. In contrast to the mitochondria of adult Leydig cells with tubular cristae, the fetal and newborn Leydig cells of the rabbit mostly maintain lamellar cristae in their mitochondria (Figs. 7B, 8C). However, the smooth endoplasmic



**Fig. 6.** Representative light and electron microscope images of control rabbit fetal testes at 21 dpc. (A) Semi-thin section stained with toluidine blue shows the seminiferous cords (SC) connected to the rete testis (RT), surrounded by clusters of Leydig cells (LyC) among the stromal tissue. (B) This electron micrograph shows a Leydig cell beginning to form smooth endoplasmic cisterns (yellow arrows). The inset in (A) shows a high magnification of the white square area in B. mt, roundish mitochondria; Nu, nucleus; Ncl, nucleolus.



**Fig. 7.** Light and electron micrographs of a bisphenol A (BPA)-treated testis at 28 dpc. (A) Semi-thin section showing the seminiferous cords (SC) surrounded by clusters of Leydig located among stromal tissue (LyC). (B) Ultrastructure of part of the cytoplasm of two attached Leydig cells in a cluster. The red points indicate the intercellular space. The upper cell shows predominant smooth endoplasmic reticulum (SER). In contrast, the cell at the bottom has predominant rough endoplasmic reticulum (RER), which probably corresponds to non-proliferating and proliferating cells, respectively.

reticulum gradually displaces other organelles and occupies most of the cytoplasmic space (Figs. 7B, 8C). As fetal testes grow considerably with age, mainly due to the increased space occupied by the stromal tissue (blood vessels, fibroblast, and extracellular matrix), the clusters of Leydig cells at 28 dpc become more dispersed (Fig. 7A). Interestingly, the clusters included Leydig cells with different degrees of the smooth and rough endoplasmic reticulum. Cells with predominantly rough endoplasmic reticulum probably correspond to Leydig cells that are still proliferating (Fig. 7B).

## Discussion

Studies of the toxicity of BPA on development and reproduction among rodents led the World Health Organization (WHO) and the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) to propose that 50 mg/kg per day represent the lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL) in mammals. Accordingly, we treated pregnant rabbit females daily with 50 mg/kg BPA. The treatment started at 15 dpc, corresponding to the establishment of embryonic genital ridges, followed by the onset of specification of Sertoli and Leydig cells in the rabbit (Díaz-Hernández et al., 2008). To assess the effect of BPA on the differentiation of the FLC population, we analyzed the expression profiles of three gene encoding factors involved in testosterone production: *SF1*, *CYP11A1*, *3β-HSD* and the *AR*, during the fetal period and at day three post-partum (3 dpp).

Reports employing rodent models found that *SF1* plays a central role in the specification of Leydig cells, regulating the genes that encode steroidogenic enzymes (Hatano et al., 1994; Leers-Sucheta et al., 1997). Changes in *SF1* levels alter the differentiation and steroidogenic capacity of Leydig cells during the fetal stage, which in turn compromises the population of adult Leydig cells (Barsoum et al., 2013). The expression of *SF1* in Leydig cells lasts throughout fetal development in rodents, whereas in humans, *SF1* continues to be expressed at constant levels during the first trimester of pregnancy (Mamsen et al., 2017).

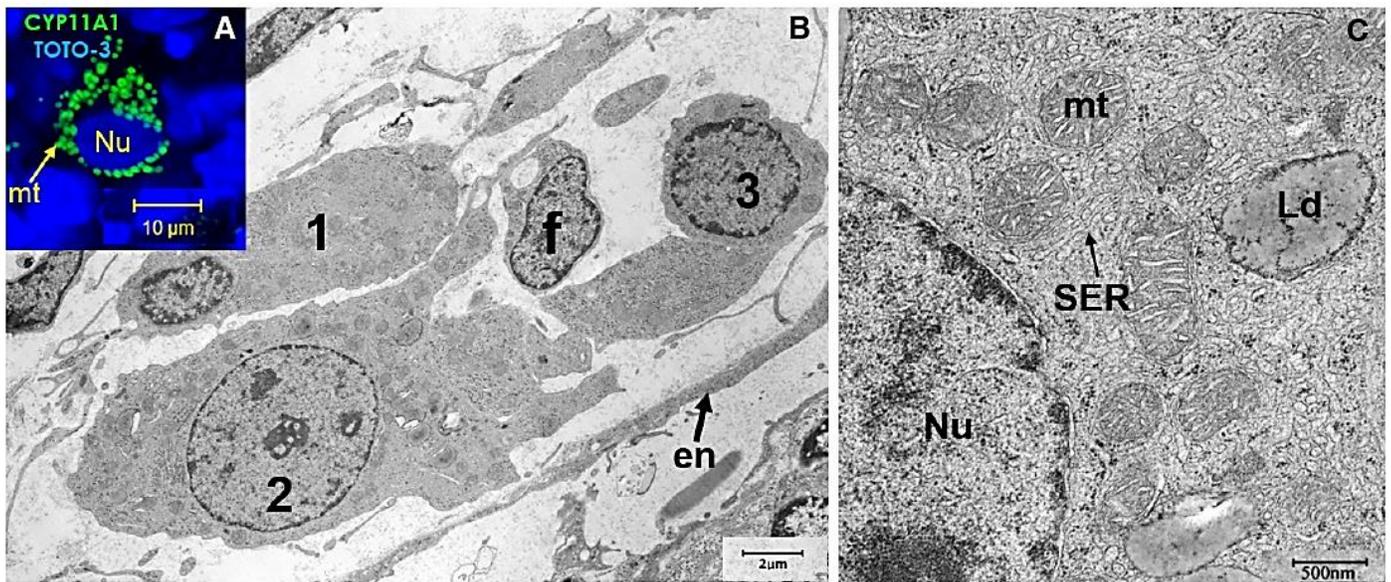
Current results from the rabbit fetal testis control showed the highest levels of *SF1* at 17 dpc; then, levels decreased but showed considerable variations throughout the period analyzed. As *SF1* during testis determination dimerized with SRY and AMH in preSertoli

and Sertoli cells, respectively, the level of *SF1* profiles detected in the current study, correspond to two kinds of cell populations. The testis is determined by preSertoli cells and specifies the stem FLCs also. Thus, the significantly higher levels of *SF1* seen at 27 dpc and the lower levels detected at three dpp in BPA-treated rabbits, possibly result from alterations to the two kinds of testicular cells, induced by the endocrine disruptor.

Besides the fact that the transcript levels of *SF1* correspond to Sertoli and Leydig cells in the rabbit fetal testis, the lack of a direct correlation between the levels of *SF1*, *CYP11A1*, *3β-HSD*, and *AR* may be due to the multiplicity of pathways involved in the regulation of the steroidogenic process that can be altered by BPA. At the testicular level, BPA acts as an androgen receptor antagonist (Wolstenholme et al., 2011), and can inhibit *CYP11A1* and *3β-HSD* expression (Peretz and Flaws 2013; Ye et al., 2011). Furthermore, BPA disrupts the steroid hormone balance in the testis, altering the levels of *CYP11A1* and *CYP19* throughout the JNK/c-jun signaling pathway, independently of *SF1* (Lan et al., 2017).

Most mechanistic studies of the effect of BPA in Leydig cells correspond to studies *in vitro* or involving postnatal rodents. In the present work, the experimental design to observe the effect of BPA on fetal Leydig cells intended to mimic the real condition in which BPA affects the fetal testis from a holistic point of view. As the BPA was orally supplied to pregnant rabbits, the alteration of both proliferation and steroidogenesis of the fetal Leydig cell population found here results from multiple factors. BPA may disrupt the gene expression of *SF1* and the steroidogenic enzymes *CYP11A1* and *3β-HSD*, through alternative signaling pathways, including JNK/c-jun, steroid feedback control, and hormone metabolism. Thus, the lack of parallel correlation between the gene levels of the nuclear receptor *SF1* and the steroidogenic enzymes may be explained by the multifactorial effects of BPA on the developing fetal Leydig cell population.

Although BPA has adverse effects on steroidogenic enzymes of Leydig cells, results vary depending on the animal model and the experimental design. Treatment *in utero* of pregnant rats with 400 mg/Kg of BPA, downregulated their levels of *CYP11A1* mRNA and protein (Lv et al., 2019). Among male mouse pups exposed to 50 mg/Kg/day of BPA during the prenatal period, there was an



**Fig. 8. Immunofluorescence and electron microscopy of a control testis section at 28 dpc.** (A) Immunostained CYP11A1 (green), localized in the mitochondria of the Leydig cell, the nuclei are stained with toto-3 iodide (blue). (B) Electron micrograph displaying a cluster of stromal cells: three Leydig cells (1, 2, and 3), a cross-sectioned fibroblast (f), and an endothelial cell (en). (C) Ultrastructure of a Leydig cell, the cytoplasm, shows abundant prominent mitochondria with lamellar cristae, smooth endoplasmic reticulum (SER), and lipid droplets (Ld). Nu, nucleus.

evident decrease in levels of *CYP11A1* in the testis (Xi *et al.*, 2011).

In mice, the testicular amplification of both *CYP11A1* and *3 $\beta$ -HSD* was detected from 13 to 20 dpc (Greco and Payne, 1994). Recent work reported that in human testis, the expression of *CYP11A1* and *3 $\beta$ -HSD* can be detected after the 8th to 9th gestational weeks (GW). However, although *CYP11A1* showed significant activation at 11-12 GW, levels of *3 $\beta$ -HSD* were constant until 12 GW (Savchuk *et al.*, 2019).

In pregnant does, C21 steroids of placental origin are potential precursors for testosterone biosynthesis before the start of this function in the fetal testis, where the initiation of testosterone synthesis by *3 $\beta$ -HSD* occurs between 17 and 19 dpc (Wilson and Siiteri, 1973). Using qRT-PCR in control rabbit FLCs, we confirmed that the levels of *CYP11A1* and *3 $\beta$ -HSD* start at 17 dpc and peak at 21 dpc. Subsequently, the transcript expression levels of the two genes oscillate by up to 3 dpp.

In contrast, to control testes at 17 dpc, two days after initiation of treatment, levels of *CYP11A1* and *3 $\beta$ -HSD* were significantly lower in BPA-treated testes. Although the levels increase at 21 and 26 dpc, on day 27, *CYP11A1* becomes significantly lower than in controls, whereas *3 $\beta$ -HSD* is lower at 27 dpc and 28 dpc. Finally, although during the perinatal period (20 dpc to 3 dpp), the different transcript levels of the two genes appeared among control and BPA treated testes, these are not significant.

A proposed mechanism for the anti-androgenic effect of BPA is that it competes with androgens for AR, preventing its translocation to the cell nucleus. Thus, the BPA inhibits the formation of functional complexes required for transcription (Teng *et al.*, 2013). Moreover, BPA antagonizes the interaction of AR with co-repressors such as SMRT and NCoR in Fetal Sertoli cells (Wang *et al.*, 2017).

Besides Sertoli cells, peritubular cells and gonocytes also express the AR in fetal testis. Thus, the disturbing effects caused by BPA in the differentiation, proliferation, and steroidogenic activity of the FLC population also impair the signaling timing among cells, which

may differ among species (Hazra *et al.*, 2013). Leydig cells of human fetal and testes of newborns express the AR (Boukari *et al.*, 2009). In contrast, FLCs in rodents are independent of androgens (Shima *et al.*, 2015). In male fetal rat gonad, the AR was expressed at 17 dpc and subsequently increased. Our current results show that compared to the controls, the AR levels of BPA-treated animals are significantly lower at 27 dpc. However, after birth, the testes of puppies at three dpp manifest significantly higher levels.

Like human patients with androgen insensitivity syndrome (Brinkman, 2001), AR knockout mice (ArKO) show male to female sex reversal (Yeh *et al.*, 2002). Although ArKO mice develop smaller fetal testis with degenerated Sertoli and germ cells, the Leydig cells become hypertrophic. This result suggests a paracrine interaction between the three kinds of cells for healthy testis development. Although we found that the levels of the AR in BPA-treated rabbit fetal testis appeared considerably disrupted, the postnatal consequences remain unknown.

The enzyme *CYP11A1* is the first and rate-limiting step that regulates the conversion of cholesterol to pregnenolone in the mitochondria. Then the *3 $\beta$ -HSD*, together with other enzymes located in the smooth endoplasmic reticulum, complete the synthesis of testosterone. At the ultrastructural level, differentiated FLCs in the rabbit have roundish mitochondria, most of them with lamellar cristae and abundant cisterns of the smooth endoplasmic reticulum. However, in developing rabbit testis, FLCs represent a heterogeneous population in terms of differentiation. At 21 dpc, most cells of the FLC population contain less smooth cisterns of the smooth endoplasmic reticulum; however, they formed more massive interstitial clusters than FLC population cells in the later fetal testis. Interestingly, at 21 dpc, the levels of *CYP11A1* and *3 $\beta$ -HSD* are higher, as are the number of proliferating FLCs. Thus, although the proliferating Leydig cells are less differentiated, their more significant number correlates with the significantly higher levels of the two steroidogenic genes.

Using a Leydig cell regeneration model in rats, Chen *et al.*, (2018) found that BPA accelerates the differentiation of postnatal Leydig cells without affecting their proliferation. In contrast, current results in the rabbit show altered differentiation and a significantly decreased proliferation of fetal Leydig cells in BPA treated mothers. Besides species differences, the two experimental designs differ considerably. Studies focused on the BPA effect on the rat analyzed the regeneration of postnatal Leydig cells in the two-month-old testis. In contrast, here, we analyzed the earlier fetal Leydig cells in developing testis of BPA treated mothers. Thus, the different developmental responses to BPA are hardly surprising, considering the spatio-temporal testis contexts of the two populations of Leydig cells: inside and outside the uterus.

In the rabbit, the Müllerian and Wolffian ducts develop similarly in both sexes between 15 and 20 *dpc*. Present results show that Leydig cells start producing testosterone as early as 17 *dpc*. In classical experiments, rabbit male fetuses were castrated at 19–21 *dpc* and developed a female phenotype (Jost, 1947). Our present results show no significant differences in fetal testosterone serum levels among BPA-treated and controls. Thus, the male somatic phenotype was undisturbed.

Levels of serum testosterone measured in BPA treated rat fetuses at 21 *dpc* appeared lower than controls (Lv *et al.*, 2019). Similarly, our results show that the serum levels of testosterone were more moderate in both control and BPA-treated fetus at 17 and 21 *dpc*. Subsequently, levels increased in both BPA-treated and untreated testes without significant differences up to 28 *dpc*. However, significant differences occurred three days after birth, being higher in the testis of BPA-treated rabbits. The substantial increase in serum testosterone in postnatal pups, correlates positively with the increased levels of *AR* in BPA treated FLCs.

Bjerregaard *et al.*, (1974) state in their ultrastructural study that the development of Leydig cells in the rabbit fetal testis, can be divided into three phases: Phase 1 (16-17 *dpc*) immature Leydig cells appear, Phase 2 (18-21 *dpc*), the fetal Leydig cells become differentiated with growing presence of smooth endoplasmic reticulum and decreasing rough endoplasmic reticulum and Phase 3 (22 *dpc* onwards). The authors stated that during phases 1 and 2, differentiation in the Leydig cells was nonsynchronous, subsequently evolving into synchronous differentiation at phase 3.

However, our current results show that the differentiating rabbit fetal Leydig cells persist as a nonsynchronous population, during phase 3. We found that besides the variable presence of the smooth endoplasmic reticulum among the Leydig cells, the proliferative capacity of the less differentiated Leydig cells suggests the presence of an asynchronous Leydig cell population. Therefore, the disrupting effect of BPA acting on an asynchronous fetal Leydig cell population probably increases the multifactorial disturbing effect of BPA on the normal steroidogenic pathway.

Overall, the current results demonstrate the complexity of the BPA disrupting effects inflicted on developing fetal Leydig cells *in situ*, from a holistic perspective. We found that in the rabbit, the fetal Leydig cells constitute a nonsynchronous population that may compensate for the harmful effects caused to the normal steroidogenic pathway during the fetal period. However, although most cytodifferentiated fetal Leydig cells disappear at around 10 *dpp*, the levels of *AR* and serum testosterone were higher in BPA treated puppies at 3 *dpp*. Thus, the long-lasting effects of BPA on adult Leydig cells remain to be studied.

TABLE 2

## PRIMER SEQUENCE

Gene	Primers 5'→3'	Length	Melting temperature	Sequence reference NCBI
<b>Steroidogenic factor 1</b>				
<i>SF1</i>	F: CGCAGGTGCATGGTCTTCAA R: CGTACTGGATCTGGCGGTAG	112 bp	60°C 60°C	XM_008273334.2
<b>Cytochrome P450 family 11 subfamilies A member 1</b>				
<i>CYP11A1</i>	F: CCGTGGTATCCTCTACAGCC R: CCCCATCTCATAACAGGTGCC	136 bp	60°C 60°C	XM_008253734.2
<b>3 beta-Hydroxy-steroid dehydrogenase</b>				
<i>3β-HSD</i>	F: CAGGTGTCATTACCCGAGACA R: GTTGGGTCCAGCTACTTCCA	131 bp	60°C 60°C	XM_002715686.3
<b>Androgen receptor</b>				
<i>AR</i>	F: GTGCCTATCCCAATCCAG R: ACGTGGTCCCTAGCAGTCTC	107 bp	60°C 60°C	NM_001195724.1
<b>Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase</b>				
<i>HPRT</i>	F: GCAGACCTTGCTTTTCCTT R: GTCTGGCCTGTATCCAACACT	103 bp	60°C 60°C	EF219063.1
<b>Sex-determining region Y</b>				
<i>SRY</i>	F: GTGGTCCCAACATCAGA R: ACCTCGTCCGGAAGTTAAAAATC	202 bp	56°C 56°C	Díaz-Hernández <i>et al.</i> , 2008

F= forward primer, R= reverse primer.

## Materials and Methods

## Animals and treatment

Individually caged New Zealand rabbits received food and water *ad libitum*. As rabbits have mount-induced reflex ovulation, copulation day was considered day "0" of pregnancy. Pregnant females received daily oral doses of 50 mg/kg/day of BPA (Sigma-Aldrich, USA), dissolved in ethanol, from 15 to 31 days *post-coitus* (*dpc*). Pregnant females in control received only ethanol. Treatments began at 15 *dpc*, corresponding to the onset of genital ridge establishment (Díaz-Hernández *et al.*, 2008). Pregnant females and newborns were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital (PISA, Mexico). Fetal testis was sampled at 17, 21, 26, 27, 28, 29, 30, and 31 *dpc* and postnatal puppies at 1, 2, and 3 *dpp*. From pairs of gonads removed from at least five dissected animals, one was processed for immunofluorescence and the other for RNA extraction. Sex of undifferentiated gonads at 17 and 21 *dpc*, was identified using an *SRY* amplification, as described by Díaz-Hernández *et al.*, 2008. Subsequently, testes and ovaries were visually identified. All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

## RNA Extraction and cDNA synthesis and qPCR

Dissected testes were quickly frozen and stored at -70°C. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. RNA was treated with RNase-Free DNase (Qiagen) at room temperature for 30 min. The concentration and quality of the total RNA were assessed by determining the optical density at A260: A280 ratio (2.0 ~ 0.15) in a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and by gel electrophoresis (1.5% agarose gel with ethidium bromide). For cDNA synthesis, total RNA (2 µg) was placed in 20 µl of 10 UI of transcript reverse transcriptase (Roche, Life Science). Negative controls were prepared without the template.

Gene expression determined with real-time PCR system (Applied Biosystems, California, USA) at 17, 21 26-31 *dpc*, and 3 *dpp*. The primers were created from rabbit specific sequences *SF1*, *CYP11A1*, *3β-HSD*, and *AR*. Four housekeeping genes were tested (Table 2): oligonucleotides of *H2AX* and *YWHAZ*, designed by

Daniel-Carlier *et al.*, (2013). As under our conditions, *HPRT* turned out to be the most stable option; it was used as an internal control to validate the levels of gene expression. Primers and melting temperatures are presented in Table 2. Optimal alignment of the primers was determined on a

temperature gradient, as well as the amplification efficiency of each gene obtained, to standardize the qPCR conditions for each gene. Fragment authenticity was verified by sequencing.

The qPCR reactions were implemented using SYBR Select Mix (Applied Biosystems, California, USA) 1X, oligonucleotides (10 mM), 1 µl of cDNA diluted in 9 µl of RNase-free water, and ultrapure water in a total volume of 10 µl. In all tests, negative controls were conducted without a template, and reactions were performed in triplicate. Conditions for cycles were set at 50°C for 2 min, 95°C for 2 min, then 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Melting curves were generated to ensure the amplification of a single product. Gene expression was quantified by Ct relative comparison. Ct is defined as the fractional cycle number at which reporter fluorescence reaches a certain level. The  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method was applied to calculate relative changes in expression.

#### Immunofluorescence and measurement of Leydig cell proliferation

For immunofluorescence, samples were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, dehydrated in saccharose gradient, and embedded in Tissue-Tek®. Frozen samples were stored at -70°C. Colocalization of anti-Ki67 (M740, clone MIB-1, Dako, Denmark) as a nuclear marker and anti-CYP11A1 (sc-18043, Santa Cruz, Biotechnology) as a cytoplasmic marker were used to analyze Leydig cell proliferation. Testes at 19, 21, 27, 28, and 31 *dpc* and 1, 2, and 3 *dpp* were processed. 30 µm thick serial sections of longitudinally oriented testis were alternately placed on one of four slides, to include adjacent sections of each testis on each slide (Suppl. Fig. S1). The slides were washed with ethanol to remove lipid droplets. Heat-induced antigen retrieval was performed by placing slides for 45 min at 90°C in Tris-buffer pH 10. These were then transferred into PBS and 0.5% Triton X-100 in PBS in a rack sequence for immunofluorescence. 10% of horse serum in PBT (0.5% Triton 100X/PBS) for two h at room temperature to block unspecific staining. Subsequently, sections were washed and incubated overnight at 4°C with primary goat anti-CYP11A1 antibody, diluted at 1:70. These were then incubated with the Alexa Fluor 488 donkey anti-goat secondary antibody (A11055, Molecular Probes, Invitrogen) for 20 min at room temperature and left overnight at 4°C, with the second primary mouse monoclonal anti-Ki67, diluted at 1:150. The Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse (A31570, Molecular Probes, Invitrogen) was used as a secondary antibody. Cell nuclei were counterstained with TOTO-3 iodide (blue) (T3604, Molecular Probes, Invitrogen) and mounted with fluorescent medium (S3023, Dako, Agilent Technologies, Denmark). Images were collected and processed with a confocal Zeiss Pascal LSM5 microscope. In negative controls, the primary antibodies were omitted and incubated exclusively with secondary antibodies. Leydig cells were stained green, and Ki67 were stained red. The number of cells labeled with colocalized CYP11A1 and Ki67 was measured with Zeiss LSM5 Image Software on four cryosections for each testis (n = 4 testis per age category). Labeled cells were identified in 3D confocal stacks of 3.0 µm optical sections, and their number per unit area (325.67 µm<sup>2</sup>) was counted.

#### Serum collection and testosterone assay

The blood collected in Eppendorf tubes without anticoagulant was allowed to stand for 1 hr at room temperature to promote coagulation and then kept at 4°C for 24 h, centrifuged 15 min at 3000 rpm at 4°C, and stored at -20°C until use. Samples from at least five animals in each age category were analyzed. Serum testosterone was quantified by competitive ELISA immunoassay (ENZO, testosterone ELISA kit, Farmingdale, NY) according to the manufacturer's instructions.

#### Semi-thin sections and transmission electron microscopy

Testes from each group were fixed in Karnovsky solution and subsequently postfixed with 1% OsO<sub>4</sub> in Zetterqvist's buffer. After, the testes were dehydrated with an ascending series of ethanol concentrations and embedded in Epon 812. Semithin sections (1 µm thick) were cut with an ultramicrotome (Power Tome Microtomy XL, RMC) and stained with toluidine blue. Thin sections (60nm) were stained with uranyl acetate and

lead citrate. Images were collected and processed either with a light or transmission electron microscope (Jeol EM1010).

#### Statistical analysis

Data are presented as mean and standard error (SE). Statistical differences between groups were evaluated and compared using a one-way ANOVA test, followed by Welch's correction. Statistical significance was set as  $p < 0.05$ .

#### Acknowledgments

This publication is required for the accomplishment of the Ph.D. degree of Alexis Paulina Ortega García to the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM. She received a fellowship from CONACYT 587621. This study was supported by CONACYT 166012, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT-UNAM IN201218 and IN209520. The authors acknowledge Alejandro Marmolejo-Valencia, Miguel Tapia Rodríguez, Adriana Castro, and Patricia de la Torre, for their technical assistance.

#### References

- AKINGBEMIB, SOTTAS CM, KOULOVAAL, KLINEFELTER GR, HARDY MP (2004). Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 145: 592-603.
- BALAKRISHNAN B, HENARE K, THORSTENSEN EB, PONNAMPALAM A P, MITCHELL M D (2010). Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 202: 393e1-393e7.
- BARSOUM IB, KAUR J, GE RS, COOKE PS, YAO HH (2013). Dynamic changes in fetal Leydig cell populations influence adult Leydig cell populations in mice. *FASEB J* 27: 2657-2666.
- BJERREGAARD P, BRO-RASSMUSSEN F, REUMERT T (1974). Ultrastructural development of fetal rabbit testis. *Z Zellforsch* 147: 401-413.
- BEN MAAMAR M, LESNÉ L, DESDOITS-LETHIMONIER C, COIFFEC I, LASSUR-GUÈRE J, LAVOUÉ V, DECEUNINCK Y, ANTIGNAC JP, LE BIZEC B, PERDU E, ZALKO D, PINEAU C, CHEVRIER C, DEJUCQ-RAINSFORD N, MAZAUD-GUITTOTS S, JÉGOU B (2015). An investigation of the endocrine-disruptive effects of bisphenol A in human and rat fetal testes. *PLoS one* 10: e0117226.
- BOUKARI K, MEDURI G, BRAILLY-TABARD S, GUIBOURDENCHE J, CIAMPI ML, MASSIN N, MARTINERIE L, PICARD JY, REY R, LOMBÈS M, YOUNG J (2009). Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Müllerian hormone repression during early human testis development. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 1818-1825.
- BRINKMANN AO (2001). Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179: 105-109.
- BULLEJOS M, KOOPMAN P (2004). Germ cells enter meiosis in a rostrocaudal wave during the development of the mouse ovary. *Mol Rep Dev* 68: 422-428.
- CHEN L, ZHAO Y, LI L, XIE L, CHEN X, LIU J, LI X, JIN L, LI X, GE RS (2018). Bisphenol A stimulates differentiation of rat stem Leydig cells *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol* 474: 158-167.
- DANIEL-CARLIER N, HARSCOËT E, THÉPOT D, AUGUSTE A, PAILHOUX E, JO-LIVET G (2013). Gonad differentiation in the rabbit: evidence of species-specific features. *PLoS One* 8: e60451.
- DÍAZ-HERNÁNDEZ V, CALDELASI, MERCHANT-LARIOSH (2019). Gene expression in the supporting cells at the onset of meiosis in rabbit gonads. *Sex Dev* 34: 775-789.
- DÍAZ-HERNÁNDEZ V, LEÓN DEL RÍO A, ZAMORA M, MERCHANT-LARIOS H (2008). Expression profiles of SRY and SOX9 in rabbit gonads: the classical model of mammalian sex differentiation. *Sex Dev* 2: 152-166.
- ELADAK S, MOISON D, GUERQUIN MJ, MATILIONYTE G, KILCOYNE K, NTUMBA-BYNT, MESSIAEN S, DECEUNINCK Y, POZZI-GAUDIN S, BENACHIA, LIVERA G, ANTIGNAC JP, MITCHELL R, ROUILLER-FABRE V, HABERT R (2018). Effects of environmental Bisphenol A exposures on germ cell development and Leydig cell function in the human fetal testis. *PLoS One* 13: e0191934.
- FRYDMAN N, POULAIN M, ARKOUN B, DUQUENNE C, TOURPIN S, MESSIAEN S, HABERT R, ROUILLER-FABRE V, BENACHIA A, LIVERA G (2017). Human

- fetal ovary shares meiotic preventing factors with the developing testis. *Human Reprod* 32: 631-642.
- GEENS T, AERTS D, BERTHOT C, BOURGUIGNON JP, GOEYENS L, LECOMTE P, MAGHUIN-ROGISTER G, PIRONNET AM, PUSSEMIER L, SCIPIO ML, VAN LOCO J, COVACI A (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol* 50: 3725-3740.
- GRECOTL, PAYNEAH (1994). Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology* 135: 262-268.
- HABERT R, LEJEUNE H, SAEZ JM (2001). Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 179: 47-74.
- HABERT R, MUCZYNSKI V, GRISIN T, MOISON D, MESSIAEN S, FRYDMAN R, BENACHIA, DELBES G, LAMBROTR, LEHRAIKIA, N'TUMBA-BYNT, GUERQUIN MJ, LEVACHER C, ROUILLER-FABRE V, LIVERA G (2014). Concerns about the widespread use of rodent models for human risk assessments of endocrine disruptors. *Reproduction* 147: 119-129.
- HATANO O, TAKAYAMA K, IMAI T, WATERMAN MR, TAKAKUSU A, OMURA T, MOROHASHI K (1994). Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal, and postnatal rat development. *Development* 120: 2787-2797.
- HAZRA R, JIMENEZ M, DESAI R, HANDELSMAN DJ, ALLAN CM (2013). Sertoli cell androgen receptor expression regulates temporal fetal and adult Leydig cell differentiation, function, and population size. *Endocrinology* 154: 3410-3422.
- HORSTMANKA, NACIFF JM, OVERMANN GJ, FOERTSCH LM, RICHARDSON BD, DASTON GP (2012). Effects of transplacental 17- $\alpha$ -ethynylestradiol or bisphenol A on the developmental profile of steroidogenic acute regulatory protein in the rat testis. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 95: 318-325.
- JOST A (1947). Recherches sur la différenciation de l'embryon de lapin. III. Rôle des gonads fœtales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch Anat Microsc Morph Exp* 36: 271-312.
- KAFTANOVSKAYA EM, LOPEZ C, FERGUSON L, MYHR C, AGOULNIK AI (2015). Genetic ablation of androgen receptor signaling in fetal Leydig cell lineage affects Leydig cell functions in adult testis. *FASEB J* 29: 2327-2337.
- LAN HC, WU KY, LIN IW, YANG AA (2017). Bisphenol A disrupts steroidogenesis and induces a sex hormone imbalance through c-jun phosphorylation in Leydig cells. *Chemosphere* 185: 237-246.
- LEERS-SUCHETA S, MOROHASHI K, MASON JI, MELNER MH (1997). Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J Biol Chem* 272: 7960-7967.
- LV Y, LI L, FANG Y, CHEN P, WU S, CHEN X, NI C, ZHU Q, HUANG T, LIAN Q, GE RS (2019). In utero exposure to bisphenol A disrupts fetal testis development in rats. *Environ Pollut* 246: 217-224.
- MA S, SHI W, WANG X, SONG P, ZHONG X (2017). Bisphenol A exposure during pregnancy alters the mortality and levels of reproductive hormones and genes in offspring mice. *Biomed Res Int* 2017: 3585809.
- MADEJA ZE, PAWLAK P, PILISZEKA (2019). Beyond the mouse: non-rodent animal models for the study of early mammalian development and biomedical research. *Int J Dev Biol* 63: 187-201.
- MAMSEN LS, ERNST EH, BORUP R, LARSEN A, OLESEN RH, ERNST E, ANDERSON RA, KRISTENSEN SG, ANDERSEN CY (2017). Temporal expression pattern of genes during the period of sex differentiation in human embryonic gonads. *Sci Rep* 7: 15961.
- MERCHANT-LARIOS H, MORENO-MENDOZA N (1998). Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse testis. *Exp Cell Res* 244: 230-238.
- MERLET J, MOREAU E, HABERT R, RACINE C (2007). Development of fetal testicular cells in androgen receptor-deficient mice. *Cell Cycle* 6: 2258-2262.
- MINATOYAMA, SASAKI S, ARAKIA, MIYASHITA C, ITOH S, YAMAMOTO J, MATSUMURAT, MITSUIT, MORIYAK, CHO K, MORIOKAK, MINAKAMI H, SHINOHARA N, KISHI R (2017). Cord Blood Bisphenol A Levels and Reproductive and Thyroid Hormone Levels of Neonates: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Epidemiology* 28: 3-9.
- NACIFF JM, HESS KA, OVERMANN GJ, TORONTALI SM, CARR GJ, TIESMAN JP, FOERTSCH LM, RICHARDSON BD, MARTINEZ JE, DASTON GP (2005). Gene expression changes induced in the testis by transplacental exposure to high and low doses of 17 alpha-ethynyl estradiol, genistein, or bisphenol A. *Toxicol Sci* 56: 396-416.
- NANJAPPAMK, SIMON L, AKINGBEMI BT (2012). The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cells. *Biol Reprod* 86: 1-12.
- N'TUMBA-BYNT, MOISON D, LACROIXM, LECUREUILC, LESAGEL, PRUD'HOMME SM, POZZI-GAUDINS, FRYDMAN R, BENACHIA, LIVERA G, ROUILLER-FABRE V, HABERT R (2012). Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PLoS One* 7: 51579.
- PERETZ J, FLAWS JA (2013). Bisphenol A down-regulates rate-limiting *Cyp11a1* to acutely inhibit steroidogenesis in cultured mouse antral follicles. *Toxicol Appl Pharmacol* 271: 249-256.
- ROUILLER-FABRE V, GUERQUIN MJ, N'TUMBA-BYNT T, MUCZYNSKI V, MOISON D, TOURPIN S, MESSIAEN S, HABERT R, LIVERA G (2015). Nuclear receptors and endocrine disruptors in fetal and neonatal testes: a gapped landscape. *Front Endocrinol* 6: 58.
- SADOVSKY Y, CRAWFORD PA, WOODSON KG, POLISH JA, CLEMENTS MA, TOURTELLOTTE LM, SIMBURGER K, MILBRANDT J (1995). Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10939-10943.
- SAVCHUK I, MORVAN ML, ANTIGNAC JP, KUREK M, LE BIZEC B, SÖDER O, SVECHNIKOV K (2019). Ontogenesis of human fetal testicular steroidogenesis at early gestational age. *Steroids* 141: 96-103.
- SHIMAY, MATSUZAKI S, MIYABAYASHI K, OTAKEH, BABAT, KATOS, HUHTANIEMI I, MOROHASHI K (2015). Fetal Leydig Cells Persist as an Androgen Independent Subpopulation in the Postnatal Testis. *Mol Endocrinol* 29: 1581-1593.
- SKAKKEBAEK NE, RAJPERT-DE MEYTS E, BUCK LGM, TOPPARI J, ANDERSON AM, EISENBERG ML, JENSEN TK, JØRGENSEN N, SWAN SH, SAPRA KJ, ZIEBE S, PRISKORN L, JUUL A (2016). Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev* 96: 55-97.
- TANAKA M, NAKAYA S, KATAYAMA M, LEFFERS H, NOZAWA S, NAKAZAWA R, IWAMOTO T, KOBAYASHI S (2006). Effect of prenatal exposure to bisphenol A on the serum testosterone concentration of rats at birth. *Hum Exp Toxicol* 25: 369-373.
- TENG C, GOODWIN B, SHOCKLEY K, XIA M, HUANG R, NORRIS J, MERRICK BA, JETTON AM, AUSTIN CP, TICE RR (2013). Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chem Biol Interact* 203: 556-564.
- VOM SAAL F S, Akingbemi BT, Belcher SM, et al., (2007) Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol* 24: 131-138.
- VOUTILAINEN, R (1992). Differentiation of the fetal gonad. *Hormone Res* 38: 66-71.
- WANG H, DING Z, SHI QM, GE X, WANG HX, LI MX, CHEN G, WANG Q, JU Q, ZHANG JP, ZHANG MR, XU LC (2017). Anti-androgenic mechanisms of Bisphenol A involve the androgen receptor signaling pathway. *Toxicology* 387: 10-16.
- WATANABE S, WANG RS, MIYAGAWA M, KOBAYASHI K, SUDA M, SEKIGUCHI S, HONMA T (2003). Imbalance of testosterone level in male offspring of rats perinatally exposed to bisphenol A. *Ind Health* 41: 338-341.
- WEI Y, HAN C, GENG Y, CUI Y, BAO Y, SHI W, ZHONG X (2019). Maternal exposure to bisphenol A during pregnancy interrupts testis development of F1 male mice. *Environ Sci Pollut Res Int* 26: 23491-23504.
- WILSON JD, SIITERI PK (1973). Developmental pattern of testosterone synthesis in the fetal gonad of the rabbit. *Endocrinology* 92: 1182-1191.
- WOLSTENHOLME JT, RISSMAN EF, CONNELLY JJ (2011). The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Horm Behav* 59: 296-305.
- XI W, LEE CK, YEUNG WS, GIESY JP, WONG MH, ZHANG X, HECKER M, WONG CK (2011). Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 31: 409-417.
- YE L, ZHAO B, HU G, CHU Y, GE, RS (2011). Inhibition of human and rat testicular steroidogenic enzyme activities by bisphenol A. *Toxicol Lett* 207: 137-142.
- YEH S, TSAIMY, XU Q, MU XM, LARDYH, HUANGKE, LIN H, YEHS, ALTUWAIJRI S, ZHOU X, XING L, BOYCE BF, HUNG MC, ZHANG S, GAN L, CHANG C (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an *in vivo* model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13498-13503.

**Further Related Reading, published previously in the *Int. J. Dev. Biol.***

**Expression of aromatase in the embryonic brain of the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*), and the effect of bisphenol-A in sexually differentiated embryos**

Patsy Gómez-Picos, Itzel Sifuentes-Romero, Horacio Merchant-Larios, Rubí Hernández-Cornejo, Verónica Díaz-Hernández and Alejandra García-Gasca

*Int. J. Dev. Biol.* (2014) 58: 733-741  
<https://doi.org/10.1387/ijdb.140192ag>

**Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development**

R. John Aitken and Mark A. Baker  
*Int. J. Dev. Biol.* (2013) 57: 265-272  
<https://doi.org/10.1387/ijdb.130146ja>

**Estrogenic in vitro assay on mouse embryonic Leydig cells**

Gina La Sala, Donatella Farini and Massimo De Felici  
*Int. J. Dev. Biol.* (2010) 54: 717-722  
<https://doi.org/10.1387/ijdb.092883gs>

**Effect of endogenous and exogenous hormones on testicular cancer: the epidemiological evidence**

Fabrizio Giannandrea, Donatella Paoli, Irene Figà-Talamanca, Francesco Lombardo, Andrea Lenzi and Loredana Gandini  
*Int. J. Dev. Biol.* (2013) 57: 255-263  
<https://doi.org/10.1387/ijdb.130015fg>

**Endocrine disruptors, gene deregulation and male germ cell tumors**

Jesús Del Mazo, Miguel A. Brieño-Enríquez, Jesús García-López, Luis A. López-Fernández and Massimo De Felici  
*Int. J. Dev. Biol.* (2013) 57: 225-239  
<https://doi.org/10.1387/ijdb.130042jd>

**The developing female genital tract: from genetics to epigenetics**

Julie Massé, Tanguy Watrin, Audrey Laurent, Stéphane Deschamps, Daniel Guerrier and Isabelle Pellerin  
*Int. J. Dev. Biol.* (2009) 53: 411-424  
<https://doi.org/10.1387/ijdb.082680jm>

**The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis.**

H Merchant-Larios, N Moreno-Mendoza and M Buehr  
*Int. J. Dev. Biol.* (1993) 37: 407-415  
<http://www.intjdevbiol.com/web/paper/8292535>

